

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 626**

21 Número de solicitud: 201331560

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/39 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

23.10.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.04.2015

71 Solicitantes:

**BIO-ILIBERIS RESEARCH & DEVELOPMENT S.L.
(100.0%)**

**Polígono Industrial Juncaril, Capileira nº 7
18210 Peligros (Granada) ES**

72 Inventor/es:

ROCA HERNÁNDEZ, Amalia

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Microorganismo con capacidad para producir compuestos que inducen respuesta sistémica en plantas y sus aplicaciones como promotor del crecimiento vegetal**

57 Resumen:

Microorganismo con capacidad para producir compuestos que inducen respuesta sistémica en plantas y sus aplicaciones como promotor del crecimiento vegetal.

Se describe un microorganismo de la especie *Pseudomonas fluorescens* que induce la producción de compuestos que inducen resistencia sistémica en plantas así como la producción de compuestos estimuladores del crecimiento de las plantas y que, además, solubiliza fosfatos insolubles y hierro. Ventajosamente, dicho microorganismo sobreproduce aminoácidos. Dicho microorganismo puede utilizarse en agricultura, como fitofortificante, bioactivador y como agente para incrementar la resistencia de las plantas a agentes fitopatógenos.

ES 2 534 626 A1

DESCRIPCIÓN

MICROORGANISMO CON CAPACIDAD PARA PRODUCIR COMPUESTOS QUE INDUCEN RESPUESTA SISTÉMICA EN PLANTAS Y SUS APLICACIONES COMO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO VEGETAL

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se relaciona con un microorganismo de la especie *Pseudomonas fluorescens* con capacidad para producir compuestos que inducen resistencia sistémica en plantas e incrementan la resistencia de la planta frente a estreses ambientales y frente a agentes fitopatógenos, así como compuestos estimuladores del crecimiento de las plantas, y, además, solubilizar fosfatos insolubles y hierro. El microorganismo de la invención, ha sido seleccionado por su capacidad para facilitar la nutrición orgánica de las plantas y encuentra aplicación en el campo de la agricultura, en particular, como fitofortificante, bioactivador y como agente para incrementar la resistencia de las plantas a agentes biológicos que puedan generar daño.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Debido al creciente interés en productos biológicos, no sólo con capacidad de promoción del crecimiento vegetal y solubilización de nutrientes de baja disponibilidad, sino también con propiedades de estimulación de resistencia contra estrés biótico, resulta ventajoso identificar microorganismos que no sólo tengan todas estas características sino que también produzcan otras sustancias con efectos beneficiosos tales como aminoácidos, que favorecen el crecimiento de las plantas, o ácidos orgánicos de la familia del salicilato y del jasmónico que inducen resistencia sistémica.

Los 20 aminoácidos proteínogénicos, susceptibles de ser utilizados bien directamente o bien tras su modificación química, se utilizan en una gran variedad de propósitos, por ejemplo, en productos con valor nutricional añadido, potenciadores del sabor, aditivos para alimentación animal, cosméticos, fármacos, pesticidas, fertilizantes, etc.

En los últimos años, la producción de aminoácidos se ha centrado en la industria de la producción de abonos orgánicos, en la que se venden como bioactivadores, en respuesta a las limitaciones de la legislación frente al uso de fertilizantes químicos inorgánicos y sus efectos adversos sobre el medio ambiente.

Hoy en día, la mayoría de los aminoácidos se producen a partir de fermentación bacteriana [Ikeda. Amino acid production processes (2003)

Biotechnology, vol 79, Springer – Verlag. 1:35], sobre todo por bacterias modificadas genéticamente.

Los procesos microbiológicos utilizados para la obtención de aminoácidos se clasifican de la siguiente manera [Kumagai. Microbial production of amino acids in Japan (2000) Biotechnology, vol 69, Springer – Verlag. 71:85]:

- a) utilización de cepas silvestres (producción de ácido *L*-glutámico, *L*-alanina, *L*-valina);
- b) utilización de mutantes (producción de *L*-lisina, *L* -treonina, *L* -arginina, *L* -citrulina, *L*-ornitina, *L*-homoserina, *L*-triptófano, *L*-fenilalanina, *L*-tirosina, *L*-histidina, etc.);
- c) adición de precursores (producción de *L*-treonina, *L*-isoleucina, *L*-triptófano, etc.);
- d) métodos enzimáticos (producción de ácido *L*-aspártico, *L*-alanina, *L*-cisteína, dihidroxi-fenilalanina, etc.); y
- e) utilización de cepas generadas mediante ingeniería genética y metabólica, o por combinaciones de las mismas (producción de hidroxil-*L*-prolina).

El mayor volumen de producción de aminoácidos se centra en la industria alimentaria, concretamente en la producción de potenciadores del sabor, seguida de cerca por la industria de alimentación para animales, experimentando un aumento en la industria de producción de abonos orgánicos, en la que se venden como bioactivadores.

Los bioactivadores vegetales constituyen toda una nueva generación de productos orgánicos, que conforman un giro obligado de la industria ante el endurecimiento de la legislación frente al uso de fertilizantes químicos inorgánicos y sus efectos adversos sobre el medio ambiente, dando lugar a la búsqueda y estudio de nuevas fuentes naturales de abonos, bioestimulantes y enmiendas para el suelo [Crouch et al., Evidence for the presence of plant growth regulators in commercial seaweed products (1993) Plant Growth Regulation 13:21], unido al interés creciente de la sociedad por la agricultura ecológica.

Las plantas son capaces de sintetizar aminoácidos, siendo un proceso complejo de elevado gasto energético que requiere carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno, por lo que el aporte externo de estos compuestos se hace ineludible para mejorar el desarrollo de la planta durante aquellos momentos del ciclo donde es necesario facilitar la producción de otros compuestos más complejos como fitoalexinas y compuestos cianógenos para la defensa frente a ataques de patógenos, vitaminas

para el desarrollo de las plantas, compuestos cromógenos que forman parte de distintos pigmentos dando lugar a colores en flores y frutos, y hormonas vegetales [Singh. Plant amino acids (2006) Amino Acids 30:111].

La incorporación de los aminoácidos en las plantas se produce vía foliar o
 5 radicular, siendo éste último el mecanismo más frecuente de aporte de aminoácidos
 externos. Los aminoácidos contenidos en los abonos orgánicos, provienen en su
 mayoría de hidrólisis enzimática de restos orgánicos (animales y/o vegetales), o de
 extractos de algas, que por su parte tienen la ventaja de proporcionar hormonas
 vegetales tales como citoquininas y auxinas, como compuestos activos [Schmidt et al.,
 10 Questions and answers about biostimulants (2003) Golf Course Management 91:94].

Otras aproximaciones para obtener productos de origen biológico que
 produzcan estos efectos beneficiosos sobre el desarrollo vegetal comprenden el uso
 de bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPRs (del inglés "Plant Growth
 Promoting Rhizobacteria"), en las que se utilizan microorganismos vivos que colonizan
 15 eficazmente la rizosfera, son capaces de mantenerse en ella y, además, de producir
 nutrientes para la planta hospedadora, influenciar positivamente de manera indirecta el
 crecimiento y desarrollo de la raíz y/o estimular el crecimiento de la planta mediante el
 control de patógenos [Vessey. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers
 (2003) Plant and Soil 255:571].

Es difícil obtener un microorganismo que cumpla muchos de estos requisitos,
 20 por lo que resulta propicio identificar aquéllos que contengan el mayor número de
 estas características, es decir, que sean eficaces como biofertilizantes,
 fitoestimulantes y agentes de biocontrol [Bloemberg and Lugtenberg. Molecular basis
 of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria (2001) Current Opinion in
 25 Plant Biology 4:343] y, además, produzcan otro tipo de sustancias beneficiosas, no
 descritas anteriormente en este tipo de microorganismos, como aminoácidos, que,
 entre otros, tienen efectos beneficiosos sobre la biosíntesis de proteínas, resistencia a
 estreses abióticos, quelación de micronutrientes, son precursores de fitohormonas (*L*-
 triptófano, *L*-valina), formación de frutos, germinación de semillas (*L*-fenilalanina), etc.

Por tanto, resultaría interesante disponer de microorganismos capaces de
 30 producir compuestos que inducen resistencia sistémica en plantas y compuestos
 estimuladores del crecimiento de las plantas; ventajosamente, dichos microorganismos
 deberían producir, además, aminoácidos y/o solubilizar fosfatos insolubles y/o hierro.
 Dichos microorganismos podrían ser utilizados como biofertilizantes, fitoestimulantes y

agentes inductores de la resistencia sistémica inducida sin los inconvenientes que presentan otras alternativas del estado de la técnica.

COMPENDIO DE LA INVENCION

5 Se ha aislado y caracterizado una cepa de *Pseudomonas fluorescens* capaz de producir compuestos estimuladores del crecimiento vegetal y compuestos que inducen una respuesta sistémica en la planta frente a estreses ambientales y/o frente a agentes fitopatógenos, y que, además, solubiliza fosfatos insolubles y hierro presentes en el suelo o en sustratos sólidos, pudiendo utilizar las formas solubilizadas como
10 nutrientes. Ventajosamente, dicho microorganismo tiene la capacidad de sobreproducir un aminoácido, preferentemente, un *L*-aminoácido, por ejemplo, un aminoácido seleccionado del grupo formado por *L*-triptófano, *L*-fenilalanina, *L*-valina, N-bencilglicina, y cualquier combinación de los mismos

 Por tanto, la presente invención contribuye a la disminución del uso de
15 compuestos fitosanitarios (e.g., fungicidas, etc.) debido a la capacidad de dicho microorganismo para producir metabolitos que incrementan la resistencia frente a agentes fitopatógenos presentes en el suelo (que, preferentemente, atacan el sistema radicular de las plantas), a la disminución del uso de fertilizantes con contenido en aminoácidos generados a partir de la hidrólisis de proteínas, mediante la utilización de
20 microorganismos que producen compuestos estimuladores del crecimiento vegetal y compuestos que inducen una respuesta sistémica en la planta frente a estreses ambientales y/o frente a agentes fitopatógenos, y que, además, solubilizan fosfatos insolubles y hierro presentes en el suelo o en sustratos sólidos, y que, además, ventajosamente, son sobreproductores de uno o más aminoácidos, preferentemente,
25 *L*-aminoácidos, tales como, por ejemplo, *L*-triptófano y N-bencilglicina. El triptófano es el precursor del ácido indolacético (IAA), hormona auxínica potenciadora del desarrollo del sistema radicular; la N-bencilglicina aporta nitrógeno asimilable para las plantas, ahorrando así el gasto energético que supone la asimilación de los nitratos. Dicho microorganismo también contribuye a la disminución del uso de fertilizantes en base a
30 piedra fosfórica, ya que tienen capacidad para solubilizar fosfatos y hierro insolubles presentes en el suelo o en sustratos sólidos.

 Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un microorganismo de la especie *Pseudomonas fluorescens*, identificado como *Pseudomonas fluorescens* BIRD-5, depositado el 20 de enero de 2011 en la Colección Española de Cultivos Tipo
35 (CECT) con el número de acceso CECT 7851, que produce compuestos que inducen

una respuesta sistémica en plantas, compuestos que promueven el crecimiento de las plantas, y solubilizar fosfato insoluble y hierro. El microorganismo proporcionado por esta invención incluye tanto dicho microorganismo [*P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851)] como sus mutantes que conservan dichas propiedades. Ventajosamente, dicho microorganismo y sus mutantes tienen la capacidad de reproducir aminoácidos, preferentemente, *L*-aminoácidos, tales como por ejemplo, aminoácidos seleccionados del grupo formado por *L*-triptófano, *L*-fenilalanina, *L*-valina, *N*-bencilglicina y cualquier combinación de los mismos.

Un cultivo biológicamente puro de dicho microorganismo constituye un aspecto adicional de esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un fertilizante suplementado que comprende un fertilizante y un microorganismo proporcionado por la presente invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un soporte sólido activo que comprende un soporte sólido, de uso agronómico, y un microorganismo proporcionado por la presente invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una semilla suplementada que comprende una semilla y dicho microorganismo, opcionalmente adherido a un soporte sólido.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el cepellón suplementado, con dicho microorganismo, de plantas, árboles o arbustos.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un caldo de cultivo resultante de un procedimiento que comprende las etapas:

- a) cultivar un microorganismo proporcionado por la presente invención en un medio de cultivo mínimo que comprende una fuente de carbono susceptible de ser utilizada por el microorganismo de la invención,
- b) incubar la suspensión bacteriana resultante de la etapa a) a una temperatura comprendida entre 15°C y 40°C hasta alcanzar una densidad celular igual o superior a 10^9 unidades formadoras de colonia (ufc)/mL; y
- c) separar el caldo de cultivo, y, si se desea,
- d) filtrar dicho caldo de cultivo a través de un filtro estéril con un diámetro de poro de 0,22 μ m.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para estimular el crecimiento de una planta, que comprende aplicar una cantidad eficaz de un microorganismo, un fertilizante suplementado, un soporte sólido activo, o un caldo de

cultivo proporcionado por la presente invención, a la planta o a la zona de influencia de la raíz, o, alternativamente, sembrar una semilla de dicha planta, suplementada con un microorganismo proporcionado por la presente invención.

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para proteger una planta frente a un agente fitopatógeno, mediante la inducción de resistencia sistémica en la planta frente a dicho agente fitopatógeno, que comprende aplicar una cantidad eficaz de un microorganismo de la invención, o de un fertilizante suplementado de la invención, o de un soporte sólido activo de la invención, o de un caldo de cultivo de la invención, sobre dicha planta o sobre su área de influencia
10 radicular o rizosférica, o, alternativamente, sembrar una semilla de dicha planta suplementada con un microorganismo de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para controlar biológicamente un agente fitopatógeno, en donde dicho agente fitopatógeno es susceptible de atacar a dicha planta, que comprende poner en contacto dicha planta
15 con un microorganismo, fertilizante suplementado, soporte sólido activo, o caldo de cultivo proporcionados por la presente invención, bajo condiciones que permiten la adquisición de inmunidad contra dicho agente fitopatógeno mediante la adquisición de un mecanismo de resistencia sistémica.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para
20 restablecer el estado general de la planta tras una situación de estrés ambiental (abiótico), que comprende aplicar una cantidad eficaz de un microorganismo de la invención, o de un fertilizante suplementado de la invención, o de un soporte sólido activo de la invención, o de un caldo de cultivo de la invención, sobre dicha planta o sobre su área de influencia rizosférica.

25 En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de un fosfato insoluble en un sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble, que comprende poner en contacto dicho sustrato sólido a tratar con un microorganismo, o con un fertilizante suplementado, o con un soporte sólido activo proporcionados por la presente
30 invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de fosfato insoluble presente en un suelo que contiene un fosfato insoluble, que comprende poner en contacto dicho suelo que contiene un fosfato insoluble a tratar con un microorganismo de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de hierro insoluble en un sustrato sólido que contiene hierro insoluble, que comprende poner en contacto dicho sustrato sólido a tratar con un microorganismo, o con un fertilizante suplementado, o con un soporte sólido activo proporcionados por la presente invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de hierro insoluble presente en un suelo que contiene hierro insoluble, que comprende poner en contacto dicho suelo que contiene hierro insoluble a tratar con un microorganismo de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de un fosfato insoluble y de hierro en un sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble y hierro insoluble, que comprende poner en contacto dicho sustrato sólido a tratar con un microorganismo, o con un fertilizante suplementado, o con un soporte sólido activo proporcionados por la presente invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de fosfato insoluble y hierro insoluble presente en un suelo que contiene un fosfato insoluble y hierro insoluble, que comprende poner en contacto dicho suelo que contiene un fosfato insoluble y hierro insoluble a tratar con un microorganismo de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento de mutagénesis y selección de clones para la obtención de microorganismos con capacidad para sobreproducir aminoácidos.; concretamente, con un procedimiento para la obtención de un mutante de *Pseudomonas fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) que, además de mantener las características a) – c) de la cepa *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) parental, sobreproduce al menos un aminoácido, tal como se define en la reivindicación 24.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se ha aislado y caracterizado un microorganismo perteneciente a la especie *Pseudomonas fluorescens*, identificado como *P. fluorescens* BIRD-5, depositado el 20 de enero de 2011 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 7851. Dicho microorganismo es capaz de (i) producir compuestos que inducen resistencia sistémica en plantas, (ii) producir compuestos estimuladores del crecimiento de las plantas, y, además, de (iii) solubilizar fosfato y hierro, tal como, por

ejemplo, el fosfato y el hierro presentes en el suelo o en la roca fosfórica, y utilizar las formas solubilizadas como nutrientes. Asimismo, dicho microorganismo es capaz de sobreproducir al menos un aminoácido, tal como *L*-triptófano, aunque también produce *L*-fenilalanina y bencilglicina, a distintas concentraciones, en función de la fase de crecimiento del microorganismo.

Dicha cepa se seleccionó a partir de una amplia colección de microorganismos aislados de distintas fuentes (suelos y aguas de distinta naturaleza), procedentes de la colección de aislados de la empresa Bio-Iliberis Research & Development, S.L. Se ensayaron diversos microorganismos de dicha colección y se seleccionaron aquellos microorganismos que poseían el mayor número de características relacionadas con la estimulación de la respuesta sistémica en plantas, la promoción del crecimiento vegetal y la solubilización de fosfatos y hierro; en concreto, para la selección de dichos microorganismos se consideraron, como características de mayor relevancia, la capacidad del microorganismo de inducir la producción de compuestos que inducen resistencia sistémica en plantas, por ejemplo, frente a estreses ambientales y/o frente a agentes fitopatógenos (e.g., hongos fitopatógenos, etc.), la capacidad del microorganismo de inducir la producción de compuestos estimuladores del crecimiento de las plantas, por ejemplo, la producción de precursores de fitohormonas, y la capacidad del microorganismo de solubilizar fosfatos insolubles y hierro. Los microorganismos ensayados se crecieron en distintos medios sólidos como proceso de selección de las características anteriormente citadas [Ejemplo 1].

Como resultado del proceso arriba indicado, se seleccionó una cepa de *P. fluorescens* parental que presentaba las siguientes características: (i) induce la producción de compuestos que inducen resistencia sistémica en plantas; (ii) induce la producción de compuestos estimuladores del crecimiento de las plantas; y (iii) solubiliza fosfatos y hierro. A partir de dicha cepa parental de *P. fluorescens* se han generado mutantes por mutagénesis química que, además de las características de la cepa parental, sobreproducen aminoácidos.

De este modo, el microorganismo proporcionado por esta invención contribuye no solo a disminuir el uso de compuestos fitosanitarios, por ejemplo, fungicidas (debido a la capacidad para inducir la producción de compuestos que inducen una respuesta sistémica en la planta que incrementa la resistencia frente a hongos fitopatógenos en el suelo rizosférico), así como a estimular el crecimiento de las plantas (debido a la capacidad de producir compuestos precursores de fitohormonas así como aminoácidos que facilitan la alimentación orgánica de las plantas y

proporcionan una fuente de nitrógeno orgánico asimilable), sino que, además, puede contribuir a evitar los problemas medioambientales asociados con el uso frecuente de fertilizantes a base de piedra fosfórica debido a que dicho microorganismo tiene la capacidad de solubilizar fosfato y hierro.

5 A continuación, se describirá en detalle el microorganismo objeto de la invención junto con los distintos aspectos inventivos derivados del mismo.

1. Microorganismo de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un microorganismo de la especie
10 *Pseudomonas fluorescens*, identificado como *P. fluorescens* BIRD-5, depositado el 20 de enero de 2011 en la CECT con el número de acceso CECT 7851. Dicho microorganismo presenta las siguientes características:

- a) induce la producción de compuestos que inducen resistencia sistémica en plantas;
- 15 b) induce la producción de compuestos estimuladores del crecimiento de las plantas; y
- c) solubiliza fosfatos insolubles y hierro.

Adicionalmente, dicho microorganismo [*P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851)]
sobreproduce, al menos, un aminoácido, en concreto, *L*-triptófano, aunque también
20 produce *L*-fenilalanina y N-bencilglicina, a distintas concentraciones, en función de la fase de crecimiento del microorganismo.

Los mutantes de dicho microorganismo que mantienen dichas características
a)-c) arriba indicadas, forman parte también de la presente invención. En una
realización particular, dichos mutantes, además, sobreproducen al menos un
25 aminoácido, preferentemente, un *L*-aminoácido, tal como un aminoácido seleccionado del grupo formado por *L*-triptófano, *L*-fenilalanina, *L*-valina, N-bencilglicina, y cualquier combinación de los mismos.

Por tanto, en una realización particular, el microorganismo de la invención, a)
induce la producción de compuestos que inducen resistencia sistémica en plantas, por
30 ejemplo, frente a estreses de naturaleza ambiental y/o frente a agentes fitopatógenos (e.g., hongos fitopatógenos, etc.); b) induce la producción de compuestos estimuladores del crecimiento de las plantas, por ejemplo, precursores de fitohormonas, etc.; y c) solubiliza fosfatos y hierro, tales como, por ejemplo, fosfatos insolubles y hierro presentes en el suelo, en roca fosfórica, etc. En otra realización
35 particular, dicho microorganismo de la invención es capaz, además, de sobreproducir

al menos un aminoácido, preferentemente, un *L*-aminoácido, tal como un aminoácido seleccionado del grupo formado por *L*-triptófano, *L*-fenilalanina, *L*-valina, N-bencilglicina, y cualquier combinación de los mismos.

Bajo el término “microorganismo de la invención” se incluye tanto dicho
5 microorganismo *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851), el cual presenta las siguientes características:

- a) induce la producción de compuestos que inducen resistencia sistémica en plantas;
- b) induce la producción de compuestos estimuladores del crecimiento de
10 las plantas; y
- c) solubiliza fosfatos insolubles y hierro.

Ventajosamente, dicho microorganismo tiene, además, la capacidad de sobreproducir al menos un aminoácido, preferentemente, un *L*-aminoácido, tal como un aminoácido seleccionado del grupo formado por *L*-triptófano, *L*-fenilalanina, *L*-
15 valina, N-bencilglicina, y cualquier combinación de los mismos. Los mutantes de dicho microorganismo *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) que mantienen dichas características caen también dentro de la definición de “microorganismo de la invención”.

Tal como aquí se utiliza, la expresión “compuestos que inducen la resistencia sistémica en plantas”, hace referencia a aquellos compuestos, producidos por la
20 planta, que activan las defensas de las plantas y las hacen más resistentes frente a estreses de naturaleza ambiental, por ejemplo, la acción de inclemencias climáticas o atmosféricas (e.g., condiciones climáticas adversas, los cambios de temperatura, condiciones de desecación o estrés hídrico, salinidad, etc.) y/o frente a agentes
25 fitopatógenos, por ejemplo, hongos fitopatógenos, etc.; para ello, el microorganismo produce compuestos que inducen la producción, por parte de la planta, de compuestos que inducen la resistencia sistémica de las plantas frente a estreses ambientales (abióticos), tales como, por ejemplo, el ácido salicílico y sus ésteres, por ejemplo, salicilato de metilo, etc., el ácido jasmónico y sus ésteres, etc.; compuestos conocidos
30 como elicitadores de la respuesta de resistencia sistémica en plantas [Hessmann et al., Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemical. (1994). Annual Review Phytopathology 32,439] y/o compuestos que inducen la producción, por parte de la planta, de compuestos que inducen la resistencia sistémica de las plantas frente a agentes fitopatógenos, es decir, compuestos capaces de paliar, mejorar,
35 estabilizar, impedir, retardar o retrasar la progresión de estadios de desarrollo de un

agente fitopatógeno en la planta y, obtener, de este modo, unos resultados beneficiosos o deseados; al igual que en el caso de la respuesta sistémica frente a estreses abióticos, el ácido salicílico y sus ésteres, así como el ácido jasmónico y sus ésteres, etc., favorecen los mecanismos de resistencia contra agentes fitopatógenos; asimismo, el ácido benzo(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotioico también induce resistencia a enfermedades producidas por agentes fitopatógenos en plantas [Fiedrich et al., A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. (1996). The Plant Journal 10,16]. La capacidad de un microorganismo de inducir la producción de compuestos que inducen resistencia sistémica en plantas frente a estreses ambientales puede ser determinada por cualquier método convencional, por ejemplo, inoculando un cultivo de dicho microorganismo sobre la planta sometida a un estrés ambiental (abiótico) y determinando la producción de uno o más compuestos que inducen resistencia sistémica en plantas frente a dicho estrés ambiental, por ejemplo, ácido salicílico o uno de sus ésteres, ácido jasmónico o uno de sus ésteres, etc. [Ejemplo 17]. La capacidad de un microorganismo de inducir la producción de compuestos que inducen resistencia sistémica en plantas frente a agentes fitopatógenos puede ser determinada por cualquier método convencional, por ejemplo, sembrando un cultivo de dicho agente fitopatógeno en una placa Petri que contiene medio adecuado para el crecimiento de dicho agente fitopatógeno y añadiendo un cultivo del microorganismo a estudiar y determinar el efecto del microorganismo sobre el crecimiento del agente fitopatógeno [Ejemplo 14].

El término “agente fitopatógeno”, tal como aquí se utiliza, incluye a cualquier organismo que causa enfermedades en las plantas por medio de alteraciones en el metabolismo celular causado por la secreción de enzimas, toxinas, fitorreguladores y otras sustancias, y, además, por la absorción de nutrientes de la célula para su propio crecimiento. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de tales agentes fitopatógenos incluyen nematodos, bacterias, tales como, por ejemplo, *Pseudomonas syringae* (varios patovares), *Xanthomonas campestris*, *Erwinia* sp., etc., virus, tales como, por ejemplo, virus del mosaico del tabaco, virus del bronceado del tomate, virus del rizado amarillo del tomate, etc., hongos, tales como, por ejemplo, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium fulvum*, *Phytium* sp., *Phytophthora* sp., etc.

La expresión “compuestos estimuladores (o promotores) del crecimiento de las plantas”, tal como aquí se utiliza, hace referencia a aquellos compuestos, producidos por la planta, que facilitan el desarrollo del sistema radicular de las plantas, la elongación de los tallos, la floración, etc.; para ello, el microorganismo produce

compuestos que inducen la producción, por parte de la planta, de tales compuestos que estimulan o promueven el crecimiento de las plantas, por ejemplo, fitohormonas, fuentes de nitrógeno (e.g., aminoácidos, etc.), etc. La capacidad de un microorganismo de producir compuestos estimuladores (o promotores) del crecimiento de las plantas puede ser determinada mediante cualquier método convencional, por ejemplo, mediante un ensayo de estimulación del crecimiento temprano de plantas. Brevemente, dicho ensayo, que puede realizarse en invernadero, comprende sembrar semillas (e.g., maíz, cebada, césped, AvexIII (mezcla de pratenses), etc.) en una mezcla homogénea compuesta por suelo agrícola mezclado con arena (sílice) y un cultivo del microorganismo, preferentemente adherido a un soporte sólido, a ensayar (en una densidad de población adecuada), y, a continuación, incubar, bajo condiciones que permiten la germinación de las semillas (e.g., 20°C en oscuridad) y determinar el porcentaje de germinación de semillas y/o la longitud del tallo a la semana de siembra [Ejemplos 8-11]. El experto en la materia entenderá que pueden realizarse otros ensayos que sirvan para evaluar la estimulación o promoción del crecimiento de una planta tales como, por ejemplo, los ensayos mencionados en la solicitud de patente internacional WO 2011/147826, la cual se incorpora aquí en su totalidad por referencia.

La expresión “solubiliza fosfatos insolubles y hierro”, tal como aquí se utiliza, se refiere a que el microorganismo es capaz de (i) solubilizar fosfato insoluble, tal como el fosfato presente, por ejemplo, en suelos o en roca fosfórica [e.g., fosfato cálcico dibásico ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), fosfato cálcico tribásico ($\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, etc.], y utilizarlo como fuente de fósforo para la planta, y, además, de (ii) solubilizar hierro insoluble presente, por ejemplo, en suelos [e.g., óxidos de hierro, etc.]; la forma más frecuente por la que los microorganismos solubilizan hierro es mediante la producción de sideróforos con propiedades quelantes de hierro; dichos sideróforos, en presencia de hierro, forman unos complejos sideróforo-hierro que son reasimilados por el microorganismo de la invención y las plantas para liberar el hierro en el interior celular. Ventajosamente, el microorganismo de la invención solubiliza fosfatos insolubles y hierro y utiliza las formas solubilizadas como nutrientes. La capacidad de un microorganismo de solubilizar fosfato puede ser determinada por cualquier método convencional, por ejemplo, inoculando un cultivo de dicho microorganismo en un medio que contiene uno o más fosfatos insolubles como única fuente de fósforo (e.g., fosfato tricálcico, etc.), incubando bajo condiciones apropiadas y contando los microorganismos viables, tal como se describe en el Ejemplo 1 y en los Ejemplos 1-3

de la solicitud de patente internacional WO2010/018210; bajo estas condiciones, el mantenimiento, o un aumento, de la densidad de la población bacteriana es indicativo de que dichos microorganismos solubilizan dicho(s) fosfato(s) insolubles y lo(s) utiliza(n) como fuente de fósforo [Rodríguez and Fraga. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion (1999) *Biotechnology Advances* 17:319]. Otro ensayo que permite dilucidar si un microorganismo es capaz de solubilizar fosfatos insolubles, comprende su siembra en medios sólidos especializados para ese fin, en los que el microorganismo genera un microambiente debido a la producción de ácidos orgánicos y la liberación de otras enzimas al medio externo, que se traduce en un halo visible en el medio [Nautiyal. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms (1999) *Microbiology Letters* 170:265]. Asimismo, la capacidad de un microorganismo de solubilizar hierro puede ser determinada por cualquier método convencional, por ejemplo, inoculando un cultivo de dicho microorganismo en un medio que contiene hierro insoluble como única fuente de hierro (e.g., tricloruro férrico, etc.), incubando bajo condiciones apropiadas y contando los microorganismos viables, tal como se describe en el Ejemplo 1 así como en el Ejemplo 4 de la solicitud de patente internacional WO2010/018210.

La expresión “sobreproduce un aminoácido”, tal como aquí se utiliza, aplicada a un microorganismo, se refiere a aquel microorganismo que es capaz de producir una cantidad de un aminoácido determinado mayor que la que produciría, en las mismas condiciones, una cepa representativa de *P. fluorescens* wt. En una realización particular, se lleva a cabo un ensayo de nutrición cruzada en la que se ponen en contacto los caldos filtrados de cultivos puros de la cepa de *P. fluorescens* (wt) y del microorganismo cuya capacidad sobreproductora de aminoácidos se desea estudiar, con microorganismos auxótrofos para un determinado aminoácido, por ejemplo *L*-triptófano; si, tras su incubación durante, al menos 24 a 48 h, se produce una tasa de crecimiento mayor en el caldo procedente del filtrado del cultivo puro del microorganismo a estudiar, entonces se considera que dicho microorganismo sobreproduce el aminoácido en cuestión. En una realización particular, el microorganismo de la invención sobreproduce al menos un aminoácido, preferentemente, un *L*-aminoácido, tal como un aminoácido seleccionado del grupo formado por *L*-triptófano, *L*-fenilalanina, *L*-valina, *N*-bencilglicina, y cualquier combinación de los mismos. La capacidad de los microorganismos sobreproductores de aminoácidos de sobreproducir aminoácidos posibilita que, si dicho microorganismo es administrado a una planta, los aminoácidos sobreproducidos por dicho

microorganismo evitan el gasto energético que le supone a la planta sintetizar los mismos a partir de los compuestos nitrogenados inorgánicos del suelo. Además, en el caso del *L*-triptófano, se le proporciona a la planta un precursor del ácido indolacético (IAA), un compuesto que promueve el desarrollo radicular; en el caso de la *L*-valina se le proporciona a la planta un precursor de auxinas; en el caso de la *L*-fenilalanina se le proporciona a la planta un compuesto que promueve la germinación de las semillas, en el caso de la *N*-bencilglicina se le proporciona a la planta un compuesto nitrogenado; y en el caso de la *L*-valina se le proporciona a la planta un precursor de auxinas. Adicionalmente, la absorción de aminoácidos por la planta, proporciona a la planta una mayor resistencia a estreses abióticos como, por ejemplo, condiciones climáticas adversas, los cambios de temperatura y condiciones de desecación o estrés hídrico. La capacidad de un microorganismo de sobreproducir un aminoácido determinado se puede determinar por cualquier método convencional, por ejemplo, inoculando un cultivo de dicho microorganismo en un medio que contiene un análogo del aminoácido en cuestión, por ejemplo, 5-fluoro-*D,L*-triptófano, *p*-fluoro-*D,L*-fenilalanina, *L*-norvalina, etc., e incubando bajo condiciones apropiadas tal como se describe en los Ejemplos 2 a 7, y, a continuación, comparar la cantidad de aminoácido producido por los microorganismos con la cantidad de aminoácido producido por una cepa de *P. fluorescens* de referencia. La producción de aminoácidos se puede determinar por métodos convencionales, por ejemplo, mediante métodos colorimétricos convencionales, tales como métodos espectrofotométricos con cloruro férrico, dinitrofluorobenceno, fenilisotiocianato, fluorescamina, ninhidrina, etc. Asimismo, se pueden determinar los aminoácidos, una vez derivatizados, tras su separación por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) [Rokibul Islam Khan et al., Quantitative determination of aromatic amino acids and related compounds in rumen fluid by high-performance liquid chromatography (1998) Journal of Chromatography B 710:17]. Otra manera de comprobar la producción de aminoácidos se basa en métodos microbiológicos, realizando ensayos de nutrición cruzada en los que el microorganismo a ensayar como productor de un aminoácido se inocula en un medio mínimo con los nutrientes y las condiciones necesarias para su crecimiento. Una vez obtenido un cultivo de dicho microorganismo, se filtra el medio en condiciones estériles con filtros de 0,22 µm de tamaño de poro para eliminar las células y se reinocula con un microorganismo auxótrofo para el aminoácido correspondiente. Bajo estas condiciones, el aumento de la densidad bacteriana del microorganismo auxótrofo es indicador de la presencia de aminoácido (Riccardi et al., Production of amino acids by

analog-resistant mutants of the Cyanobacterium *Spirulina platensis* (1981) *Journal of Bacteriology* 147:1002). Los Ejemplos 2-7, que acompañan a la presente descripción, ilustran la obtención y aislamiento de microorganismos sobreproductores de distintos aminoácidos (triptófano, fenilalanina y valina); dichos microorganismos pueden ser
5 mutantes de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) o bien de la cepa parental de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) y conservan las características de dicho microorganismo, y, además, sobreproducen aminoácidos.

Como entiende el experto en la materia, dentro del microorganismo de la invención, también están contemplados microorganismos mutantes de *P. fluorescens*
10 BIRD-5 (CECT 7851) que, además de mantener las características propias de dicho microorganismo [a)-c)], ventajosamente, sobreproducen al menos un aminoácido, preferentemente, un *L*-aminoácido, tal como un aminoácido seleccionado del grupo formado por *L*-triptófano, *L*-fenilalanina, *L*-valina, *N*-bencilglicina, y cualquier combinación de los mismos.

En una realización particular, el microorganismo de la invención es *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851); dicho microorganismo: a) induce la producción de compuestos que inducen resistencia sistémica en plantas; b) induce la producción de compuestos estimuladores del crecimiento de las plantas; y c) solubiliza fosfatos y hierro; y, además, d) sobreproduce *L*-triptófano [Ejemplos 2 y 3], aunque también
15 produce *L*-fenilalanina y bencilglicina, a distintas concentraciones, en función de la fase de crecimiento del microorganismo [Ejemplo 16].

En otra realización particular, el microorganismo de la invención es un mutante de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851). Tal como aquí se utiliza, el término “mutante” incluye a cualquier microorganismo resultante de una mutación o modificación en el
25 ADN de un organismo que da como resultado un carácter (fenotipo) que no se encuentra en la cepa silvestre (“wild type” o “wt”) que mantiene las características de la cepa silvestre: a) inducir la producción de compuestos que inducen resistencia sistémica en plantas; b) inducir la producción de compuestos estimuladores del crecimiento de las plantas; y c) solubilizar fosfatos y hierro. En una realización
30 concreta, el microorganismo de la invención es un mutante de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) que mantiene las características a)-c) previamente mencionadas. En otra realización concreta, el microorganismo de la invención es un mutante de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) que, además de mantener las características a)-c) previamente mencionadas, sobreproducen al menos un aminoácido, preferentemente,
35 un *L*-aminoácido, tal como un aminoácido seleccionado del grupo formado por *L*-

triptófano, *L*-fenilalanina, *L*-valina, N-bencilglicina, y cualquier combinación de los mismos. En una realización particular, dicho mutante sobreproduce *L*-triptófano; en otra realización particular, dicho mutante sobreproduce *L*-fenilalanina; en otra realización particular, dicho mutante sobreproduce N-bencilglicina; y, en otra
5 realización particular, dicho mutante sobreproduce *L*-valina.

Un cultivo biológicamente puro de un microorganismo de la invención constituye un aspecto adicional de la presente invención. En la presente invención se entiende por “cultivo biológicamente puro” a aquel cultivo en el que el microorganismo de la invención se encuentra en una proporción igual o superior al 99,999% respecto al
10 resto de posibles microorganismos presentes en el cultivo.

2. Aplicaciones

Tal como se ha explicado previamente en el apartado anterior, el microorganismo de la invención *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851), así como sus
15 mutantes, es capaz de producir compuestos que inducen la resistencia sistémica en plantas frente a un estrés ambiental y/o frente a un agente fitopatógeno, así como compuestos estimuladores del crecimiento de las plantas, y, además, es capaz de solubilizar fosfatos insolubles y hierro presentes en el suelo y de utilizar las formas solubilizadas como nutrientes. Además, el microorganismo de la invención,
20 ventajosamente, tiene es capaz de reproducir al menos un aminoácido, preferentemente, un *L*-aminoácido, tal como un aminoácido seleccionado del grupo formado por *L*-triptófano, *L*-fenilalanina, *L*-valina, N-bencilglicina, y cualquier combinación de los mismos, reforzando de este modo su capacidad de promover el crecimiento de las plantas y mejorando la nutrición orgánica de las mismas.

Por lo tanto, el microorganismo de la invención puede utilizarse en numerosas
25 aplicaciones; a modo ilustrativo, no limitativo, el microorganismo de la invención puede utilizarse para mantener o restablecer el estado general de una planta tras una situación de estrés tanto abiótico (ambiental) como biótico, o para proteger a una planta del ataque de un agente fitopatógeno, o para estimular el crecimiento de una
30 planta, incluyendo la estimulación de la germinación de semillas, la estimulación del desarrollo radicular de las plantas, y, en particular, la estimulación del desarrollo de las plantas en los primeros estadios de crecimiento, o para solubilizar fosfatos insolubles y hierro presentes en sustratos sólidos como, por ejemplo, suelo, roca, etc.,

Por tanto, las distintas aplicaciones del microorganismo de la invención, debido a sus múltiples capacidades, constituyen aspectos inventivos adicionales de la presente invención que serán descritos a continuación.

5 2.1 Fertilizante suplementado de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un fertilizante suplementado, en adelante "fertilizante suplementado de la invención", que comprende un fertilizante y un microorganismo de la invención. Prácticamente cualquier fertilizante, sólido o incluso líquido, puede ser utilizado para la puesta en práctica de la presente invención.

10 Ejemplos ilustrativos no limitativos, de dichos fertilizantes sólidos incluyen fertilizantes sólidos de tipo NPK, etc. Por otra parte, cualquier fertilizante líquido con un pH comprendido entre 4 y 10 puede ser utilizado para la puesta en práctica de esta invención; ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichos fertilizantes líquidos incluyen fertilizantes a base de ácidos fúlvicos, fertilizantes líquidos con distinta composición
15 NPK, tales como las mezclas 16:2:4, 20:5:0, etc., o diversos tipos de fertilizantes en gotas con composición NPK de 8:9:9, 16:4:4, etc. El microorganismo de la invención puede añadirse tal cual al fertilizante o, alternativa y preferentemente, adherido a un soporte sólido, es decir, en forma de un soporte sólido activo.

El fertilizante suplementado aquí descrito puede contener, si se desea, otros
20 ingredientes o constituyentes empleados habitualmente en las composiciones agrícolas, tales como, pero no limitados a, disolventes, agentes activos o reguladores de pH, etc., siempre y cuando todos ellos permitan y no perjudiquen ni comprometan la viabilidad del microorganismo de la invención. Dichos ingredientes o constituyentes empleados habitualmente en las composiciones agrícolas son, en general, conocidos
25 por los expertos en la materia.

El fertilizante suplementado de la invención puede obtenerse por métodos convencionales mezclando dicho fertilizante con un cultivo que contiene el microorganismo de la invención; dicha mezcla se realiza en la proporción adecuada en proporción peso:volumen (p:v) ampliamente variable, dependiendo entre otros factores
30 de las unidades formadoras de colonia (ufc) presentes en el cultivo y de las ufc por unidad de medida (g o mL) de fertilizante que se desean obtener en el fertilizante suplementado de la invención; no obstante, en una realización particular, dicha relación [fertilizante]:[cultivo conteniendo el microorganismo de la invención] está comprendida entre 1:0,01 y 1:1 (p:v); en una realización concreta, se mezclan entre
35 0,01 y 1 mL de cultivo que contiene 10^7 ufc del microorganismo de la invención con 1 g

de fertilizante sólido; en otra realización concreta, se mezcla 1 mL de cultivo que contiene 10^7 ufc del microorganismo de la invención con 1 mL de fertilizante líquido con un pH comprendido entre 2 y 10.

Asimismo, si se desea, para facilitar la adhesión del microorganismo de la invención al fertilizante, típicamente un fertilizante sólido, puede utilizarse un adhesivo apropiado. Prácticamente cualquier adhesivo agrícolamente aceptable puede ser utilizado; ejemplos ilustrativos no limitativos de dichos adhesivos incluyen goma arábica, polímeros a base de alginato (e.g., alginato cálcico, etc.), etc. En este caso, la cantidad de adhesivo a emplear puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, dicho adhesivo está presente en el fertilizante suplementado de la invención, en particular, en un fertilizante sólido suplementado con microorganismos de la invención, proporcionado por esta invención, en una proporción igual o inferior al 1% en peso del total. La presencia del microorganismo de la invención en el fertilizante contribuye no sólo a inducir resistencia sistémica frente a patógenos sino que facilita la quelación del hierro del entorno, elemento necesario para los agentes fitopatógenos. Además, el microorganismo de la invención ayuda a reducir el aporte de fósforo a los suelos ya que solubiliza fosfato insoluble y posibilita su asimilación por la planta. De este modo, el fertilizante suplementado de la invención juega un doble papel en el desarrollo de las plantas, por una parte, facilita nutrientes y estimula el crecimiento de las plantas, y, por otra parte, previene el efecto negativo de agentes fitopatógenos (e.g., hongos, bacterias, etc.) para las plantas.

2.2 Soporte sólido activo de la invención

Como entiende el experto en la materia, para la aplicación del microorganismo de la invención y su interacción con las plantas, resulta ventajosa la fijación del mismo sobre soportes sólidos apropiados para su aplicación y, adicionalmente, para favorecer la proliferación de dicho microorganismo en la rizosfera de las plantas. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un soporte sólido activo, en adelante “soporte sólido activo de la invención”, que comprende un soporte sólido agrícolamente aceptable y un microorganismo de la invención.

Dicho soporte sólido es un soporte sólido inerte para los microorganismos de la invención y las plantas y, ventajosamente, debe poseer una elevada superficie específica con el fin de que pueda disponer de una elevada capacidad de adsorción de los microorganismos de la invención [Busscher and Weerkamp. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrate (1999) FEMS Microbiology

Letters 46:465]. Prácticamente cualquier soporte sólido que cumpla dichas condiciones puede ser utilizado en la presente invención; ejemplos ilustrativos no limitativos de soportes sólidos que pueden ser utilizados incluyen arcilla, e.g., bentonita, sepiolita, etc.; un residuo vegetal, e.g., polvo de corcho, etc.; celulosa; talco, etc., y sus mezclas, ya que adsorben, al menos, 10^5 unidades formadoras de colonia (ufc) por g de soporte sólido, típicamente, al menos, 10^6 ufc/g, ventajosamente, al menos, 10^7 ufc/g, preferentemente, al menos, 10^8 ufc/g, más preferentemente, al menos, 10^9 ufc/g, aún más preferentemente, al menos 10^{10} ufc/g de soporte sólido.

Dicho soporte sólido activo de la invención puede obtenerse por métodos convencionales mezclando dicho soporte sólido con un cultivo puro que contiene el microorganismo de la invención; dicha mezcla se realiza en la proporción adecuada en función de las ufc que se desea estén contenidas en 1 g de soporte sólido. En una realización particular, dicho cultivo comprende, al menos, 10^3 ufc/g, típicamente, al menos, 10^5 ufc/g, ventajosamente, al menos, 10^7 ufc/g, preferentemente, al menos, 10^9 ufc/g. En general, la mezcla del soporte sólido con el cultivo que contiene el microorganismo de la invención se puede realizar en base a una proporción peso:volumen (p:v) ampliamente variable, dependiendo entre otros factores de las ufc/mL presentes en el cultivo y de las ufc por gramo de soporte sólido que se desean obtener en el soporte sólido activo de la invención; no obstante, en una realización particular, dicha relación [soporte sólido]:[cultivo conteniendo el microorganismo de la invención] está comprendida entre 1:0,01 y 1:1 (p:v); en una realización concreta, se mezcla 1 mL de cultivo que contiene 10^7 ufc del microorganismo de la invención con 1 g de soporte sólido.

2.3 Semilla suplementada de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con una semilla suplementada, en adelante "semilla suplementada de la invención", que comprende una semilla y el microorganismo de la invención, opcionalmente adherido a un soporte sólido. Dicha semilla puede ser una semilla de cualquier planta con interés agronómico, forestal, alimenticio (para alimentación humana o animal), ornamental, energético, etc. El microorganismo de la invención puede recubrir total o parcialmente la semilla.

Dicha semilla suplementada de la invención puede obtenerse por métodos convencionales; a modo ilustrativo, puede obtenerse sumergiendo la semilla en una suspensión o cultivo puro del microorganismo de la invención, o, alternativamente, pulverizando dicha suspensión o cultivo sobre las semillas. Otros métodos

comprenden la mezcla de la semilla y el microorganismo de la invención previamente incorporado a un soporte sólido inerte que facilite la adhesión del microorganismo de la invención a dicha semilla. En una realización particular, la suspensión o cultivo puro del microorganismo de la invención, contiene, al menos, 10^5 ufc/mL. En otra
5 realización particular, la relación para obtener la semilla suplementada de la invención está comprendida entre 1:0,01 y 1:1 p/v; en una realización concreta se mezcla 1 mL de cultivo puro de microorganismo de la invención conteniendo, al menos, 10^5 ufc/mL del microorganismo de la invención, con la semilla.

Además, para mejorar la adhesión de los microorganismos de la invención a la
10 semilla puede utilizarse un adhesivo de tipo agrícola que contenga una concentración adecuada de dichos microorganismos, como un gel o polímero de tipo orgánico, como goma arábiga, polímeros de alginato, etc. Por tanto, en una realización particular, la semilla suplementada de la invención está soportada, unida o adherida a un adhesivo, tal como, un adhesivo agrícolamente aceptable, por ejemplo, un polímero orgánico
15 inerte para el microorganismo de la invención (e.g., goma arábiga, alginato, etc.).

2.4 Cepellón suplementado de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un cepellón suplementado, en adelante "cepellón suplementado de la invención", que comprende un cepellón y el
20 microorganismo de la invención, opcionalmente adherido a un soporte sólido. Dicho cepellón puede ser un cepellón de cualquier planta con interés agronómico, forestal, alimenticio (para alimentación humana o animal), ornamental, energético, etc. El microorganismo de la invención puede recubrir total o parcialmente el cepellón.

El cepellón suplementado de la invención puede obtenerse por métodos
25 convencionales; a modo ilustrativo, puede obtenerse sumergiendo el cepellón en una suspensión o cultivo puro del microorganismo de la invención, o, alternativamente, pulverizando dicha suspensión o cultivo sobre el cepellón. Otros métodos comprenden la mezcla del cepellón con el microorganismo de la invención previamente incorporado a un soporte sólido inerte que facilite la adhesión del microorganismo de la invención a
30 dicho cepellón. En una realización particular, la suspensión o cultivo puro del microorganismo de la invención, contiene, al menos, 10^5 ufc/mL. En una realización particular, la relación para obtener el cepellón suplementado de la invención está comprendida entre 1:0,01 y 1:1 p/v, en una realización concreta se mezcla 1 mL de cultivo puro conteniendo, al menos, 10^5 ufc/mL del microorganismo de la invención.

Además, para mejorar la adhesión de los microorganismos de la invención al cepellón puede utilizarse un adhesivo de tipo agrícola que contenga una concentración adecuada de dichos microorganismos, como un gel o polímero de tipo orgánico, como goma arábiga, polímeros de alginato, etc.

5

2.5 Caldo de cultivo de la invención

Como se ha indicado previamente, la presente invención se relaciona con *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) y sus mutantes, tal como se han definido previamente, un microorganismo de la especie *P. fluorescens* con capacidad de producir tanto compuestos que estimulan la inducción de resistencia sistémica en plantas, por ejemplo, mediante acumulación de ácido salicílico o sus ésteres, o de ácido jasmónico o sus ésteres, etc., en respuesta a un estrés ambiental y/o frente a un agente fitopatógeno, como compuestos estimuladores del crecimiento de las plantas, así como con capacidad para solubilizar fosfatos insolubles y hierro; ventajosamente, dicho microorganismo y sus mutantes tienen la capacidad de reproducir un aminoácido, preferentemente un *L*-aminoácido, tal como un aminoácido seleccionado del grupo formado por *L*-triptófano, *L*-fenilalanina, *L*-valina, *N*-bencilglicina y cualquier combinación de los mismos. Estas características permiten que tanto el microorganismo de la invención como los productos derivados de su metabolismo, tengan múltiples aplicaciones en el campo de la Agricultura, como, por ejemplo, su uso como fertilizante y como agente para el control biológico de agentes fitopatógenos, por ejemplo, hongos o bacterias fitopatógenos.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un caldo de cultivo, en adelante "caldo de cultivo de la invención", obtenible mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

- a) cultivar el microorganismo de la invención en un medio de cultivo mínimo que comprende una fuente de carbono susceptible de ser utilizada por el microorganismo de la invención,
- b) incubar la suspensión bacteriana resultante de la etapa a) a una temperatura comprendida entre 15°C y 40°C hasta alcanzar una densidad celular igual o superior a 10^9 ufc/mL; y
- c) separar el caldo de cultivo, y, opcionalmente, si se desea,
- d) filtrar dicho caldo de cultivo a través de un filtro estéril con un diámetro de poro de 0,22 μ m.

Como entenderá el experto en la materia, tras la puesta en práctica del procedimiento mencionado previamente se obtiene un caldo de cultivo que comprende los compuestos producidos por el microorganismo de la invención como consecuencia de su metabolismo, es decir, compuestos inductores de resistencia sistémica en respuesta a un estrés ambiental o contra agentes fitopatógenos, compuestos estimuladores del crecimiento de las plantas, compuestos capaces de solubilizar fosfato y hierro, y, opcional y preferentemente, aminoácidos.

Para la obtención del caldo de cultivo de la invención, el procedimiento comprende en una primera etapa [etapa a)], cultivar el microorganismo de la invención en un medio de cultivo mínimo que comprende una fuente de carbono susceptible de ser utilizada por el microorganismo de la invención; en una realización particular, dicha fuente de carbono susceptible de ser utilizada por el microorganismo de la invención comprende glucosa. Prácticamente, cualquier medio de cultivo apropiado para el desarrollo y crecimiento de *P. fluorescens* puede ser usado en la puesta en práctica de dicho procedimiento. Adicionalmente, si se desea, el medio de cultivo comprende otros medios específicos para conseguir la producción del metabolito deseado. Dichos medios de cultivo son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y prepararlos constituye práctica rutinaria para el experto en la materia.

En una segunda etapa [etapa b)], el procedimiento comprende incubar la suspensión bacteriana resultante de la etapa a) anterior a una temperatura comprendida entre 15°C y 40°C hasta alcanzar una densidad celular igual o superior a 10⁹ ufc/mL. Las condiciones para el cultivo y crecimiento de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) son condiciones convencionales, conocidas por los expertos en la materia, para el desarrollo y crecimiento de dicha cepa y comprenden, por ejemplo, la incubación del medio de cultivo, previamente inoculado, en un agitador orbital con agitación, a una temperatura comprendida entre 15°C y 40°C, durante el periodo de tiempo suficiente para alcanzar una densidad celular igual o superior a 10⁹ ufc/mL. En el Ejemplo 1 se describen unas condiciones y unos medios de cultivo apropiados para el desarrollo y crecimiento de *P. fluorescens*.

En una tercera etapa [etapa c)], se procede a separar el caldo de cultivo de las células bacterianas. Las células bacterianas pueden retirarse por cualquier método apropiado de separación sólido-líquido, por ejemplo, mediante decantación, filtración, centrifugación, etc.

Finalmente, en una cuarta etapa [etapa d)], si se desea, el caldo de cultivo obtenido se filtra a través de un filtro estéril con un diámetro de poro de 0,22 µm.

Asimismo, si el caldo de cultivo no va a utilizarse de manera inmediata, puede conservarse en frío, por ejemplo, a 4°C, a -20°C o a -80°C hasta su uso.

El caldo de cultivo de la invención comprende, como entenderá el experto en la materia, compuestos producidos por el microorganismo de la invención como consecuencia de su metabolismo, por ejemplo, compuestos inductores de resistencia sistémica en respuesta a un estrés ambiental o contra agentes fitopatógenos, compuestos estimuladores del crecimiento de las plantas, y compuestos capaces de solubilizar fosfato y hierro, y, opcional aunque preferentemente, aminoácidos.

10 2.6 Procedimiento para estimular el crecimiento de una planta

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para estimular el crecimiento de una planta, en adelante "procedimiento para estimular el crecimiento de la invención", que comprende aplicar una cantidad eficaz de un microorganismo de la invención, o de un fertilizante suplementado de la invención, o de un soporte sólido activo de la invención, o de un caldo de cultivo de la invención, a la zona de influencia de la raíz (radicular) de dicha planta, o, alternativamente, sembrar una semilla de dicha planta suplementada con un microorganismo de la invención.

Prácticamente cualquier planta puede ser tratada según este procedimiento para estimular su crecimiento, en particular, su crecimiento en etapas tempranas; a modo ilustrativo, no limitativo, dicha planta puede ser una planta de interés agronómico, incluyendo plantas de interés en alimentación humana o animal, plantas de interés ornamental, plantas de interés forestal, plantas de interés energético, etc., tales como, por ejemplo, avena, cebada, maíz, trigo, césped, sorgo, rosales, geranios, margaritas, etc.

25 El microorganismo de la invención puede ser aplicado de distintas maneras. En una realización particular, dicho microorganismo de la invención se aplica directamente al suelo, a la zona de influencia radicular de la planta cuyo crecimiento se desea estimular, mientras que, en otra realización particular, el microorganismo de la invención se aplica adherido a un soporte sólido en la forma de un soporte sólido activo de la invención. En otra realización particular, el microorganismo de la invención se aplica junto con un fertilizante, en el área de influencia de la raíz de las plantas cuyo crecimiento se desea estimular, en la forma de un fertilizante suplementado de la invención.

Las características de dicho microorganismo de la invención, soporte sólido activo de la invención y fertilizante suplementado de la invención han sido descritas previamente y se incorporan aquí por referencia.

5 En otra realización particular, se aplica el caldo de cultivo de la invención sobre el área de influencia de la raíz de las plantas cuyo crecimiento se desea estimular. Las características de dicho caldo de cultivo de la invención han sido descritas previamente y se incorporan aquí por referencia.

10 Alternativamente, el crecimiento de una planta puede ser estimulado mediante la siembra de una semilla de dicha planta suplementada con un microorganismo de la invención (semilla suplementada de la invención); en este caso, el microorganismo de la invención, opcionalmente adherido a un adhesivo agrícolamente aceptable, se aplica sobre las semillas de la planta en cuestión recubriendo la totalidad o parte de dichas semillas de las plantas cuyo crecimiento se desea estimular, en la forma de una semilla suplementada de la invención.

15 Las características de dicha semilla suplementada de la invención han sido descritas previamente y se incorporan aquí por referencia.

20 En el sentido utilizado en esta descripción, el término “cantidad eficaz” se refiere a la dosis mínima necesaria de un determinado producto (e.g., microorganismo de la invención, fertilizante suplementado de la invención, soporte sólido activo de la invención, caldo de cultivo de la invención, etc.) para producir en la planta el efecto deseado. En el presente aspecto inventivo, el término “cantidad eficaz” hace referencia a la cantidad mínima de microorganismo (ufc/g ó ufc/mL), independientemente de que se encuentre en forma de un cultivo o de una formulación de un fertilizante o en un soporte sólido, así como a la cantidad mínima de compuestos estimuladores del crecimiento de las plantas presente en el caldo de cultivo de la invención, que es necesaria administrar para estimular o inducir el crecimiento de una planta o, lo que es lo mismo, incrementar la biomasa vegetal de dicha planta.

25 En el contexto de la presente invención se entiende por “biomasa vegetal” a la cantidad de materia orgánica contenida en una planta, es decir, a la materia orgánica que constituye tanto la parte aérea de la planta, esto es, el tallo, el tronco, las hojas, las ramas, el fruto, las inflorescencias, etc. (biomasa aérea), como la parte subterránea de la misma, es decir, las raíces, callos, tubérculos, etc. (biomasa subterránea). Con frecuencia, la “biomasa vegetal” se mide como la masa o peso seco (o “peso fresco” según interese) de la planta. Como sabe el experto en la materia, en el estado de la técnica existen múltiples procedimientos y parámetros que sirven para calcular

35

crecimiento vegetal o el incremento de biomasa, entre ellos se incluyen, sin limitar a, la tasa de crecimiento (TC= Peso final/peso inicial), la tasa de crecimiento relativo, la razón de área foliar, el área específica foliar, la proporción de hoja, la tasa de asimilación neta, la proporción del tallo, la proporción de raíz, el contenido de materia
5 seca, etc.

La cantidad eficaz de microorganismo de la invención, así como de compuestos estimuladores del crecimiento de la planta presentes en el caldo de cultivo de la invención, a aplicar a la planta o a la zona de influencia radicular de la planta cuyo crecimiento se desea estimular puede variar dentro de un amplio intervalo; no
10 obstante, en una realización particular, la cantidad de microorganismo de la invención a aplicar al suelo que rodea a la planta cuyo crecimiento se desea estimular está comprendida entre 10^3 y 10^8 ufc por gramo de suelo rizosférico. También se puede aplicar entre 1 mL y 100 mL del caldo de cultivo de la invención por metro cuadrado (m^2) de superficie o entre 1 mL y 100 mL de caldo de cultivo de la invención cuando
15 las plantas están en macetas y estas contienen 1 kg de suelo. Dichas cantidades son eficaces y puede aplicarse en una única administración o en varias administraciones. La presencia de microorganismos de la invención, así como del caldo de cultivo de la invención, favorece la germinación simultánea de las semillas, proporciona un crecimiento homogéneo de las plantas de una misma cosecha y coordina los periodos
20 de floración, de fructificación y maduración de frutos.

2.7 Procedimiento para proteger una planta frente a un agente fitopatógeno

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para proteger una planta frente a un agente fitopatógeno, mediante la inducción de resistencia
25 sistémica en la planta frente a dicho agente fitopatógeno, en adelante, "procedimiento de protección frente a un fitopatógeno de la invención", que comprende aplicar una cantidad eficaz de un microorganismo de la invención, o de un fertilizante suplementado de la invención, o de un soporte sólido activo de la invención, o de un caldo de cultivo de la invención, sobre dicha planta o sobre su área de influencia
30 radicular o rizosférica, o, alternativamente, sembrar una semilla de dicha planta suplementada con un microorganismo de la invención.

Prácticamente cualquier planta puede ser tratada según el procedimiento de protección frente a un fitopatógeno de la invención para protegerla frente a un agente fitopatógeno o frente a un ataque de un agente fitopatógeno; a modo ilustrativo, no
35 limitativo, dicha planta puede ser una planta de interés agronómico, incluyendo plantas

de interés en alimentación humana o animal, plantas de interés ornamental, plantas de interés forestal, plantas de interés energético, etc., tales como, por ejemplo, avena, cebada, maíz, trigo, césped, sorgo, rosales, geranios, margaritas, etc.

El microorganismo de la invención puede ser aplicado de distintas maneras. En una realización particular, dicho microorganismo de la invención se aplica directamente al suelo, a la zona de influencia radicular de la planta cuyo crecimiento se desea estimular, mientras que, en otra realización particular, el microorganismo de la invención se aplica adherido a un soporte sólido en la forma de un soporte sólido activo de la invención. En otra realización particular, el microorganismo de la invención se aplica junto con un fertilizante, en el área de influencia de la raíz de las plantas cuyo crecimiento se desea estimular, en la forma de un fertilizante suplementado de la invención.

Las características de dicho microorganismo de la invención, soporte sólido activo de la invención, y fertilizante suplementado de la invención, han sido descritas previamente y se incorporan aquí por referencia.

En otra realización particular, se aplica el caldo de cultivo de la invención sobre el área de influencia de la raíz de las plantas que se desean proteger frente a un agente fitopatógeno. Las características de dicho caldo de cultivo de la invención, han sido descritas previamente y se incorporan aquí por referencia.

Alternativamente, la protección de una planta frente a un agente fitopatógeno, mediante la inducción de resistencia sistémica en la planta frente a dicho agente fitopatógeno, puede alcanzarse mediante la siembra de una semilla de dicha planta suplementada con un microorganismo de la invención (semilla suplementada de la invención); en este caso, el microorganismo de la invención, opcionalmente adherido a un adhesivo agrícolamente aceptable, se aplica sobre las semillas de la planta en cuestión recubriendo la totalidad o parte de dichas semillas de las plantas cuyo crecimiento se desea estimular, en la forma de una semilla suplementada de la invención.

Las características de dicha semilla suplementada de la invención han sido descritas previamente y se incorporan aquí por referencia.

Asimismo, las características del agente fitopatógeno ya han sido descritas previamente y se incorporan aquí por referencia. En una realización particular, el agente fitopatógeno es una bacteria fitopatógena, un virus vegetal o un hongo fitopatógeno. En una realización más particular, dicho agente fitopatógeno es una bacteria fitopatógena perteneciente a los géneros *Agrobacterium*, *Corynebacterium*,

Erwinia, *Ralstonia*, *Streptomyces*, *Xanthomonas*, etc. En otra realización más particular, el agente fitopatógeno es un hongo fitopatógeno perteneciente al género *Fusarium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Pyrenophora*, etc.

Como se ha indicado previamente, en el sentido utilizado en esta descripción, el término “cantidad eficaz” se refiere a la dosis mínima de un determinado producto necesaria para producir en la planta el efecto deseado. En el presente aspecto inventivo, el término “cantidad eficaz” hace referencia a la cantidad mínima de microorganismo de la invención, independientemente de su forma de presentación (cultivo, fertilizante suplementado o soporte sólido activo), así como a la cantidad mínima de compuestos inductores de la resistencia sistémica en plantas presente en el caldo de cultivo de la invención, que es necesario administrar para paliar, mejorar, estabilizar, impedir, retardar o retrasar la los síntomas producidos por el agente fitopatógeno sobre la planta y obtener, de este modo, unos resultados beneficiosos. Dicha cantidad eficaz puede aplicarse en una única administración o en varias administraciones.

La cantidad eficaz de microorganismo de la invención, así como de compuestos inductores de la resistencia sistémica en plantas presente en el caldo de cultivo de la invención, a aplicar a la planta o a la zona de influencia radicular de la planta para protegerla, mediante la inducción de resistencia sistémica, frente a un agente fitopatógeno puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la cantidad de microorganismo de la invención a aplicar al suelo que rodea a la planta cuyo crecimiento se desea estimular está comprendida entre 10^3 y 10^8 ufc por gramo de suelo rizosférico. También se puede aplicar entre 1 mL y 100 mL del caldo de cultivo de la invención por metro cuadrado (m^2) de superficie o entre 1 mL y 100 mL de caldo de cultivo de la invención cuando las plantas están en macetas y estas contienen 1 kg de suelo. Dichas cantidades son eficaces y puede aplicarse en una única administración o en varias administraciones. La presencia de microorganismos de la invención, así como del caldo de cultivo de la invención, favorece la inducción de la resistencia sistémica en la planta frente a un agente fitopatógeno.

2.8 Procedimiento para controlar biológicamente un agente fitopatógeno

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para controlar biológicamente un agente fitopatógeno, en donde dicho agente fitopatógeno es susceptible de atacar una planta, en adelante, “procedimiento de control biológico de

la invención”, que comprende poner en contacto dicha planta con un microorganismo de la invención, o con un fertilizante suplementado de la invención, o con un soporte sólido activo de la invención, o con un caldo de cultivo de la invención, bajo condiciones que permiten la adquisición, por dicha planta, de inmunidad frente a dicho agente fitopatógeno mediante un mecanismo de resistencia sistémica.

Prácticamente cualquier planta puede ser tratada según el procedimiento de control biológico de la invención para protegerla frente a un agente fitopatógeno susceptible de atacarla y/o infectarla; a modo ilustrativo, no limitativo, dicha planta puede ser una planta de interés agronómico, incluyendo plantas de interés en alimentación humana o animal, plantas de interés ornamental, plantas de interés forestal, plantas de interés energético, etc., tales como, por ejemplo, avena, cebada, maíz, trigo, césped, sorgo, rosales, geranios, margaritas, etc.

La planta en cuestión puede ponerse en contacto con el microorganismo de la invención o con el caldo de cultivo de la invención de distintas maneras. En una realización particular, dicha planta se pone directamente en contacto con dicho microorganismo de la invención, mientras que, en otra realización particular, dicha planta se pone en contacto con un soporte sólido activo de la invención o con un fertilizante suplementado de la invención. Las características de dicho microorganismo de la invención, soporte sólido activo de la invención, y fertilizante suplementado de la invención, han sido descritas previamente y se incorporan aquí por referencia.

En otra realización particular, dicha planta se pone en contacto con el caldo de cultivo de la invención. Las características de dicho caldo de cultivo de la invención, han sido descritas previamente y se incorporan aquí por referencia.

Las características del agente fitopatógeno ya han sido descritas previamente y se incorporan aquí por referencia. En una realización particular, el agente fitopatógeno es una bacteria fitopatógena, un virus vegetal o un hongo fitopatógeno. En una realización más particular, dicho agente fitopatógeno es una bacteria fitopatógena perteneciente a los géneros *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Ralstonia*, *Streptomyces*, *Xanthomonas*, etc. En otra realización más particular, el agente fitopatógeno es un hongo fitopatógeno perteneciente al género *Fusarium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Pyrenophora*, etc.

Debido a que el microorganismo de la invención produce metabolitos que inducen la producción por parte de la planta de compuestos que inducen resistencia sistémica en plantas frente a un agente fitopatógeno, la planta adquiere inmunidad frente a dicho agente fitopatógeno mediante un mecanismo de resistencia sistémica.

Para la puesta en práctica del método de control biológico de la invención, la planta se pone en contacto con una cantidad eficaz de microorganismo de la invención, o de compuestos inductores de la resistencia sistémica en plantas presente en el caldo de cultivo de la invención, cantidad que puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la cantidad de microorganismo de la invención que se pone en contacto con dicha planta es de, al menos, 10^3 ufc. También se puede aplicar entre 1 mL y 100 mL del caldo de cultivo de la invención por metro cuadrado (m^2) de superficie o entre 1 mL y 100 mL de caldo de cultivo de la invención cuando las plantas están en macetas y estas contienen 1 kg de suelo. Dichas cantidades son eficaces y puede aplicarse en una única administración o en varias administraciones. La presencia de microorganismos de la invención, así como de compuestos inductores de la resistencia sistémica en plantas en el caldo de cultivo de la invención, favorece la inducción de la resistencia sistémica en la planta frente a un agente fitopatógeno.

2.9 Procedimiento para restablecer el estado general de la planta tras una situación de estrés ambiental

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para restablecer el estado general de la planta tras una situación de estrés ambiental (abiótico), en adelante "procedimiento para restablecer el estado general de una planta de la invención", que comprende aplicar una cantidad eficaz de un microorganismo de la invención, o de un fertilizante suplementado de la invención, o de un soporte sólido activo de la invención, o de un caldo de cultivo de la invención, sobre dicha planta o sobre su área de influencia rizosférica.

Prácticamente cualquier planta puede ser tratada según el procedimiento para restablecer el estado general de una planta de la invención para restaurar su estado general tras una situación de estrés ambiental susceptible de afectarla; a modo ilustrativo, no limitativo, dicha planta puede ser una planta de interés agronómico, incluyendo plantas de interés en alimentación humana o animal, plantas de interés ornamental, plantas de interés forestal, plantas de interés energético, etc., tales como, por ejemplo, avena, cebada, maíz, trigo, césped, sorgo, rosales, geranios, margaritas, etc.

El microorganismo de la invención puede ser aplicado de distintas maneras. En una realización particular, dicho microorganismo de la invención se aplica directamente al suelo, a la zona de influencia radicular de la planta cuyo estado

general tras una situación de estrés ambiental se desea restaurar, mientras que, en otra realización particular, el microorganismo de la invención se aplica adherido a un soporte sólido en la forma de un soporte sólido activo de la invención. En otra realización particular, el microorganismo de la invención se aplica junto con un fertilizante, en el área de influencia de la raíz de las plantas cuyo estado general tras una situación de estrés ambiental se desea restaurar, en la forma de un fertilizante suplementado de la invención.

Las características de dicho microorganismo de la invención, soporte sólido activo de la invención y fertilizante suplementado de la invención, han sido descritas previamente y se incorporan aquí por referencia.

En otra realización particular, se aplica el caldo de cultivo de la invención sobre el área de influencia de la raíz de las plantas cuyo estado general tras una situación de estrés ambiental se desea restaurar. Las características de dicho caldo de cultivo de la invención, han sido descritas previamente y se incorporan aquí por referencia.

Asimismo, las características del estrés ambiental ya han sido descritas previamente y se incorporan aquí por referencia. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de situaciones de estrés ambiental incluyen la acción de inclemencias climáticas o atmosféricas, tales como, por ejemplo, condiciones climáticas adversas (e.g., frío intenso o heladas, elevadas temperaturas o choque térmico, cambios de temperatura, condiciones de desecación o estrés hídrico, salinidad, etc.

Como se ha indicado previamente, en el sentido utilizado en esta descripción, el término “cantidad eficaz” se refiere a la dosis mínima de un determinado producto necesaria para producir en la planta el efecto deseado. En el presente aspecto inventivo, el término “cantidad eficaz” hace referencia a la cantidad mínima de microorganismo de la invención, independientemente de su forma de presentación (cultivo, fertilizante suplementado o soporte sólido activo), así como a la cantidad mínima de compuestos inductores de la resistencia sistémica en plantas en respuesta a una situación de estrés ambiental presente en el caldo de cultivo de la invención, que es necesario administrar para restaurar el estado general de una planta tras una situación de estrés ambiental y obtener, de este modo, unos resultados beneficiosos. Dicha cantidad eficaz puede aplicarse en una única administración o en varias administraciones.

La cantidad eficaz de microorganismo de la invención, así como de compuestos inductores de la resistencia sistémica en plantas en respuesta a un estrés ambiental presente en el caldo de cultivo de la invención, a aplicar a la planta o a la

zona de influencia radicular de la planta para restaurar su estado general tras una situación de estrés ambiental, mediante la inducción de resistencia sistémica, frente a una situación de estrés ambiental puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la cantidad de microorganismo de la invención a aplicar al suelo que rodea a la planta cuyo estado general tras una situación de estrés ambiental se desea restaurar está comprendida entre 10^3 y 10^8 ufc por gramo de suelo rizosférico. También se puede aplicar entre 1 mL y 100 mL del caldo de cultivo de la invención por metro cuadrado (m^2) de superficie o entre 1 mL y 100 mL de caldo de cultivo de la invención cuando las plantas están en macetas y estas contienen 1 kg de suelo. Dichas cantidades son eficaces y puede aplicarse en una única administración o en varias administraciones. La presencia de microorganismos de la invención, así como del caldo de cultivo de la invención, favorece la inducción de la resistencia sistémica en la planta tras una situación de estrés ambiental.

2.10 Procedimiento para la solubilización de un fosfato insoluble

2.10.1 Solubilización de un fosfato insoluble en un sustrato sólido

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de un fosfato insoluble en un sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble, que comprende poner en contacto dicho sustrato sólido a tratar con un microorganismo de la invención, o con un fertilizante suplementado de la invención, o con un soporte sólido activo de la invención.

En una realización concreta, dicho procedimiento comprende inocular una mezcla que comprende dicho sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble a tratar y agua con un cultivo que comprende un microorganismo de la invención; y, si se desea, retirar dichos microorganismos.

Prácticamente cualquier sustrato sólido que contenga un fosfato insoluble puede ser tratado según este procedimiento para reducir total o parcialmente el contenido en fosfato insoluble; no obstante, en una realización particular, dicho sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble a tratar es roca fosfórica, tal como roca fosfórica utilizada para producir fertilizantes fosfatados con un contenido variable en fosfato insoluble.

Para la realización de este procedimiento, el sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble a tratar se mezcla con agua y, la mezcla resultante se pone en contacto con un cultivo de un microorganismo de la invención, o con un fertilizante suplementado de la invención o con un soporte sólido activo de la invención, a una densidad de población bacteriana que puede variar dentro de un amplio intervalo. En una realización particular, se inoculan, al menos, 10^3 microorganismos de la invención por ml de agua. Tras la inoculación, se deja actuar a los microorganismos de la invención, y, al cabo de 1 a 24 horas, si se desea, se retiran dichos microorganismos por métodos convencionales, por ejemplo, mediante decantación, precipitación con electrolitos, centrifugación, etc. Si se desea, los microorganismos de la invención retirados pueden ser reutilizados en un nuevo procedimiento de solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de un fosfato insoluble y/o de hierro insoluble, en un sustrato sólido o en un suelo que contiene un fosfato insoluble y/o hierro insoluble.

Este procedimiento puede llevarse a cabo en un reactor, piscina o similar, en el que se introduce el sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble a tratar, debidamente equipado con medios para la alimentación y descarga de agua, sustrato sólido, inoculación de microorganismos de la invención y recuperación de los mismos. Si fuera necesario, la mezcla (sustrato sólido, agua y microorganismos de la invención opcionalmente formando parte de un fertilizante suplementado de la invención o de un soporte sólido activo de la invención) se suplementa con una fuente de carbono y/o con una fuente de nitrógeno y/o nutrientes esenciales, con el fin de facilitar la supervivencia de los microorganismos de la invención. A modo ilustrativo, para optimizar el procedimiento, pueden añadirse cantidades adecuadas de solución de micronutrientes junto con cantidades apropiadas de magnesio, cobalto y molibdeno, típicamente, del orden de micromolar; no obstante, en cualquier caso, la elección y cantidad de nutrientes y micronutrientes a añadir sería función de la composición del sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble (e.g., roca fosfórica) a tratar y de la demanda microbiológica.

Este procedimiento puede ser utilizado para solubilizar la totalidad o parte del fosfato insoluble presente en el sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble, por ejemplo, roca fosfórica utilizada para la producción de fertilizantes fosfatados, con el fin de reducir el contenido en fosfato insoluble presente en dichos fertilizantes fosfatados obtenidos a partir de dicha roca fosfórica.

2.10.2 Solubilización de un fosfato insoluble en un suelo

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de fosfato insoluble presente en un suelo que contiene un fosfato insoluble, que comprende poner en contacto dicho suelo que contiene un fosfato insoluble a tratar con un microorganismo de la invención. En una realización particular, dicho procedimiento comprende:

inyectar a dicho suelo a tratar un cultivo de un microorganismo de la invención, una o más veces; o, alternativamente,

añadir a dicho suelo a tratar un fertilizante suplementado de la invención, o, alternativamente,

adicionar a dicho suelo a tratar un soporte sólido activo de la invención; o, alternativamente,

sembrar dicho suelo a tratar con una semilla suplementada de la invención.

En una realización concreta, dicho procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de fosfato insoluble presente en un suelo que contiene un fosfato insoluble, se lleva a cabo mediante la inyección al suelo a tratar de microorganismos de la invención, por ejemplo, mediante un procedimiento que comprende:

a) la inyección primaria en dicho suelo de un cultivo que contiene un microorganismo de la invención; y

b) inyecciones sucesivas de cultivos que contienen microorganismos de la invención hasta la solubilización total o parcial del fosfato insoluble presente en el suelo a tratar.

Prácticamente cualquier suelo que contenga un fosfato insoluble (e.g., fosfato cálcico dibásico, fosfato cálcico tribásico, etc., y sus mezclas) puede ser tratado según este procedimiento para reducir total o parcialmente el contenido en fosfato insoluble presente en dicho suelo a tratar; no obstante, en una realización particular, dicho suelo es un suelo superficial agrícola, un suelo superficial tratado con fertilizantes, etc. Si fuera necesario, el suelo a tratar se suplementa con una fuente de carbono y/o con una fuente de nitrógeno y/o con nutrientes esenciales para facilitar la supervivencia de los microorganismos de la invención.

La inyección de microorganismos de la invención se realiza con el fin de alcanzar una elevada densidad celular en el suelo a tratar, por ejemplo, igual o

superior a 10^3 microorganismos de la invención por gramo de suelo a tratar, típicamente, igual o superior a 10^4 microorganismos de la invención por gramo de suelo a tratar, preferentemente, igual o superior a 10^5 microorganismos de la invención por gramo de suelo a tratar, con el objetivo de facilitar la solubilización del fosfato insoluble.

En una realización concreta, dicho procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de fosfato insoluble presente en un suelo que contiene un fosfato insoluble, se lleva a cabo mediante la adición a dicho suelo a tratar de un soporte sólido activo de la invención, que comprende un microorganismo de la invención. Las características de dicho soporte sólido activo de la invención han sido descritas previamente. La cantidad de soporte sólido activo de la invención que se añade al suelo a tratar (suelo que contiene un fosfato insoluble) puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la cantidad de dicho soporte sólido activo de la invención que se añade al suelo a tratar es igual o superior a 0,01 kg de soporte sólido activo de la invención por hectárea (Ha) de suelo a tratar, típicamente, igual o superior a 0,1 kg/Ha, preferentemente, igual o superior a 0,5 kg/Ha de suelo a tratar, aún más preferentemente, igual o superior a 1 kg/Ha de suelo a tratar, con el objetivo de facilitar la solubilización del fosfato insoluble.

En otra realización concreta, dicho procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de fosfato insoluble presente en un suelo que contiene un fosfato insoluble, se lleva a cabo mediante la adición a dicho suelo a tratar de un fertilizante suplementado de la invención, que comprende un microorganismo de la invención. Las características de dicho fertilizante suplementado de la invención han sido descritas previamente. La cantidad de fertilizante suplementado de la invención que se añade al suelo a tratar (suelo que contiene un fosfato insoluble) puede variar dentro de un amplio intervalo, dependiendo, entre otros factores de la cantidad de fosfato insoluble presente en el suelo a tratar y de la cantidad de microorganismos de la invención presentes en el fertilizante suplementado de la invención.

En otra realización concreta, dicho procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de fosfato insoluble presente en un suelo que contiene un fosfato insoluble, se lleva a cabo mediante la siembra de dicho suelo a tratar con una semilla de la invención, que comprende un microorganismo de la invención. Las características de dicha semilla de la invención han sido descritas previamente. La cantidad de semillas suplementadas de la invención que se siembran

en el suelo a tratar (suelo que contiene un fosfato insoluble) puede variar dentro de un amplio intervalo, en función de la densidad requerida por el agricultor.

Los procedimientos de solubilización microbiológica de fosfatos insolubles previamente descritos, proporcionan numerosas ventajas, entre las que se encuentran las siguientes:

- alta especificidad en la solubilización de fosfatos insolubles;
- funcionan en un amplio intervalo de concentraciones de fosfato, típicamente, entre el 0,01% y el 95% (p/p) de fosfato; y
- presentan una alta versatilidad, ya que pueden ser utilizados *in situ* para solubilizar dichos compuestos en suelos o en reactores para solubilizar fosfato, que se puede utilizar como fertilizante *per se* o en mezclas con otros compuestos.

2.11 Procedimiento para la solubilización de hierro insoluble

2.11.1 Solubilización de hierro en un sustrato sólido

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de hierro insoluble en un sustrato sólido que contiene hierro insoluble, que comprende poner en contacto dicho sustrato sólido a tratar con un microorganismo de la invención, o con un fertilizante suplementado de la invención, o con un soporte sólido activo de la invención.

En una realización concreta, dicho procedimiento comprende:

- a) inocular una mezcla que comprende dicho sustrato sólido que contiene hierro insoluble a tratar y agua con un cultivo que comprende un microorganismo de la invención; y, si se desea,
- b) retirar dichos microorganismos.

Prácticamente cualquier sustrato sólido que contenga hierro insoluble (e.g., hierro insoluble del tipo de los óxidos de hierro o cualquier otra forma de hierro) puede ser tratado según este procedimiento para reducir total o parcialmente el contenido en hierro insoluble presente en dicho sustrato sólido a tratar; no obstante, en una realización particular, dicho sustrato sólido que contiene hierro insoluble a tratar es un suelo, tal como un suelo superficial agrícola, un suelo superficial tratado con fertilizantes, etc.

Para la realización de este procedimiento, el sustrato sólido que contiene hierro insoluble a tratar se mezcla con agua y la mezcla resultante se pone en contacto con un cultivo de un microorganismo de la invención, o con un fertilizante suplementado de la invención, o con un soporte sólido activo de la invención, a una densidad de población bacteriana que puede variar dentro de un amplio intervalo. En una
5 realización particular, se inoculan, al menos, 10^3 microorganismos de la invención por ml de agua. Tras la inoculación, se deja actuar a los microorganismos de la invención, y, al cabo de 1 a 24 horas, si se desea, se retiran dichos microorganismos por métodos convencionales, por ejemplo, mediante decantación, precipitación con
10 electrolitos, centrifugación, etc. Si se desea, los microorganismos de la invención retirados pueden ser reutilizados en un nuevo procedimiento de solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de fosfato insoluble y/o hierro insoluble en un sustrato sólido o en un suelo que contiene fosfato insoluble y/o hierro insoluble.

Este procedimiento puede llevarse a cabo en un reactor, piscina o similar, en el
15 que se introduce el sustrato sólido que contiene hierro insoluble a tratar, debidamente equipado con medios para la alimentación y descarga de agua, sustrato sólido, inoculación de microorganismos de la invención y recuperación de los mismos. Si fuera necesario, la mezcla (sustrato sólido, agua y microorganismos de la invención opcionalmente formando parte de un soporte sólido activo de la invención) se
20 suplementa con una fuente de carbono y/o con una fuente de nitrógeno y/o nutrientes esenciales, con el fin de facilitar la supervivencia de los microorganismos de la invención. A modo ilustrativo, para optimizar el procedimiento, pueden añadirse cantidades adecuadas de solución de micronutrientes junto con cantidades apropiadas de magnesio, cobalto y molibdeno, típicamente, del orden de micromolar; no obstante,
25 en cualquier caso, la elección y cantidad de nutrientes y micronutrientes a añadir sería función de la composición del sustrato sólido que contiene hierro insoluble a tratar y de la demanda microbiológica.

Este procedimiento puede ser utilizado para solubilizar la totalidad o parte del hierro insoluble presente en el sustrato sólido que contiene hierro insoluble, con el fin
30 de reducir el contenido en hierro insoluble presente en dicho sustrato sólido.

2.11.2 Solubilización de hierro en un suelo

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de hierro insoluble presente
35

en un suelo que contiene hierro insoluble, que comprende poner en contacto dicho suelo que contiene hierro insoluble a tratar con un microorganismo de la invención. En una realización particular, dicho procedimiento comprende:

- 5 inyectar a dicho suelo a tratar un cultivo de un microorganismo de la invención, una o más veces; o, alternativamente,
 añadir a dicho suelo a tratar un fertilizante suplementado de la invención; o, alternativamente,
 adicionar a dicho suelo a tratar un soporte sólido activo de la invención; o, alternativamente,
10 sembrar dicho suelo a tratar con una semilla suplementada de la invención.

En una realización concreta, dicho procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de hierro insoluble presente en un suelo que contiene hierro insoluble, se lleva a cabo mediante la inyección al suelo a tratar de
15 microorganismos de la invención, por ejemplo, mediante un procedimiento que comprende:

- a) la inyección primaria en dicho suelo de un cultivo que contiene un microorganismo de la invención; y
 b) inyecciones sucesivas de cultivos que contienen microorganismos de la
20 invención hasta la solubilización total o parcial del hierro insoluble presente en el suelo a tratar.

Prácticamente cualquier suelo que contenga hierro insoluble (e.g., hierro insoluble del tipo de los óxidos de hierro o cualquier otra forma de hierro) puede ser tratado según este procedimiento para retirar la totalidad o parte del hierro insoluble
25 para reducir total o parcialmente el contenido en hierro insoluble presente en el suelo a tratar; no obstante, en una realización particular, dicho suelo que contiene hierro insoluble a tratar es un suelo, tal como un suelo superficial agrícola, un suelo superficial tratado con fertilizantes, etc. Si fuera necesario, el suelo a tratar se suplementa con una fuente de carbono y/o con una fuente de nitrógeno y/o con
30 nutrientes esenciales para facilitar la supervivencia de los microorganismos de la invención.

La inyección de microorganismos de la invención se realiza con el fin de alcanzar una elevada densidad celular en el suelo a tratar, por ejemplo, igual o superior a 10^3 microorganismos de la invención por gramo de suelo a tratar,
35 típicamente, igual o superior a 10^4 microorganismos de la invención por gramo de

suelo a tratar, preferentemente, igual o superior a 10^5 microorganismos de la invención por gramo de suelo a tratar, con el objetivo de facilitar la solubilización del hierro insoluble.

5 En una realización concreta, dicho procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de hierro insoluble presente en un suelo que contiene hierro insoluble, se lleva a cabo mediante la adición a dicho suelo a tratar de un soporte sólido activo de la invención, que comprende un microorganismo de la invención. Las características de dicho soporte sólido activo de la invención han sido descritas previamente. La cantidad de soporte sólido activo de la invención que se
10 añade al suelo a tratar (suelo que contiene hierro insoluble) puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la cantidad de dicho soporte sólido activo de la invención que se añade al suelo a tratar es igual o superior a 0,01 kg de soporte sólido activo de la invención por hectárea (Ha) de suelo a tratar, típicamente, igual o superior a 0,1 kg/Ha, preferentemente, igual o superior a 0,5 kg/Ha
15 de suelo a tratar, aún más preferentemente, igual o superior a 1 kg/Ha de suelo a tratar, con el objetivo de facilitar la solubilización del hierro insoluble.

En otra realización concreta, dicho procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de hierro insoluble presente en un suelo que contiene hierro insoluble, se lleva a cabo mediante la adición a dicho suelo a tratar de
20 un fertilizante suplementado de la invención, que comprende un microorganismo de la invención. Las características de dicho fertilizante suplementado de la invención han sido descritas previamente. La cantidad de fertilizante suplementado de la invención que se añade al suelo a tratar (suelo que contiene hierro insoluble) puede variar dentro de un amplio intervalo, dependiendo, entre otros factores de la cantidad de hierro
25 insoluble presente en el suelo a tratar y de la cantidad de microorganismos de la invención presentes en el fertilizante suplementado de la invención.

En otra realización concreta, dicho procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de hierro insoluble presente en un suelo que contiene hierro insoluble, se lleva a cabo mediante la siembra de dicho suelo a tratar
30 con una semilla de la invención, que comprende un microorganismo de la invención. Las características de dicha semilla de la invención han sido descritas previamente. La cantidad de semillas suplementadas de la invención que se siembran en el suelo a tratar (suelo que contiene hierro insoluble) puede variar dentro de un amplio intervalo, en función de la densidad requerida por el agricultor.

La solubilización de hierro, por ejemplo, mediante quelación por sideróforos, evita que el hierro esté disponible para microorganismos patógenos, en particular, fitopatógenos, ejerciéndose de este modo un biocontrol sobre poblaciones no deseadas agrícolamente. Esta ventaja puede ser obtenida mediante el empleo del
5 microorganismo de la invención.

2.12 Procedimiento para la solubilización de fosfato insoluble y hierro

2.12.1 Solubilización de fosfato insoluble y hierro en un sustrato sólido

10

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de un fosfato insoluble y de hierro en un sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble y hierro insoluble, que comprende poner en contacto dicho sustrato sólido a tratar con un microorganismo de
15 la invención, o con un fertilizante suplementado de la invención o con un soporte sólido activo de la invención.

En una realización concreta, dicho procedimiento comprende:

- a) inocular una mezcla que comprende dicho sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble y hierro insoluble a tratar y agua con un
20 cultivo que comprende un microorganismo de la invención; y, si se desea,
- b) retirar dicho microorganismo.

Prácticamente cualquier sustrato sólido que contenga un fosfato insoluble y hierro insoluble puede ser tratado según este procedimiento para reducir total o
25 parcialmente el contenido en fosfato insoluble y en hierro insoluble; no obstante, en una realización particular, dicho sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble y hierro insoluble a tratar es roca fosfórica, tal como roca fosfórica utilizada para producir fertilizantes fosfatados con un contenido variable en fosfato insoluble y, en ocasiones, en hierro insoluble.

30 Para la realización de este procedimiento, el sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble y hierro insoluble a tratar se mezcla con agua y, la mezcla resultante se pone en contacto con un cultivo de un microorganismo de la invención, o con un soporte sólido activo de la invención, a una densidad de población bacteriana que puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular,
35 se inoculan, al menos, 10^3 microorganismos de la invención por ml de agua. Tras la

inoculación, se deja actuar a los microorganismos de la invención, y, al cabo de 1 a 24 horas, si se desea, se retiran dichos microorganismos por métodos convencionales, por ejemplo, mediante decantación, precipitación con electrolitos, centrifugación, etc. Si se desea, los microorganismos de la invención retirados pueden ser reutilizados en un nuevo procedimiento de solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de un fosfato insoluble y/o de hierro insoluble en un sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble y/o hierro insoluble.

Este procedimiento puede llevarse a cabo en un reactor, piscina o similar, en el que se introduce el sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble y hierro insoluble a tratar, debidamente equipado con medios para la alimentación y descarga de agua, sustrato sólido, inoculación de microorganismos de la invención y recuperación de los mismos. Si fuera necesario, la mezcla (sustrato sólido, agua y microorganismos de la invención opcionalmente formando parte de un soporte sólido activo de la invención) se suplementa con una fuente de carbono y/o con una fuente de nitrógeno y/o nutrientes esenciales, con el fin de facilitar la supervivencia de los microorganismos de la invención. A modo ilustrativo, para optimizar el procedimiento, pueden añadirse cantidades adecuadas de solución de micronutrientes junto con cantidades apropiadas de magnesio, cobalto y molibdeno, típicamente, del orden de micromolar; no obstante, en cualquier caso, la elección y cantidad de nutrientes y micronutrientes a añadir sería función de la composición del sustrato sólido a tratar y de la demanda microbiológica.

Este procedimiento puede ser utilizado para solubilizar la totalidad o parte del fosfato insoluble y del hierro insoluble presente en el sustrato sólido a tratar con el fin de reducir el contenido en fosfato insoluble y en hierro insoluble presente en dicho sustrato sólido a tratar.

2.12.2 Solubilización de fosfato insoluble y hierro en un suelo

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de fosfato insoluble y hierro insoluble presente en un suelo que contiene un fosfato insoluble y hierro insoluble, que comprende poner en contacto dicho suelo que contiene un fosfato insoluble y hierro insoluble a tratar con un microorganismo de la invención. Brevemente, en una realización particular, dicho procedimiento comprende:

inyectar a dicho suelo a tratar un cultivo de un microorganismo de la invención, una o más veces; o, alternativamente,

añadir a dicho suelo a tratar un fertilizante suplementado de la invención; o, alternativamente,

adicionar a dicho suelo a tratar un soporte sólido activo de la invención; o, alternativamente,

5 sembrar dicho suelo a tratar con una semilla suplementada de la invención.

En una realización concreta, dicho procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de fosfato insoluble y hierro insoluble presente en un suelo que contiene un fosfato insoluble y hierro insoluble, se lleva a
10 cabo mediante la inyección al suelo a tratar de microorganismos de la invención, por ejemplo, mediante un procedimiento que comprende:

- a) la inyección primaria en dicho suelo de un cultivo que contiene un microorganismo de la invención; y
- b) inyecciones sucesivas de cultivos que contienen microorganismos de la
15 invención hasta la solubilización, total o parcial, del fosfato insoluble y del hierro insoluble presente en el suelo a tratar.

Prácticamente cualquier suelo que contenga un fosfato insoluble (e.g., fosfato cálcico dibásico, fosfato cálcico tribásico, etc., y sus mezclas) y hierro insoluble (e.g., hierro insoluble del tipo de los óxidos de hierro o cualquier otra forma de hierro) puede
20 ser tratado según este procedimiento para reducir total o parcialmente el contenido en fosfato insoluble y en hierro insoluble presente en dicho suelo a tratar; no obstante, en una realización particular, dicho suelo es un suelo superficial agrícola, un suelo superficial tratado con fertilizantes, etc. Si fuera necesario, el suelo a tratar se suplementa con una fuente de carbono y/o con una fuente de nitrógeno y/o con
25 nutrientes esenciales para facilitar la supervivencia de los microorganismos de la invención.

La inyección de microorganismos de la invención se realiza con el fin de alcanzar una elevada densidad celular en el suelo a tratar, por ejemplo, igual o superior a 10^3 microorganismos de la invención por gramo de suelo a tratar,
30 típicamente, igual o superior a 10^4 microorganismos de la invención por gramo de suelo a tratar, preferentemente, igual o superior a 10^5 microorganismos de la invención por gramo de suelo a tratar, con el objetivo de facilitar la solubilización del fosfato insoluble y del hierro insoluble.

En una realización concreta, dicho procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de fosfato insoluble y hierro insoluble
35

presente en un suelo que contiene un fosfato insoluble y hierro insoluble, se lleva a cabo mediante la adición a dicho suelo a tratar de un soporte sólido activo de la invención, que comprende un microorganismo de la invención. Las características de dicho soporte sólido activo de la invención han sido descritas previamente. La cantidad de soporte sólido activo de la invención que se añade al suelo a tratar puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la cantidad de dicho soporte sólido activo de la invención que se añade al suelo a tratar es igual o superior a 0,01 kg de soporte sólido activo de la invención por hectárea (Ha) de suelo a tratar, típicamente, igual o superior a 0,1 kg/Ha, preferentemente, igual o superior a 0,5 kg/Ha de suelo a tratar, aún más preferentemente, igual o superior a 1 kg/Ha de suelo a tratar, con el objetivo de facilitar la solubilización del fosfato insoluble y del hierro insoluble.

En otra realización concreta, dicho procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de fosfato insoluble y hierro insoluble presente en un suelo que contiene un fosfato insoluble y hierro insoluble, se lleva a cabo mediante la adición a dicho suelo a tratar de un fertilizante suplementado de la invención, que comprende un microorganismo de la invención. Las características de dicho fertilizante suplementado de la invención han sido descritas previamente. La cantidad de fertilizante suplementado de la invención que se añade al suelo a tratar puede variar dentro de un amplio intervalo, dependiendo, entre otros factores de la cantidad de fosfato insoluble presente en el suelo a tratar y de la cantidad de microorganismos de la invención presentes en el fertilizante suplementado de la invención.

En otra realización concreta, dicho procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de fosfato insoluble y hierro insoluble presente en un suelo que contiene un fosfato insoluble y hierro insoluble, se lleva a cabo mediante la siembra de dicho suelo a tratar con una semilla de la invención, que comprende un microorganismo de la invención. Las características de dicha semilla de la invención han sido descritas previamente. La cantidad de semillas suplementadas de la invención que se siembran en el suelo a tratar puede variar dentro de un amplio intervalo, en función de la densidad requerida por el agricultor.

Los procedimientos de solubilización microbiológica de fosfato insoluble y de hierro insoluble previamente descritos, proporcionan, entre otras, las ventajas previamente mencionadas de elevada especificidad, funcionamiento en un amplio intervalo de concentraciones de fosfato, típicamente, entre el 0,01% y el 95% (p/p) de

fosfato, y alta versatilidad; asimismo, la solubilización de hierro, por ejemplo, mediante quelación por sideróforos, evita que el hierro esté disponible para microorganismos patógenos, ejerciéndose de este modo un biocontrol sobre poblaciones no deseadas agrícolamente.

5

2.13 Procedimiento de mutagénesis y selección de clones para obtener mutantes sobreproductores de aminoácidos

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la obtención de un mutante de *Pseudomonas fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) que, además de mantener las características a) – c) de la cepa *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) parental, sobreproduce al menos un aminoácido, comprendiendo dicho procedimiento los siguientes pasos:

10

15

20

25

30

35

- a) seleccionar y proporcionar un microorganismo aislado de una raíz o de un suelo rizosférico sospechoso de contener microorganismos rizosféricos, en donde dicho microorganismo presenta las siguientes características:
 - a) induce la producción de compuestos que inducen resistencia sistémica en plantas;
 - b) induce la producción de compuestos estimuladores del crecimiento de las plantas; y
 - c) solubiliza fosfatos insolubles y hierro;
- b) inducir una mutación en el microorganismo del paso a) poniendo en contacto dicho microorganismo con un agente mutagénico en un medio de cultivo sólido que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, micronutrientes y un análogo del aminoácido del que se espera que el microorganismo seleccionado en la etapa a) excrete al medio externo;
- c) incubar el microorganismo resultante del paso b) en dicho medio de cultivo sólido que comprende dicha fuente de carbono, dicha fuente de nitrógeno, dicha fuente de fósforo, dichos micronutrientes y dicho análogo del aminoácido del que se espera que el microorganismo excrete al medio externo, en condiciones aeróbicas y a una temperatura comprendida entre 28°C y 30°C aproximadamente, permitiendo el crecimiento de la cepa susceptible de mutación;
- d) al cabo de un periodo de tiempo de, al menos 24 horas, aislar y purificar las colonias diferenciadas del microorganismo provisto en el paso a) en el área

de acción del agente mutágeno introducido en el medio sólido en el paso b);

- 5 e) repicar las colonias obtenidas en el paso d) a un medio sólido que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, micronutrientes y un análogo del aminoácido a la concentración a la que se ha introducido en el medio en el paso b), para comprobar que dichas colonias son capaces de crecer en presencia del análogo;
- 10 f) sembrar en placas colonias que, aisladas y purificadas en la etapa e), u, opcionalmente, seleccionadas en la etapa d), son capaces de crecer en presencia del análogo de aminoácido correspondiente añadido en la etapa b);
- 15 g) sembrar en estría las colonias procedentes del paso d), o del paso e), en un medio sólido que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo y micronutrientes, y, paralelamente a cada estría de las colonias bioensayo, sembrar en estría a una distancia, no mayor de 5 mm, un microorganismo auxótrofo para el aminoácido susceptible de ser producido por las colonias seleccionadas en el paso d), o en el paso e), con el fin de descartar los mutantes obtenidos en el paso d), o posteriormente purificados en el paso e), que su mecanismo para tolerar la presencia del análogo de aminoácido, que se introdujo en el medio en la etapa b), no comprende la producción de aminoácido;
- 20 h) incubar las placas resultantes del paso g) en condiciones aeróbicas a una temperatura comprendida entre 28°C y 30°C aproximadamente;
- 25 i) al cabo de un periodo de tiempo de, al menos 24 horas, observar si se produce crecimiento de los microorganismos auxótrofos, sembrados en estría paralelamente a los mutantes seleccionados en la etapa g);
- 30 j) observar la aparición de crecimiento microbiano en las estrías de los microorganismos auxótrofos, sembrados en la etapa g), en donde la aparición de dicho crecimiento microbiano en dichas estrías de los microorganismos auxótrofos, sembrados en la etapa g), es indicativa de la producción de aminoácido por los mutantes seleccionados en el paso d);
- k) someter las colonias de los mutantes obtenidos en el paso d), o en el paso f), que se consideren positivas tras el paso j), a otra prueba para descartar mutantes menos efectivos en la posible producción de aminoácidos;

- 5
- l) cultivar los mutantes seleccionados en el paso k) en un medio líquido que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo y micronutrientes, en condiciones aeróbicas, a una temperatura comprendida entre 28°C y 30°C aproximadamente, durante, al menos, 24 horas;
- 10
- m) sembrar unas gotas de cada mutante en un medio sólido que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo y micronutrientes, y, a una distancia mínima, entre ellas y la gota del mutante a ensayar de 5 mm, sembrar unas gotas del auxótrofo para el aminoácido susceptible de ser producido por las colonias seleccionadas en el paso k);
- 15
- n) incubar las placas del paso m) bajo condiciones aeróbicas a una temperatura comprendida entre 28°C y 30°C aproximadamente durante, al menos, 24 horas y hasta una semana, y, finalizada la incubación, una vez que los mutantes a testar han crecido, comprobar si se ha producido crecimiento en las gotas de auxótrofos y la distancia hasta el mutante a testar hasta donde se ha producido el crecimiento;
- 20
- o) seleccionar de entre los mutantes positivos del paso n) aquellos que hayan permitido crecimiento de los auxótrofos a mayor distancia de la gota del mutante a ensayar;
- 25
- p) someter los mutantes seleccionados en el paso o) a un ensayo de nutrición cruzada, en el que se incuban durante 24 h aproximadamente, en condiciones aeróbicas, las cepas a ensayar en un medio mínimo líquido que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y una fuente de fósforo a una temperatura comprendida entre 28°C y 30°C aproximadamente; una vez transcurrido ese periodo de tiempo, esterilizar los cultivos mediante filtración por paso a través de un filtro de 0,22 µm de diámetro de poro; inocular un microorganismo auxótrofo para el aminoácido susceptible de ser producido por las cepas mutantes; incubar los cultivos resultantes en condiciones aeróbicas a una temperatura comprendida entre
- 30
- 28°C y 30°C aproximadamente, durante al menos 72 horas, observando cada 24 horas la turbidez del cultivo; transcurrido ese periodo de tiempo, observar si se produce crecimiento; y seleccionar aquellos mutantes que produzcan crecimiento en las cepas auxótrofas porque son considerados positivos para la producción de aminoácidos;

q) someter los mutantes seleccionados en el paso p) a pruebas para comprobar si mantienen las características a)-c) de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851); y, si se desea,

5 r) una vez realizadas dichas pruebas para comprobar el mantenimiento de las características a)-c) de *P. fluorescens* parental provista en la etapa a), calcular la cantidad de aminoácido excretado por el mutante resultante de la selección llevada a cabo en las etapas o) y p).

El procedimiento de obtención de un mutante de *Pseudomonas fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) que, además de mantener las características a) – c) de la cepa
 10 *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) parental, sobreproduce al menos un aminoácido, comprende, en primer lugar, la identificación y provisión de microorganismos rizosféricos con capacidad para producir compuestos que inducen resistencia sistémica en plantas, compuestos estimuladores del crecimiento de las plantas, y capaces de solubilizar fosfatos insolubles y hierro, y, en segundo lugar, la generación
 15 de microorganismos mutantes que, además de dichas características, son capaces de sobreproducir aminoácidos.

El microorganismo seleccionado en la etapa a) puede ser un microorganismo aislado de una raíz o de un suelo rizosférico sospechoso de contener microorganismos rizosféricos con capacidad para producir compuestos que inducen resistencia
 20 sistémica en plantas (e.g., sustancias con actividad antimicrobiana o antifúngica), compuestos estimuladores del crecimiento de las plantas, y capaces de solubilizar fosfatos insolubles y hierro. En una realización particular, el microorganismo seleccionado es una bacteria de la especie *Pseudomonas fluorescens* ya que dicha bacteria es susceptible de poseer las características a)-c) previamente citada en el
 25 paso a), tales como la producción de sustancias que inducen resistencia sistémica en plantas, la producción de hormonas vegetales o sus precursores y la capacidad para solubilizar fosfato insoluble y producir sideróforos. Para el aislamiento de una cepa apropiada de *P. fluorescens* puede utilizarse cualquier medio de cultivo apropiado para la detección de cepas fluorescentes del género *Pseudomonas* tal como, por ejemplo,
 30 el medio King B, deficiente en hierro para influir sobre la producción de pioverdinas y/o fluoresceínas, pigmentos típicos producidos por las bacterias de este género [King et al., Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin (1954) Journal of Laboratory and Clinical Medicine 44:301], cuya composición detallada por litro es: peptona 20 g; glicerol 10 mL; K₂HPO₄, 1,5 g; MgSO₄·7H₂O 1,5 g, agar 15 g.

Tras obtener colonias que crezcan en ese medio y produzcan fluorescencia al exponerlas a luz UV (longitud de onda (λ) de 350 nm aproximadamente), se aíslan y purifican por separado, sometiéndolas posteriormente a una serie de pruebas en medio sólido, de acuerdo con la etapa a), para dilucidar si producen sustancias con actividad promotora de resistencia sistémica en planta, promotora de crecimiento vegetal y con capacidad de colonización de la rizosfera.

La producción de hormonas vegetales o promotoras de las mismas, tales como el ácido indolacético (IAA), se puede comprobar mediante la siembra de las colonias a ensayar en medio sólido LB enmendado cuya composición específica por litro es: bacto-triptona 10 g, extracto de levadura 5 g; NaCl, 10 g; L-triptófano, 1,025 g; SDS, 600 mg; glicerol 10 mL; agar 15 g, y colocando encima del medio con el microorganismo inoculado un papel de filtro Whatman del número 1. Tras un periodo de incubación de 3-5 días a una temperatura comprendida entre 28°C y 30°C aproximadamente, se hace reaccionar el papel Whatman con el reactivo de Salkowsky [Naik et al., Genetic and functional diversity among fluorescent Pseudomonads isolated from the rhizosphere of Banana (2008) Microbial Ecology 56:492), cuya composición específica por litro es: 2% v/v de una solución de FeCl₃ 0,5 M en una solución al 35% v/v de ácido perclórico. Si se produce una coloración rojiza del papel Whatman tras 1 hora de reacción, se considera positiva la producción de IAA.

Otra de las características de promoción de crecimiento vegetal que pueden ser comprobadas incluye la producción de sideróforos o sustancias quelantes de hierro, que permiten que éste sea asimilable por las plantas. Esta característica se puede comprobar mediante la siembra del microorganismo en un medio específico denominado CAS Agar [Alexander and Zuberer. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria (1991) Biology Fertility Soils 12:39], cuya composición específica por litro es: 50 mL de solución de CAS (Chrome Azurol S) [1,21 mg/mL], 10 mL de FeCl₃ · 6H₂O (1 mM) disuelto en HCl 10 mM, 40 mL de HDTMA [1,82 mg/mL]; 30,24 g de PIPES; 0,3 g KH₂PO₄; 0,5 g NaCl; 1 g NH₄Cl; 2 g glucosa, 2 g manitol, 493 mg MgSO₄·7H₂O, 12,5 mg CaCl₂·2 H₂O, 1,17 mg MnSO₄ H₂O; 1,4 mg H₃BO₃, 0,04 mg CuSO₄·5H₂O, 1,2 mg ZnSO₄ · 7H₂O, 1,08 mg Na₂MoO₄·2 H₂O, 3 mg de casaminoácidos. Si se produce un halo amarillo en el medio alrededor de la colonia bacteriana, se considera positiva la producción de sideróforos.

Por otra parte, se comprueba la capacidad de solubilización de fosfatos del microorganismo mediante la siembra del mismo en un medio específico denominado Agar Pikovskaya [Naik et al., Genetic and functional diversity among fluorescent

Pseudomonads isolated from the rhizosphere of Banana (2008) Microbial Ecology 56:492], cuya composición específica por litro es: 0,5 g extracto de levadura; 10 g glucosa; 5g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 0,5g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2g KCl, 0,1g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,1mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15g Agar. Si se produce un halo claro en el medio
5 alrededor de la colonia se considera positiva la producción de fosfatasa.

De acuerdo con la etapa b), al microorganismo seleccionado de la etapa a) se le somete a un proceso de mutagénesis en un medio mínimo sólido de tipo M9 [Abril et al., Regulator and enzyme specificities of TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons (1989) Journal of Bacteriology 171:6782], al que
10 se le ha añadido una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, un análogo para el aminoácido del que se pretende inducir la producción, tal como, por ejemplo, 5-fluoro-*DL*-triptófano para la producción de triptófano o N-bencilglicina; *L*-norvalina para la producción de valina; o *p*-fluoro-*DL*-fenilalanina para la producción de fenilalanina. Además, se añade un agente mutagénico apropiado
15 para inducir la mutación.

Como fuente de carbono puede utilizarse cualquiera que pueda ser asimilada por el microorganismo tal como, por ejemplo, glucosa, sacarosa, citrato sódico, glicerol, etc. La concentración de la fuente de carbono a utilizar en el paso b) puede variar dentro de un amplio intervalo, aunque en una realización particular, la
20 concentración final de la fuente de carbono en el medio de cultivo está comprendida entre 10 y 30 mM.

Como fuente de nitrógeno puede utilizarse cualquiera que sea asimilable por el microorganismo seleccionado en la etapa a), tal como, por ejemplo, un nitrato, urea, etc. En una realización particular, la concentración de la fuente de nitrógeno añadida al
25 medio está comprendida entre 5 y 10 mM.

Como fuente de fósforo puede utilizarse cualquier fosfato soluble asimilable por el microorganismo seleccionado en el paso a), tal como, por ejemplo, fosfato potásico monobásico, fosfato sódico dibásico, etc. En una realización particular, la concentración de fósforo adecuada para el crecimiento del microorganismo
30 seleccionado en el paso a) está comprendida entre 5 y 10 mM.

Como agente mutagénico en el paso b) se puede utilizar cualquier agente físico o químico que produzca un aumento de la tasa de mutación por encima de los niveles naturales, tal como un agente físico, por ejemplo luz UV, radiaciones ionizantes, etc., o un agente químico, por ejemplo, etilmetanosulfonato (EMS), nitrosoguanidina,
35 dietilsulfato, etc. En una realización particular, se utiliza un agente químico en una

concentración comprendida entre el 1% y el 10% v/v. En una realización particular, el agente mutagénico es EMS.

El medio del paso b) inoculado con el microorganismo seleccionado en el paso a), posteriormente, en la etapa c), se incuba a una temperatura comprendida entre 28°C y 30°C aproximadamente, en condiciones aerobias, durante, al menos, 24h, típicamente entre 24 y 48 horas (aunque, no obstante, puede dejarse incubar durante un periodo de tiempo superior a 48 horas).

Una vez observado crecimiento de colonias en el paso c), se procede, en el paso d), a seleccionar aquellas colonias que han experimentado crecimiento en el área de acción del agente mutagénico. Dichas colonias se aíslan y purifican, posteriormente, en el paso e), en un medio sólido al que se le han añadido las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo a las concentraciones utilizadas en el paso b) y el análogo de aminoácido utilizado en dicha etapa a la concentración correspondiente para la correcta comprobación de tolerancia de las colonias seleccionadas en la etapa d). Se deja incubar durante, al menos, 24h, típicamente entre 24 y 48 horas (aunque, no obstante, puede dejarse incubar durante un periodo de tiempo superior a 48 horas).

Posteriormente, en el paso f), se seleccionan y aíslan, en el mismo medio descrito en el paso e), las colonias seleccionadas en dicho paso.

Para descartar entre los mutantes obtenidos en el paso f) aquellos que no presentan producción de aminoácidos, se repican en estría, en el paso g), en un medio de cultivo sólido con una fuente de carbono, otra de nitrógeno y otra de fósforo descritas en el paso b), y, paralelamente, a una distancia apropiada, típicamente de unos 5 mm aproximadamente, se estrían colonias de microorganismos auxótrofos para el aminoácido susceptible de ser producido por los mutantes obtenidos en el paso e), o bien en el paso d). Se incuban las placas resultantes durante al menos 48 h, en condiciones aerobias, a una temperatura comprendida entre 28°C y 30°C aproximadamente, en el paso h).

Una vez dada por finalizada la incubación, en las etapas i) y j), se observa si se ha producido crecimiento en las estrías, sembradas en la etapa g), correspondientes a los microorganismos auxótrofos. Si se aprecia crecimiento se considera positiva la producción de aminoácido de los mutantes obtenidos en el paso d).

Posteriormente, en el paso l), las colonias de mutantes seleccionadas en el paso k), resultantes de someter las colonias de los mutantes obtenidos en el paso d), o en el paso f), que se consideren positivas tras el paso j), a una nueva prueba para descartar los mutantes menos efectivos en la producción de aminoácidos, se cultivan

aeróbicamente, en un medio de cultivo líquido al que se le han añadido las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo seleccionadas en el paso a), o en su defecto en el paso b), a una temperatura comprendida entre 28°C y 30°C aproximadamente, durante, al menos 24 h. Los cultivos obtenidos de cada mutante se siembran, en el paso m), en una placa de medio sólido de manera análoga a la descrita en la etapa g), en gotas de entre 5 y 10 µl, y, posteriormente, se siembran unas gotas, típicamente al menos 5 microgotas, de un volumen no superior a 1 µl, del auxótrofo utilizado en el paso j), a una distancia no superior a 5 mm de la gota de mutante a ensayar y entre ellas. Con este ensayo se pretende estimar la capacidad de producción de aminoácido de los mutantes seleccionados en el paso k) mediante la observación de la distancia a la que se produce el crecimiento de las microgotas de auxótrofo sembradas en 4 direcciones alrededor de la colonia del mutante a ensayar.

En la etapa o), una vez transcurrido el periodo de incubación necesario, entre 24 h y 1 semana, en condiciones aerobias y a una temperatura de entre 28°C y 30°C, aproximadamente, se comprueba hasta dónde se ha producido el crecimiento de las microgotas de auxótrofos, inoculadas en la etapa m), seleccionando aquellos mutantes cuya eficiencia sea mayor, es decir, que hayan producido crecimiento del auxótrofo a mayor distancia del mutante, seleccionado en el paso k), a ensayar.

Posteriormente, en la etapa p) se procede a hacer un ensayo de nutrición cruzada [Riccardi et al., Production of amino acids by analog – resistant mutants of the Cyanobacterium *Spirulina platensis* (1981) *Journal of Bacteriology* 147:1002], en el que se procede a esterilizar mediante filtración a través de un filtro de 0,22 µm de diámetro de poro, un cultivo en fase estacionaria, cultivado aeróbicamente a una temperatura entre 28°C y 30°C aproximadamente, de los mutantes a ensayar seleccionados en el paso o), y posteriormente a inocular en el medio filtrado el auxótrofo previamente utilizado en el paso g) o bien en el paso m). A continuación, se procede a incubar bajo condiciones aeróbicas, una temperatura comprendida entre 28°C y 30°C aproximadamente del medio resultante, y se observa si se produce crecimiento en, al menos, 24 h. Si se produce crecimiento de los auxótrofos se considera positiva la producción de aminoácido de las cepas mutantes ensayadas.

Posteriormente, se procede a comprobar que los mutantes seleccionados en el paso p) mantengan las características a)-c) de de la cepa parental, por ejemplo, *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851), tales como promoción de la producción de compuestos que inducen resistencia sistémica en plantas, promoción de la producción de compuestos estimuladores del crecimiento de las plantas y solubilización de

fosfatos insolubles y hierro, de la cepa parental. Adicionalmente, si se desea, se evalúan otras características tales como la colonización de la raíz, la adhesión a semillas, etc,

Aunque existen en la literatura otros microorganismos o cepas mutantes de los mismos con capacidad para la producción de aminoácidos como, por ejemplo, *Corynebacterium glutamicum* [Wendisch et al., Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids (2006) Current Opinion Microbiology 9:268], *Saccharomyces cerevisiae* [Braus. Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway (1991) Microbiological Reviews 55:349] y *Escherichia coli* [Kaderbhai et al., Functional genomics via metabolic footprinting: monitoring metabolite secretion by *Escherichia coli* tryptophan metabolism mutants using FT-IR and direct injection electrospray mass spectrometry (2003) Comparative and Functional Genomics 4:376], entre otros, y se han descrito cepas de *Pseudomonas fluorescens* que producen aminoácidos [Patel et al., Amino acid production by submerged cultivation of *Pseudomonas fluorescens* in gasoline (1985) Folia Microbiologica 30:420], no se ha descrito ningún microorganismo ni cepa mutante que contenga todas las características descritas anteriormente, por lo que *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) contiene mayores ventajas como microorganismo promotor del crecimiento vegetal.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

EJEMPLO 1

Aislamiento de la cepa parental *Pseudomonas fluorescens* silvestre (wt)

Partiendo de una amplia colección de microorganismos aislados de distintas fuentes (suelos y aguas de distinta naturaleza), y caracterizados, procedentes de la colección de aislados de la empresa Bio-Ilíberis Research & Development, S.L., entre los que se encontraban microorganismos pertenecientes a *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp., *Acinetobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., etc., se realizaron diversas pruebas para identificar los microorganismos (cepas) capaces de inducir la resistencia sistémica en plantas frente a agentes fitopatógenos y la estimulación del crecimiento de las plantas mediante la producción de fitohormonas y compuestos con capacidad

para hacer biodisponible nitrógeno proteico, y, además, de solubilizar fosfatos insolubles y hierro.

Se emplearon diversos medios sólidos para seleccionar microorganismos (cepas) con las características mencionadas; en concreto:

5

a) para seleccionar microorganismos que producen compuestos para hacer biodisponible el nitrógeno orgánico (es decir, compuestos que digieren el N-orgánico y/ péptidos presentes en el suelo), se utilizó un medio sólido con leche desnatada [Naik et al., Genetic and functional diversity among fluorescent *Pseudomonads* isolated from the rhizosphere of Banana (2008) *Microbial Ecology* 56:492], cuya composición específica por litro es: peptona 5 g, extracto de levadura 2,5 g, glucosa 1 g, 100 mL de una solución de leche desnatada al 7% (p/v) y agar 15 g; las colonias positivas fueron aquellas colonias que produjeron un halo claro en el medio alrededor de la colonia;

15

b) para seleccionar microorganismos que producen hormonas vegetales (fitohormonas) o compuestos promotores de las mismas, tales como el ácido indolacético (IAA), se utilizó medio LB enmendado cuya composición específica por litro es: bacto-triptona 10 g; extracto de levadura 5 g; NaCl 10 g; *L*-triptófano, 1,025 g; dodecilsulfato sódico (SDS) 600 mg; glicerol 10 mL; y agar 15 g; para la realización de este ensayo se colocó, encima del medio con el microorganismo inoculado, un disco de papel Whatman del número 1 y se dejó incubar; finalizada la incubación se hizo reaccionar el papel Whatman con el reactivo de Salkowsky [Naik et al., Genetic and functional diversity among fluorescent *Pseudomonas* isolated from the rhizosphere of Banana (2008) *Microbial Ecology* 56:492], cuya composición específica por litro es: 2% (v/v) de una solución de FeCl₃ 0,5 M en una solución al 35% (v/v) de ácido perclórico; se consideró positiva la producción de IAA cuando se produjo una coloración rojiza del papel Whatman al cabo de 1 hora de incubación de la reacción;

20

25

30

35

c) para seleccionar microorganismos productores de sideróforos, sustancias quelantes de hierro que permiten que éste sea asimilable por las plantas, se utilizó un medio específico denominado CAS Agar [Alexander and

Zuberer. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria (1991) *Biology Fertility Soils* 12:39], cuya composición específica por litro es: 50 mL de solución de CAS (Chrome Azurol S) [1,21 mg/mL], 10 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mM) disuelto en HCl 10 mM, 40 mL de hexadeciltrimetiamonio (HDTMA) [1,82 mg/mL]; 30,24 g de piperazine-1,4-bis (PIPES), 0,3 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de NaCl, 1 g de NH_4Cl , 2 g de glucosa, 2 g de manitol, 493 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12,5 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,17 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,4 mg de H_3BO_3 , 0,04 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,2 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,08 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y 3 mg de casaminoácidos; se consideró positiva la producción de sideróforos cuando se observaba un halo amarillo en el medio alrededor de la colonia del microorganismo; y

d) para seleccionar microorganismos que solubilizan fosfatos insolubles, se utilizó un medio específico denominado Agar Pikovskaya [Naik et al., Genetic and functional diversity among fluorescent *Pseudomonas* isolated from the rhizosphere of Banana (2008) *Microbial Ecology* 56:492], cuya composición específica por litro es: 0,5 g de extracto de levadura; 10 g de glucosa; 5 g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 0,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g de KCl; 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,1 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; y 15 g de agar; se considera positiva la producción de fosfatasa cuando se producía un halo claro en el medio alrededor de la colonia.

La colonia aislada que presentó el mayor número de características PGPR ("Plant Growth Promoting Rhizobacteria") de las citadas anteriormente, y la más alta eficiencia, es decir, dio la reacción positiva más acusada en el menor tiempo en los medios descritos anteriormente para cada propiedad PGPR, fue una cepa perteneciente a la especie *P. fluorescens*, en adelante identificado como "*P. fluorescens* parental". La especie *P. fluorescens* pertenece al grupo de bacterias señaladas como *Pseudomonas* fluorescentes, es decir, bacterias que son capaces de producir pigmentos fluorescentes (sideróforos) que están asociados a la solubilización y captación de hierro.

EJEMPLO 2

**Obtención de un microorganismo mutante productor de triptófano derivado de
“*P. fluorescens* parental”**

El microorganismo “*P. fluorescens* parental” (Ejemplo 1) se sometió a un proceso de mutagénesis al azar en el que dicho microorganismo se puso en contacto con etilmetanosulfonato (EMS), un agente mutagénico, en un medio M9 [Abril et al., Regulator and enzyme specificities of TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons (1989) Journal of Bacteriology 171:6782], cuya composición específica por litro era: 6,4 g de Na₂HPO₄ · 7H₂O, 1,5 g de KH₂PO₄, 0,25 g de NaCl, 0,5 g de NH₄Cl, 1 mL de MgSO₄ 1 M, 1 mL de 6 ‰ (p/p) de citrato férrico, 25 mL de 20% (p/v) de glucosa y 15 g de agar; al que se le añadió una concentración, equivalente a la concentración mínima inhibitoria (CMI) para dicho microorganismo, “*P. fluorescens* parental”, de 5-fluoro-*DL*-triptófano, un análogo del triptófano, en una concentración igual o superior a 1 mg/mL. Brevemente, sobre las placas conteniendo dicho microorganismo se depositó un filtro que contenía 10 mg de EMS y se incubó a 30°C durante 48 h. Debido al efecto mutagénico del EMS se formó, sobre el filtro, un halo de inhibición que se difuminaba a medida que la concentración del agente mutagénico disminuía. Dentro del halo de inhibición, aparecieron colonias que eran mutantes potenciales que producían exceso de triptófano, que soslayaba el efecto inhibitor del análogo del aminoácido. Todos los posibles mutantes sobreproductores (hiperproductores) de triptófano se traspararon a placas de medio mínimo M9, tal y como se ha descrito previamente.

El microorganismo (mutante de “*P. fluorescens* parental”) más eficiente de los seleccionados ha sido identificado como *Pseudomonas fluorescens* BIRD-5 y depositado el 20 de enero de 2011 en la CECT con el número de acceso CECT 7851.

EJEMPLO 3

Ensayos de resistencia a 5-fluoro-*DL*-triptófano

Se sembraron las colonias de los mutantes sobreproductores de triptófano resultantes del Ejemplo 2 en medio mínimo M9 pero suplementado con 1 mg/mL, 3 mg/mL y 5 mg/mL de 5-fluoro-*DL*-triptófano, respectivamente. Los clones que crecieron en presencia de la concentración más alta del análogo del aminoácido (5-fluoro-*DL*-triptófano) se seleccionaron como mutantes resistentes a 5-fluoro-*DL*-triptófano y susceptibles de salvar el efecto tóxico vía la producción del aminoácido.

El microorganismo más eficiente de los seleccionados fue el identificado como *P. fluorescens* BIRD-5 CECT 7851 [Ejemplo 2].

EJEMPLO 4**Obtención de un microorganismo mutante sobreproductor de fenilalanina derivado de “*P. fluorescens parental*”**

5 Se sometió dicho microorganismo “*P. fluorescens parental*” [Ejemplo 1], a un proceso análogo al descrito en el Ejemplo 2, pero utilizando *p*-fluoro-*DL*-fenilalanina como análogo del aminoácido (fenilalanina) que, en este caso, se suministró a una concentración de 200 µg/mL. Realizado el ensayo, se seleccionó el mutante sobreproductor de fenilalanina más eficiente [BIRD-Phe].

10

EJEMPLO 5**Ensayos de resistencia a *p*-fluoro-*DL*-fenilalanina**

Se sembraron las colonias resultantes del Ejemplo 4 en el medio mínimo M9 [Ejemplo 2], pero suplementado con 1 mg/mL, 3 mg/mL y 5 mg/mL del análogo del aminoácido (*p*-fluoro-*DL*-fenilalanina), seleccionándose aquellos clones que crecían en presencia de la concentración más alta del análogo de aminoácido (*p*-fluoro-*DL*-fenilalanina) como mutantes resistentes a *p*-fluoro-*DL*-fenilalanina y susceptibles de salvar el efecto tóxico vía la producción del aminoácido.

15

20

EJEMPLO 6**Obtención de un microorganismo mutante productor de valina derivado de “*P. fluorescens parental*”**

Se sometió dicho microorganismo “*P. fluorescens parental*” (Ejemplo 1), a un proceso análogo al descrito en el Ejemplo 2, pero utilizando *L*-norvalina suministrado a una concentración de 250 µg/mL. Realizado el ensayo, se seleccionó el mutante sobreproductor de valina más eficiente [BIRD-Val].

25

EJEMPLO 7**Ensayos de resistencia a *L*-norvalina**

30 Se sembraron las colonias de mutantes sobreproductores de valina resultantes del Ejemplo 6 en medio mínimo M9 (Ejemplo 2) pero suplementado con 1 mg/mL, 3 mg/mL y 5 mg/mL de *L*-norvalina, respectivamente. Los clones que crecieron en presencia de la concentración más alta del análogo de aminoácido (*L*-norvalina) se seleccionaron como mutantes resistentes a *L*-norvalina y susceptibles de salvar el efecto tóxico vía la producción del aminoácido.

35

EJEMPLO 8**Promoción del crecimiento vegetal:****Estimulación de la germinación de semillas de plantas hortícolas**

5 Se mezclaron semillas de diversas plantas hortícolas de interés comercial para agricultura, en concreto, diversas variedades de pimiento, pepino, tomate y maíz, con un cultivo puro o con una suspensión acuosa de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) (Ejemplo 2), sin necesidad de agitación; posteriormente se sembraron, al menos, 100 semillas de cada una de las plantas seleccionadas tratadas con dicho microorganismo y el mismo número de semillas de cada una de las plantas tratadas con agua (control),
10 en placas de Petri conteniendo unos 30 g de suelo agrícola.

Las placas resultantes se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente (18-22°C aproximadamente) y a los 3 días se realizó el recuento del número de semillas germinadas en cada caso, tanto las tratadas con *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851),
15 como las que no fueron tratadas con dicho microorganismo, para evaluar el porcentaje de germinación de las semillas. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- porcentaje de germinación de las semillas sin tratar: igual o inferior al 65%; y
- porcentaje de germinación en las semillas tratadas con *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851): igual o superior al 95%.

20 Este ejemplo pone de manifiesto que el microorganismo *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) estimula la germinación de semillas de plantas hortícolas y, por tanto, promueve el crecimiento vegetal de dichas plantas.

EJEMPLO 9**Promoción del crecimiento vegetal:****Estimulación del crecimiento de plantas hortícolas**

25 Se evaluó el potencial fitoestimulador de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) (Ejemplo 2) sobre un soporte sólido orgánico (turba). Brevemente, un cultivo puro o una suspensión acuosa de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) se mezcló con turba,
30 obteniéndose un soporte sólido activo (turba + microorganismo) y, a continuación, dicho soporte sólido activo se mezcló con semillas de diversas plantas hortícolas de interés comercial para agricultura (pimiento, pepino, tomate y maíz) (Ejemplo 8) dando lugar a una mezcla compuesta por el microorganismo [*P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851)], el soporte sólido [turba] y las semillas de planta hortícola a ensayar [Ejemplo
35 8]. Las mezclas resultantes se plantaron en un suelo agrícola, y, a lo largo del tiempo

(en función de la planta), se determinaron los porcentajes de germinación de las semillas, las longitudes del tallo y raíz, la cantidad de frutos y la calidad de los frutos. Como control se sembró el mismo número de semillas de cada planta, mezcladas con el soporte sólido, de manera análoga a la descrita anteriormente, excepto que en lugar
5 de microorganismos se utilizó agua.

El porcentaje de germinación en las semillas tratadas con *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) fue igual o superior al 95%.

A lo largo de las sucesivas cosechas se comprobó que las plantas que habían recibido el tratamiento con *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) incrementaban la
10 longitud de su tallo en, al menos, un 5%, y, en el caso de la raíz aumentó notablemente el número de raíces secundarias, con incrementos del 10% al 50% del peso fresco.

En el caso de la floración y producción de frutos, se produjo un adelantamiento de la cosecha, llegando a ser, en algunos casos, de semanas, en aquellas plantas que
15 habían recibido el tratamiento con *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851).

Este ejemplo pone de manifiesto que el microorganismo *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) aumenta la longitud del tallo y el número de raíces secundarias durante las primeras semanas de desarrollo de las plantas hortícolas, produce un adelantamiento de las cosechas, y, por tanto, promueve el crecimiento vegetal de
20 dichas plantas.

EJEMPLO 10

Promoción del crecimiento vegetal

Estimulación de la germinación de semillas de tipo césped

Se repitió el ensayo descrito en el Ejemplo 8, pero utilizando diversos tipos de
25 semillas de césped tales como *Dichondria repens*, Ryegrass, *Agrostis stolonifera*, *Poa pratensis*, diversos tipos de festuca, etc, observándose que el porcentaje de germinación de las semillas tratadas con *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) (Ejemplo 2) era del 100%, mientras que en el caso de las semillas sin tratar, el porcentaje de
30 germinación fue igual o inferior al 90%.

Este ejemplo pone de manifiesto que el microorganismo *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) estimula la germinación de semillas de césped.

EJEMPLO 11

Promoción del crecimiento vegetal

Estimulación del crecimiento de césped

Se repitió el ensayo descrito en el Ejemplo 9 pero con las semillas de césped mencionadas en el Ejemplo 10, obteniéndose resultados favorables en todos los casos en los que se asoció la semilla con el soporte sólido activo [turba + *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851)] descrito anteriormente. Se observó un incremento en el número de semillas germinadas y un adelantamiento en el desarrollo de las plantas, comprobándose un aumento en el porcentaje de cobertura vegetal, siendo en el caso del suelo sembrado cubierto con las semillas de césped y el soporte sólido activo del 100%, e inferior al 85% en el caso del suelo sembrado con las semillas de césped y el soporte sólido sin microorganismo.

De nuevo, este ejemplo pone de manifiesto que el microorganismo *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) estimula la germinación de semillas de césped.

EJEMPLO 12**Complemento de fertilizantes líquidos**

Se mezcló un cultivo puro o una suspensión acuosa de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) (Ejemplo 2) con diversas formulaciones de fertilizantes líquidos, tales como los productos Herofulvat®, Herocotton® Estarter o Herovital® y otros similares suministrados por la empresa Herogra, fabricante de los mismos. La concentración de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) fue, en todos los casos, de, al menos, 10^5 ufc/mL. El fertilizante líquido suplementado con dicho microorganismo fue utilizado para estimular el crecimiento vegetal de diversas plantas hortícolas de interés comercial, tales como, berenjenas, calabacines, habas, habichuelas, melón, tomates, etc., obteniéndose en todos los casos resultados satisfactorios, concretamente, se obtuvo un aumento de, al menos, un 30% en el crecimiento y un adelantamiento del ciclo de la planta; es decir, las especies hortofrutícolas inoculadas mostraron precocidad en la floración y fructificación de, al menos, 20 días.

EJEMPLO 13**Suplemento de semillas**

Se adhirió *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) (Ejemplo 2) a un polímero orgánico, tal como alginato y el gel de carbopol [mezcla de mucílago viscoso (CARBOPOL 940) y trietanolamina], y se puso en contacto con diversas semillas tanto de interés agronómico, tales como, berenjenas, calabacines, habas, habichuelas, melón, tomates, etc., como ornamental, tales como plantas de lavanda, petunia,

crisantemo, etc. La concentración de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) fue de, al menos, 10^5 ufc/g, obteniéndose en todos los casos resultados satisfactorios, de, al menos, un 10% en el incremento del tamaño tanto de la parte aérea como de la raíz, una mejor coloración de la planta y un adelanto de la floración y la fructificación.

5

EJEMPLO 14

Protección frente a la proliferación de fitopatógenos

Se realizaron unos ensayos con el microorganismo *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) (Ejemplo 2) y con los mutantes resistentes a análogos de aminoácidos (Ejemplos 5 y 7) para determinar su capacidad para detener el crecimiento de hongos, tales como *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solanii*, *Verticillium dahliae*, etc. En dichos ensayos se procedió a sembrar una gota de 10 μ L de un cultivo en fase estacionaria de los hongos a ensayar en el centro de una placa de Petri en un medio específico para el crecimiento de hongos (Masago et al., Selective inhibition of Pythium spp. on a medium for direct isolation of Phytophthora spp. from soils and plants (1976) *Phytopathology* 67:425) denominado Potato Dextrose Agar cuya composición específica por litro es: 4 g de fécula de patata; 20 g de dextrosa y 15 g de agar, frente a gotas del mismo volumen de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) y de los mutantes resistentes a análogos de aminoácidos (Ejemplos 5 y 7) y frente a gotas del mismo volumen de un microorganismo control, que no ejercía ningún efecto sobre el crecimiento de los hongos ensayados como, por ejemplo, *Pseudomonas putida* KT2440. Tras un periodo de incubación, a temperatura ambiente, no inferior a 1 semana, se observó que la cepa *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) inhibía entre un 50% y un 75 % el crecimiento de los hongos.

Este ejemplo pone de manifiesto la capacidad de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) de actuar como retardante del crecimiento de hongos.

EJEMPLO 15

Efecto del caldo de cultivo de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) sobre el crecimiento de hongos

30

Se cultivó la cepa *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) en el medio de cultivo medio mínimo M9 (Abril et al., Regulator and enzyme specificities of TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons (1989) *Journal of Bacteriology* 171:6782), cuya composición específica por litro es: 6,4 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g de KH_2PO_4 , 0,25 g de NaCl, 0,5 g de NH_4Cl , 1 mL de MgSO_4 1 M, 1mL de

35

6 ‰ (p/p) de citrato férrico, con 20 g/L de glucosa como fuente de carbono. La suspensión bacteriana se incubó a una temperatura comprendida entre 15°C y 40°C con agitación hasta que la densidad celular fue igual o superior a 10⁹ ufc/mL. Tras este periodo se centrifugaron las células y el caldo de cultivo se filtró a través de un filtro
5 estéril con un diámetro de poro de 0,22 µm. Se tomaron 10 µL de dicho caldo de cultivo filtrado y se utilizaron en un ensayo con *F. oxysporum* y *V. dahliae* tal como se ha descrito en el Ejemplo 14. El retraso en el crecimiento de los hongos perduró más de una semana después de añadir el caldo en el centro de la placa.

Este ejemplo pone de manifiesto la capacidad del caldo de cultivo de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7852) como agente que retarda el crecimiento de hongos.
10

EJEMPLO 16

Análisis de triptófano a partir del caldo de cultivo de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851)

15 Se extrajeron 200 mL del caldo de cultivo de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) (Ejemplo 15) con 200 mL de acetato de etilo. Tras mezclar, se separaron las fases acuosa y orgánica. Los compuestos de la fase orgánica se concentraron tras evaporar en un rotavapor a 40°C. Mediante cromatografía de capa fina se detectó la presencia de diversos compuestos químicos. La naturaleza de los compuestos fue
20 establecida mediante GC-MS. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que *P. fluorescens* BIRD 5 (CECT 7851) produce *L*-triptófano, *L*-fenilalanina y bencilglicina a concentraciones que oscilan entre 1 y 100 µM según la fase de crecimiento del microorganismo.

25 EJEMPLO 17

Análisis de salicilato en caldos de cultivo de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851)

Pseudomonas fluorescens BIRD-5 (CECT 7851) se inoculó en un medio mínimo M9 suplementado con glucosa 50 mM como fuente de carbono. La
30 composición específica del medio por litro era: 6,4 g de Na₂HPO₄ · 7H₂O, 1,5 g de KH₂PO₄, 0,25 g de NaCl, 0,5 g de NH₄Cl, 1 mL de MgSO₄ 1 M, 1 mL de 6 ‰ (p/p) de citrato férrico; el cultivo se incubó el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria. Las células se separaron del caldo por centrifugación a 8000 g durante 10 minutos y a 4°C en una centrifuga eppendorf 5810 R. Los sobrenadantes se
35 filtraron a través de un filtro 0,22 µm de diámetro de poro y se utilizaron para

cuantificar la concentración de ácido salicílico mediante cromatografía líquida, detectándose concentraciones de salicilato del orden de 10 μ M.

Se extrajeron 200 mL del caldo de cultivo de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) (Ejemplo 15) con 200 mL de acetato de etilo. Tras mezclar, se separaron las fases acuosa y orgánica. Los compuestos de la fase orgánica se concentraron tras evaporar en un rotavapor a 40°C. Mediante cromatografía de capa fina, se detectó la presencia de diversos compuestos químicos. La naturaleza del compuesto (salicilato) y su concentración en el sobrenadante (caldo) del cultivo fueron determinadas en fase estacionaria mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) (lavicoli et al., Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0 (2003) Molecular Plant-Microbe Interactions 16:851). Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que *P. fluorescens* BIRD 5 (CECT 7851) produce salicilato a concentraciones del orden de 1 a 10 μ M.

15

EJEMPLO 18

Capacidad de *P. fluorescens* BIRD-5 para formar biopelículas en superficies abióticas

Se comprobó la capacidad de la cepa *P. fluorescens* BIRD 5 (CECT 7851) para formar biopelículas en distintos tipos de superficies. Se realizaron unos ensayos *in vitro* para los que se incubaron los cultivos durante 12 horas y, posteriormente, se inocularon (1:20) en 50 mL de medio LB o medio mínimo M9, suplementado con glucosa, en placas de microtitulación de poliestireno. Después de 4 h de incubación a 30°C, los pocillos se lavaron con agua desionizada, y se añadió a cada pocillo 100 μ L de una solución de cristal violeta al 1% (p/v). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Transcurrido ese tiempo, los pocillos se lavaron exhaustivamente, y se cuantificó la formación de biopelículas. Para este propósito, el residuo teñido de azul se solubilizó mediante la adición de etanol (200 μ L, dos veces) a cada pocillo. Esta solución se transfirió a un tubo Eppendorf, y se añadió 600 μ L de agua destilada. A continuación, se midió la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700. Ensayos similares, con resultado positivo, se realizaron para comprobar la formación de biopelículas en otras superficies, como polipropileno (tubos Eppendorf), y borosilicato (tubos de vidrio). El microorganismo forma biopelículas que alcanzan densidades de, al menos, 10^8 ufc/cm².

35

EJEMPLO 19

Capacidad de *P. fluorescens* BIRD-5 para formar biopelículas en la superficie de raíces de plantas hortofrutícolas y su implicación en la promoción del crecimiento vegetal y protección frente a agentes adversos

5 Para comprobar la formación de biopelículas sobre la superficie de raíces de plantas de interés agronómico (tomate y maíz), se sumergieron las semillas, previamente esterilizadas en superficie, durante 30 minutos en un cultivo de BIRD-5 (10^8 ufc/mL). Transcurrido ese tiempo, se lavaron las semillas con agua destilada estéril y se procedió a colocarlas en placas de Petri con medio MS (Murashige and
10 Skoog, 1962), y se incubaron a 25°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas oscuridad, hasta que alcanzaron una longitud mínima de 3 cm. Transcurrido ese tiempo se observaron las semillas germinando al microscopio electrónico de barrido, comprobándose la formación de biopelículas en todos los casos.

 Se procedió al trasplante del resto de las plántulas a bandejas de semillero, en
15 las que previamente se había añadido un soporte orgánico (turba). Se observó el crecimiento del resto de las plantas inoculadas, frente a sus respectivos controles no inoculados, durante, al menos, 15 días más. Tras lo cual se comprobó, al menos, un incremento del 30% del peso fresco en las plantas que previamente habían sido inoculadas con *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851). Para comprobar la formación de
20 biopelículas, tras lavar las raíces, las células adheridas se separaron de la raíz por sonicación en un baño de ultrasonidos. Se recuperaron, al menos 10^9 ufc por cm^2 de raíz.

 La formación y el mantenimiento de la biopelícula en la raíz formada por *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851), ocupa por completo dicho nicho ecológico, evitando
25 la colonización de otro tipo de microorganismos rizosféricos que puedan resultar perjudiciales para el desarrollo de la planta. Por otro lado, se ha descrito que la formación de biopelículas por microorganismos promotores del crecimiento vegetal sobre las raíces de plantas, otorga a las mismas una mayor protección frente al ataque de fitopatógenos y frente a situaciones de estrés abiótico (altas o bajas temperaturas,
30 sequía, etc.).

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo de la especie *Pseudomonas fluorescens* BIRD-5 depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso
5 CECT 7851 que tiene las siguientes características:

- a) induce la producción de compuestos que inducen resistencia sistémica en plantas;
- b) induce la producción de compuestos estimuladores del crecimiento de
10 las plantas; y
- c) solubiliza fosfatos insolubles y hierro;

o un mutante de dicho microorganismo que mantiene dichas características.

15 2. Microorganismo según la reivindicación 1, que además, sobreproduce al menos un aminoácido.

3. Microorganismo según la reivindicación 1 ó 2, que sobreproduce un aminoácido seleccionado del grupo formado por *L*-triptófano, *L*-fenilalanina, *L*-valina,
20 *N*-bencilglicina, y cualquiera de sus combinaciones.

4. Un cultivo biológicamente puro de un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

25 5. Un fertilizante suplementado que comprende un fertilizante y un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Un soporte sólido activo que comprende un soporte sólido agrícolamente aceptable y un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

30

7. Una semilla suplementada que comprende una semilla y un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, opcionalmente adherido a un soporte sólido.

8. Un cepellón suplementado que comprende un cepellón y un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, opcionalmente adherido a un soporte sólido.

5 9. Un caldo de cultivo obtenible mediante un procedimiento que comprende las etapas:

- a) cultivar un microorganismo proporcionado por la presente invención en un medio de cultivo mínimo que comprende una fuente de carbono susceptible de ser utilizada por el microorganismo de la invención,
- 10 b) incubar la suspensión bacteriana resultante de la etapa a) a una temperatura comprendida entre 15°C y 40°C hasta alcanzar una densidad celular igual o superior a 10^9 unidades formadoras de colonia (ufc)/mL; y
- c) separar el caldo de cultivo, y, si se desea,
- d) filtrar dicho caldo de cultivo a través de un filtro estéril con un diámetro de
- 15 poro de 0,22 μm .

10, Un procedimiento para estimular el crecimiento de una planta, que comprende aplicar una cantidad eficaz de un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un fertilizante suplementado según la reivindicación 5, un

20 soporte sólido activo según la reivindicación 6, o un caldo de cultivo según la reivindicación 9, a la planta o a la zona de influencia de la raíz, o, alternativamente, sembrar una semilla de dicha planta, suplementada con un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

25 11. Un procedimiento para proteger una planta frente a un agente fitopatógeno, mediante la inducción de resistencia sistémica en la planta frente a dicho agente fitopatógeno, que comprende aplicar una cantidad eficaz de un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un fertilizante suplementado según la

30 cultivo según la reivindicación 9, a la planta o a la zona de influencia de la raíz, o, alternativamente, sembrar una semilla de dicha planta, suplementada con un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

35 12. Un procedimiento para controlar biológicamente un agente fitopatógeno, en donde dicho agente fitopatógeno es susceptible de atacar a dicha planta, que

comprende poner en contacto dicha planta con un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un fertilizante suplementado según la reivindicación 5, un soporte sólido activo según la reivindicación 6, o un caldo de cultivo según la reivindicación 9, bajo condiciones que permiten la adquisición de inmunidad contra dicho agente fitopatógeno mediante la adquisición de un mecanismo de resistencia sistémica.

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, en el que dicho agente fitopatógeno es un hongo o bacteria.

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que dicho hongo fitopatógeno es un hongo del género *Fusarium*, *Rhizoctonia*, o *Phytophthora*.

15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que dicha bacteria fitopatógena es una bacteria del género *Erwinia* o *Ralstonia*.

16. Un procedimiento para restablecer el estado general de la planta tras una situación de estrés ambiental (abiótico), que comprende aplicar una cantidad eficaz de un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un fertilizante suplementado según la reivindicación 5, un soporte sólido activo según la reivindicación 6, o un caldo de cultivo según la reivindicación 9, a la planta o a la zona de influencia de la raíz.

17. Un procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de un fosfato insoluble en un sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble, que comprende poner en contacto dicho sustrato sólido a tratar con un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o con un fertilizante suplementado según la reivindicación 5, o con un soporte sólido activo según la reivindicación 6.

18. Un procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de fosfato insoluble presente en un suelo que contiene un fosfato insoluble, que comprende poner en contacto dicho suelo que contiene un fosfato insoluble a tratar con un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

19. Un procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de hierro insoluble en un sustrato sólido que contiene hierro insoluble, que comprende poner en contacto dicho sustrato sólido a tratar con un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un fertilizante suplementado según la reivindicación 5, o un soporte sólido activo según la reivindicación 6.

20. Un procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de hierro insoluble presente en un suelo que contiene hierro insoluble, que comprende poner en contacto dicho suelo que contiene hierro insoluble a tratar con un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

21. Un procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de un fosfato insoluble y de hierro en un sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble y hierro insoluble, que comprende poner en contacto dicho sustrato sólido a tratar con un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un fertilizante suplementado según la reivindicación 5, o un soporte sólido activo según la reivindicación 6.

22. Un procedimiento para la solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de fosfato insoluble y hierro insoluble presente en un suelo que contiene un fosfato insoluble y hierro insoluble, que comprende poner en contacto dicho suelo que contiene un fosfato insoluble y hierro insoluble a tratar con un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

23. Un procedimiento para la obtención de un mutante de *Pseudomonas fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) que, además de mantener las características a) – c) de la cepa *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) parental, sobreproduce al menos un aminoácido.

24. Un procedimiento para la obtención de un mutante de *Pseudomonas fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) que, además de mantener las características a) – c) de la cepa *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851) parental definidas en la reivindicación 1, sobreproduce al menos un aminoácido, comprendiendo dicho procedimiento los siguientes pasos:

ES 2 534 626 A1

- a) seleccionar y proporcionar un microorganismo aislado de una raíz o de un suelo rizosférico sospechoso de contener microorganismos rizosféricos, en donde dicho microorganismo presenta las siguientes características:
- 5 a) induce la producción de compuestos que inducen resistencia sistémica en plantas;
- b) induce la producción de compuestos estimuladores del crecimiento de las plantas; y
- c) solubiliza fosfatos insolubles y hierro;
- 10 b) inducir una mutación en el microorganismo del paso a) poniendo en contacto dicho microorganismo con un agente mutagénico en un medio de cultivo sólido que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, micronutrientes y un análogo del aminoácido del que se espera que el microorganismo seleccionado en la
- 15 a) excrete al medio externo;
- c) incubar el microorganismo resultante del paso b) en dicho medio de cultivo sólido que comprende dicha fuente de carbono, dicha fuente de nitrógeno, dicha fuente de fósforo, dichos micronutrientes y dicho análogo del aminoácido del que se espera que el microorganismo excrete al medio
- 20 externo, en condiciones aeróbicas y a una temperatura comprendida entre 28°C y 30°C aproximadamente, permitiendo el crecimiento de la cepa susceptible de mutación;
- d) al cabo de un periodo de tiempo de, al menos 24 horas, aislar y purificar las colonias diferenciadas del microorganismo provisto en el paso a) en el área
- 25 de acción del agente mutágeno introducido en el medio sólido en el paso b);
- e) repicar las colonias obtenidas en el paso d) a un medio sólido que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, micronutrientes y un análogo del aminoácido a la concentración a la
- 30 que se ha introducido en el medio en el paso b), para comprobar que dichas colonias son capaces de crecer en presencia del análogo;
- f) sembrar en placas colonias que, aisladas y purificadas en la etapa e), u, opcionalmente, seleccionadas en la etapa d), son capaces de crecer en presencia del análogo de aminoácido correspondiente añadido en la etapa
- 35 b);

- 5 g) sembrar en estría las colonias procedentes del paso d), o del paso e), en un medio sólido que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo y micronutrientes, y, paralelamente a cada estría de las colonias bioensayo, sembrar en estría a una distancia, no mayor de 5 mm, un microorganismo auxótrofo para el aminoácido susceptible de ser producido por las colonias seleccionadas en el paso d), o en el paso e), con el fin de descartar los mutantes obtenidos en el paso d), o posteriormente purificados en el paso e), que su mecanismo para tolerar la presencia del análogo de aminoácido, que se introdujo en el medio en la etapa b), no comprende la producción de aminoácido;
- 10 h) incubar las placas resultantes del paso g) en condiciones aeróbicas a una temperatura comprendida entre 28°C y 30°C aproximadamente;
- i) al cabo de un periodo de tiempo de, al menos 24 horas, observar si se produce crecimiento de los microorganismos auxótrofos, sembrados en estría paralelamente a los mutantes seleccionados en la etapa g);
- 15 j) observar la aparición de crecimiento microbiano en las estrías de los microorganismos auxótrofos, sembrados en la etapa g), en donde la aparición de dicho crecimiento microbiano en dichas estrías de los microorganismos auxótrofos, sembrados en la etapa g), es indicativa de la producción de aminoácido por los mutantes seleccionados en el paso d);
- 20 k) someter las colonias de los mutantes obtenidos en el paso d), o en el paso f), que se consideren positivas tras el paso j), a otra prueba para descartar mutantes menos efectivos en la posible producción de aminoácidos;
- l) cultivar los mutantes seleccionados en el paso k) en un medio líquido que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo y micronutrientes, en condiciones aeróbicas, a una temperatura comprendida entre 28°C y 30°C aproximadamente, durante, al menos, 24 horas;
- 25 m) sembrar unas gotas de cada mutante en un medio sólido que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo y micronutrientes, y, a una distancia mínima, entre ellas y la gota del mutante a ensayar de 5 mm, sembrar unas gotas del auxótrofo para el aminoácido susceptible de ser producido por las colonias seleccionadas en el paso k);
- 30 n) incubar las placas del paso m) bajo condiciones aeróbicas a una temperatura comprendida entre 28°C y 30°C aproximadamente durante, al
- 35

menos, 24 horas y hasta una semana, y, finalizada la incubación, una vez que los mutantes a testar han crecido, comprobar si se ha producido crecimiento en las gotas de auxótrofos y la distancia hasta el mutante a testar hasta donde se ha producido el crecimiento;

- 5 o) seleccionar de entre los mutantes positivos del paso n) aquellos que hayan permitido crecimiento de los auxótrofos a mayor distancia de la gota del mutante a ensayar;
- 10 p) someter los mutantes seleccionados en el paso o) a un ensayo de nutrición cruzada, en el que se incuban durante 24 h aproximadamente, en condiciones aeróbicas, las cepas a ensayar en un medio mínimo líquido que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y una fuente de fósforo a una temperatura comprendida entre 28°C y 30°C aproximadamente; una vez transcurrido ese periodo de tiempo, esterilizar los cultivos mediante filtración por paso a través de un filtro de 0,22 µm de diámetro de poro; inocular un microorganismo auxótrofo para el aminoácido susceptible de ser producido por las cepas mutantes; incubar los cultivos resultantes en condiciones aeróbicas a una temperatura comprendida entre 28°C y 30°C aproximadamente, durante al menos 72 horas, observando cada 24 horas la turbidez del cultivo; transcurrido ese periodo de tiempo, observar si se produce crecimiento; y seleccionar aquellos mutantes que produzcan crecimiento en las cepas auxótrofas porque son considerados positivos para la producción de aminoácidos;
- 15
- 20 q) someter los mutantes seleccionados en el paso p) a pruebas para comprobar si mantienen las características a)-c) de *P. fluorescens* BIRD-5 (CECT 7851); y, si se desea,
- 25 r) una vez realizadas dichas pruebas para comprobar el mantenimiento de las características a)-c) de *P. fluorescens* parental provista en la etapa a), calcular la cantidad de aminoácido excretado por el mutante resultante de la selección llevada a cabo en las etapas o) y p).

30



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201331560

②² Fecha de presentación de la solicitud: 23.10.2013

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12N1/20** (2006.01)
C12R1/39 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PINEDA A et al. Rhizobacteria modify plant-aphid interactions: a case of induced systemic susceptibility. <i>Plant Biology</i> . 2012. VOL: 14 No: Suppl. 1, Sp. Iss. SI Págs: 83-90 ISSN 1435-8603(print) ISSN 1438-8677(electronic) Doi: doi:10.1111/j.1438-8677.2011.00549.x, todo el documento.	1-24
A	GANESHAN GIRIJA et al. <i>Pseudomonas fluorescens</i> , a potential bacterial antagonist to control plant diseases. <i>Journal of Plant Interactions</i> . 2005 VOL: 1 No: 3 Págs: 123-134 ISSN 1742-9145(print) ISSN 1742-9153(electronic) Doi: doi:10.1080/17429140600907043, todo el documento.	1-24
A	KARTHIKEYAN G et al. <i>Pseudomonas fluorescens</i> mediated systemic resistance against urdbean leaf crinkle virus in blackgram (<i>Vigna mungo</i>). <i>Archives of Phytopathology and Plant Protection</i> . 2009 VOL: 42 No: 3 Págs: 201-212 ISSN 0323-5408(print) ISSN 1477-2906(electronic) Doi: doi:10.1080/03235400600982519, todo el documento.	1-24
A	NAIK POPAVATH RAVINDRA et al. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. <i>BMC Microbiology</i> . 2008 VOL: 8 Págs: Article No.: 230 ISSN 1471-2180 Doi: doi:10.1186/1471-2180-8-230, todo el documento.	1-24

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
13.02.2015

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

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

C12N, C12R

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.02.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-24	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-24	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	PINEDA A et al. Rhizobacteria modify plant-aphid interactions: a case of induced systemic susceptibility. <i>Plant Biology</i> (Stuttgart) VOL: 14 No: Suppl. 1, Sp. Iss. SI Págs: 83-90 ISSN 1435-8603(print) ISSN 1438-8677(electronic) Doi: doi:10.1111/j.1438-8677.2011.00549.x	2012
D02	GANESHAN GIRIJA et al. <i>Pseudomonas fluorescens</i> , a potential bacterial antagonist to control plant diseases.. <i>Journal of Plant Interactions</i> VOL: 1 No: 3 Págs: 123-134 ISSN 1742-9145(print) ISSN 1742-9153(electronic)	2005
D03	KARTHIKEYAN G et al. <i>Pseudomonas fluorescens</i> mediated systemic resistance against urdbean leaf crinkle virus in blackgram (<i>Vigna mungo</i>). <i>Archives of Phytopathology and Plant Protection</i> VOL: 42 No: 3 Págs: 201-212 ISSN 0323-5408(print) ISSN 1477-2906(electronic)	2009
D04	NAIK POPAVATH RAVINDRA et al. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. <i>BMC Microbiology</i> VOL: 8 Págs: Article No.: 230 ISSN 1471-2180 Doi: doi:10.1186/1471-2180-8-230	2008

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

En la reivindicación independiente de la solicitud de patente se reivindica un microorganismo de la especie *Pseudomonas fluorescens* BIRD-5 depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 7851 que tiene las siguientes características: a) induce la producción de compuestos que aumentan la resistencia sistémica en plantas; b) induce la producción de compuestos estimuladores del crecimiento de las plantas; c) solubiliza fosfatos insolubles y hierro.

Los documentos D01, D02 y D03 muestran diferentes cepas de *Pseudomonas fluorescens* que inducen resistencia sistémica en las plantas frente a diferentes tipos de patógenos.

El documento D04 refleja como el microorganismo de la especie *Pseudomonas fluorescens* es capaz de solubilizar fosfatos.

En ninguno de los documentos citados se muestra un microorganismo de la especie *Pseudomonas fluorescens* que presente las características de la bacteria *P. fluorescens* objeto de la invención. Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en cualquiera de los documentos D01-D04 las reivindicaciones 1-24 de la solicitud de patente presentan novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la LP11/1986.