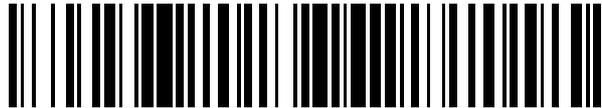


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 908**

21 Número de solicitud: 201431158

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

**31.07.2014**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**01.03.2016**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**29.07.2016**

Fecha de la concesión:

**24.11.2016**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**01.12.2016**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2015/070600**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)  
Hospital Real. C/ Hospicio s/n  
18071 Granada (Granada) ES**

72 Inventor/es:

**BÉJAR LUQUE, María Victoria;  
LLAMAS COMPANY, Inmaculada;  
RUÍZ GARCÍA, Cristina y  
QUESADA ARROQUIA, Emilia**

54 Título: **Uso de Bacillus methylotrophicus como estimulante del crecimiento vegetal y medio de control biológico, y cepas aisladas de dicha especie**

57 Resumen:

Uso de Bacillus methylotrophicus como estimulante del crecimiento vegetal y medio de control biológico, y cepas aisladas de dicha especie.

La presente invención se refiere al uso de microorganismos como estimulantes del crecimiento vegetal y para el control biológico de bacterias, insectos, hongos y nematodos fitopatógenos. Más concretamente, la presente invención se refiere al uso de microorganismos del género Bacillus, concretamente de la especie Bacillus methylotrophicus, a sus cultivos, a composiciones que comprenden estas bacterias, a diferentes métodos de cultivo y a los productos que los comprenden, como estimulantes del crecimiento vegetal y para el control biológico de bacterias, insectos, hongos y nematodos fitopatógenos.

ES 2 561 908 B2

DESCRIPCIÓN

**Uso de *Bacillus methylotrophicus* como estimulante del crecimiento vegetal y medio de control biológico, y cepas aisladas de dicha especie**

5 **CAMPO TÉCNICO DE LA PRESENTE INVENCION**

La presente invención tiene como principal aplicación la agricultura. Las bacterias de la presente invención, así como los productos producidos por las mismas, tienen utilidad como estimulantes del crecimiento vegetal y para el control de patógenos de plantas  
10 como bacterias, insectos, hongos y nematodos.

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

15 **1. Los organismos fitopatógenos**

Los microorganismos fitopatógenos (u organismos fitopatógenos) son una causa importante de las enfermedades de las plantas; determinan cambios en su forma, función o integridad y pueden conducir a su muerte. Entre ellos se encuentran bacterias, hongos y virus. Aunque por su pequeño tamaño (entre 0,2-1 mm), en este  
20 grupo también pueden incluirse algunos nematodos.

Uno de los grupos más importantes son los **hongos fitopatógenos** que incluyen, entre otros, especies de los géneros *Botrytis*, *Pythium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Colleotrichium*, *Eutypa*, *Rhizopus*, *Penicillium* y *Sclerotinia*. Ocasionan daños locales, como machas foliares, hipertrofia de tejidos o tizón, o bien  
25 daños generalizados, cuando afectan a la raíz o al sistema vascular, ocasionando el marchitamiento y la muerte de la planta. Hay más de 8000 especies que atacan a las plantas, algunas son muy específicas, y otras tienen un amplio rango de hospedadores. El impacto económico que estos organismos ocasionan es muy importante. A modo de ejemplo, cuando *Botrytis cinerea* afecta a las viñas se  
30 producen miles de toneladas de pérdidas en la industria vinícola.

Los **virus fitopatógenos** infectan a la planta a través de un vector o por una herida en la misma. Los síntomas que producen son muy diversos: aparición de mosaicos, tumores, marchitamiento, clorosis, anillos cloróticos, necrosis, deformaciones, enanismo, etc. Los síntomas son localizados y la infección es de por vida. Las  
35 infecciones a diferencia de otras producidas por los organismos anteriores no pueden tratarse.

Las enfermedades de plantas producidas por **bacterias** tienen una incidencia menor que las producidas por los hongos o los virus (Vidhyasekaran 2002). Entre las bacterias fitopatógenas se encuentran: *Erwinia amylovora*, responsable de la enfermedad denominada fuego bacteriano, que afecta especialmente a peral, manzano, níspero, membrillero y rosáceas ornamentales; *Erwinia carotova*, productora de podredumbres blandas; *Ralstonia solanacearum*, que causa podredumbre y marchitez en las solanáceas cultivadas, pero también en plantas de más de cincuenta familias; los distintos patovares de *Pseudomonas syringae*, que producen manchas, quemados y ulceraciones; *Agrobacterium tumefaciens*, una bacteria causante de tumores en cuello, raíces y con menor frecuencia en tallo y que tiene un amplio espectro de huéspedes, abarcando más de 700 especies; y *Xanthomonas campestris*, responsable de manchas y quemados en plantas, entre otras.

Los **nematodos** tienen también gran importancia en la agricultura. Son gusanos microscópicos de entre 0,2-1 mm con un estilete en la parte superior que utilizan para alimentarse de la planta. Las larvas entran por cualquier parte del vegetal en contacto con el suelo húmedo, pero principalmente por la punta de los pelos absorbentes radiculares, ya que su estilete no es muy vigoroso. Una vez que se alojan en los tejidos no se mueven ni cambian de situación. Los síntomas se manifiestan por la aparición de los típicos nódulos o engrosamientos en las raíces. Estos daños producen la obstrucción de vasos e impiden la absorción por las raíces, lo que se traduce en un menor desarrollo de las plantas y síntomas de marchitamiento, clorosis y enanismo. Entre los nematodos fitopatógenos se encuentran las especies de los géneros *Meloidogyne*, *Radopholus* y *Pratylenchus*.

## 25 **2. Control de los fitopatógenos**

Para controlar los patógenos de plantas antes mencionados e incrementar los rendimientos de las cosechas se utilizan generalmente productos químicos, en algunos casos con elevada toxicidad asociada, lo cual afecta negativamente al medioambiente. Tanto el agua como la tierra se están contaminando; se están destruyendo seres vivos fundamentales en la agricultura, como los insectos polinizadores, y se está afectando la salud de animales y de humanos. La Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de dichos compuestos y señala ámbitos prioritarios para la puesta en marcha de acciones

innovadoras ecológicamente sostenibles y que aumenten la productividad agrícola y la eficacia de los recursos.

5 Una alternativa al uso indiscriminado de productos químicos en agricultura es la utilización de microorganismos beneficiosos, tanto hongos como bacterias. Es un método no contaminante, respetuoso con el medio ambiente y que reduce notablemente los riesgos de adquisición de resistencia por parte de los patógenos. Algunos de estos microorganismos se describen a continuación.

### 2.1. Hongos beneficiosos

10 Los **hongos** tienen un metabolismo muy versátil y producen una gran variedad de sustancias útiles para el control biológico (definido como un método de control de plagas, enfermedades y malezas que consiste en utilizar organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo). Estas sustancias pueden ser  
15 antibióticos que atacan al agente patógeno o enzimas hidrolíticas. El control biológico puede deberse también a la competencia por nutrientes (se puede definir competencia como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás). Un factor esencial para que exista  
20 competencia es que haya "escasez" de un elemento, si hay exceso no hay competencia. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio, (Horticultura Internacional, Noviembre de 1999, Año 7, nº 26).

Dentro de los hongos, existen diferentes géneros que afectan de manera natural a nematodos fitoparásitos, entre los que se encuentran: *Arthrobotrys*, *Dactilarya*,  
25 *Fusarium*, *Paecilomyces* y *Pochonia* (Kerry, 2000). Otros hongos que también pueden afectar nematodos fitoparásitos son *Trichoderma* spp. y los hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Su mecanismo de acción está basado en la competencia de nutrientes, en producir sustancias tóxicas para los nematodos o bien en segregar compuestos mucilaginosos que los atrapan.

Entre los productos comercializados están Biostat<sup>®</sup>, Bioact<sup>®</sup>, PL plus<sup>®</sup> y Paecyl<sup>®</sup>, todos  
30 ellos preparados de *Paecilomyces lilacinus* (Holland *et al.* 1999); el bionematicida DiTera<sup>®</sup>, cuyo ingrediente activo lo constituyen el hongo *Myrothecium verrucaria*

(López, 2004); y KlamiC<sup>®</sup>, un bionematicida agrícola producido a partir del hongo *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Hernández e Hidalgo-Díaz, 2008).

5 Existe un elevado número de patentes/solicitudes de patente que emplean hongos para el biocontrol o control biológico. Algunas de ellas son las siguientes: US 6306386, US 6890530, US 7118739, US 2004/0176249, US 2005/0096225.

## 2.2. Rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR)

10 Las rizobacterias son microorganismos del suelo que viven en las proximidades de las raíces y que son también muy utilizadas en el biocontrol. Al ser en la mayoría de los casos bacterias que en su estado natural se encuentran en la rizosfera, no suelen dañar a otros organismos beneficiosos y además en muchos casos benefician al ecosistema estimulando el crecimiento vegetal y haciendo más sostenible la producción agrícola. Por otra parte, sus efectos sobre la salud humana son mínimos o nulos. Estos microorganismos, llamados también rizobacterias promotoras del crecimiento o PGPR (de sus siglas en inglés, *plant growth promoting rhizobacteria*), colonizan las raíces de las plantas, compiten y controlan los patógenos de plantas, y actúan como fertilizantes.

20 Las PGPR se caracterizan por su capacidad de estimular el crecimiento de las plantas, a través de mecanismos de tipo directo o indirecto. La estimulación directa incluye la fijación de nitrógeno (Sessitsch *et al.*, 2002); la producción de hormonas, tales como auxinas, giberelinas y citoquininas que aumentan el alargamiento, la división y el tamaño de las raíces (Perrine *et al.*, 2004; García de Salamone *et al.*, 2001); la solubilización de fosfatos (Rodríguez y Fraga, 1999); y la secreción de sideróforos (Carson *et al.*, 2000), entre otros. La estimulación indirecta del crecimiento de plantas incluye diversos mecanismos de biocontrol de los organismos fitopatógenos (bacterias, hongos y nematodos entre otros) entre los que se encuentran: la competencia por nicho ecológico o sustratos; la producción de enzimas hidrolíticos (proteasas, lipasas, quitinasas, colagenasas y glucanasas); la producción de antibióticos (Hassan *et al.*, 1997; Essalmani y Lahlou, 2003); la colonización de las raíces convirtiéndolas en "envolturas biológicas" que retrasan la invasión por los nematodos (Rodríguez-Kábana 25 1997; Loeppler 1997); la alteración de los exudados de las raíces, haciéndolas menos atractivas a los nematodos (Oostendorp, y Sikora, 1990); la producción de sideróforos y la producción por parte de algunas PGPR de compuestos volátiles como la acetoína

y el 2,3 butanodiol que producen un aumento de la resistencia de las plantas a las infecciones (llamada también resistencia sistémica inducida o ISR) (Choudhary y Johri 2009) y la producción de H<sub>2</sub>S que impide el desarrollo de nematodos (Mena 2004 y 5 2005).

La producción de sideróforos por las rizobacterias es un mecanismo de estimulación directa e indirecta del desarrollo de las plantas. El hierro se encuentra en la naturaleza (en aerobiosis) como Fe<sup>3+</sup>, una forma insoluble y no aprovechable por los seres vivos. Las bacterias que presentan sideróforos captan el Fe<sup>3+</sup> y lo transportan al interior del 10 microorganismo transformándolo en Fe<sup>2+</sup> que ya puede ser utilizado en el metabolismo. Las rizobacterias pueden secuestrar el Fe<sup>3+</sup> y con esto impedir el crecimiento de organismos fitopatógenos que no tienen este mecanismo de captación o es menos eficaz (O'Sullivan y O'Gara, 1992; Dowling *et al.*, 1996); es decir por un mecanismo indirecto estimulan el crecimiento de las plantas. Pero la presencia de 15 sideróforos en las rizobacterias presenta también un mecanismo directo de estimulación del crecimiento vegetal.

Las plantas abordan el problema de la baja disponibilidad de hierro en el suelo a través de dos estrategias (Lemanceau *et al.*, 2009). Las plantas con la estrategia I liberan hacia la rizosfera protones y agentes reductores o quelantes, como ácidos 20 orgánicos y fenoles que captan el Fe<sup>3+</sup> que posteriormente es reducido por una reductasa a Fe<sup>2+</sup> e introducido por un transportador al interior de la célula. Se tiene evidencia de que bacterias como *Bacillus subtilis* activan directamente la estrategia I de adquisición de hierro en plantas de *Arabidopsis thaliana*, gracias a la producción de ácidos orgánicos volátiles producidos por el microorganismo. Estos compuestos, 25 además de acidificar el medio, desempeñan funciones de señalización que activan la expresión de la reductasa y del transportador de Fe<sup>2+</sup> para permitir una adecuada asimilación de hierro en las plantas en condiciones de baja disponibilidad de este elemento (Zhang *et al.*, 2009). La segunda estrategia es la captación de hierro a partir de fitosideróforos, unos compuestos con función análoga a los sideróforos pero que 30 poseen una afinidad relativamente menor por el hierro. Por tanto las plantas que son capaces de utilizar los complejos Fe<sup>3+</sup>-sideróforos bacterianos como fuente de hierro aumentan sus posibilidades de supervivencia y adaptación a diferentes condiciones de suelo (Yehuda *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2003).

A través de todos los mecanismos descritos, las PGPR, a determinadas concentraciones en el suelo (al menos se requieren  $10^6$  microorganismos/mL) actúan, además de cómo estimulantes del crecimiento vegetal (fitofortificantes o fitofertilizantes), como agentes de control biológico, evitando el desarrollo de bacterias, hongos y nematodos fitopatógenos.

Entre las bacterias PGPR más utilizadas se encuentran especies de los géneros *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Serratia*, entre otros (Kloepper *et al.* 2004) Otras como *Tsukamurella paurometabola* se utilizan también, por ejemplo, en el bionemático HeberNem®, efectivo en el control de *Meloidogyne* spp., *Radopholus similis* y *Pratylenchus* spp. Su modo de acción está relacionado con la liberación de sulfuro de hidrógeno y quitinasas (Mena, 2004 y 2005).

### 2.1.1. Bacterias del Género *Bacillus*

Unas de las bacterias más utilizadas en agricultura, en el control de patógenos o como PGPR, son las bacterias del género *Bacillus*.

Las bacterias de este género poseen muchas de las características anteriormente mencionadas, y por otra parte la formación de esporas permite a este género su viabilidad a largo plazo en los preparados comerciales, a diferencia de otras rizobacterias como *Pseudomonas*, *Rhizobium* o *Serratia*.

En el mercado existen diversos productos comerciales del género *Bacillus*. Entre ellos se encuentran:

Producto	Empresa	Composición	Control
Serenade®	AgraQuest	<i>B. subtilis</i> QST713	Hongos y bacterias en frutos
Ecoguard®	Novozymes	<i>B. licheniformis</i> SB3086	<i>Sclerotinia homoeocarpa</i>
Kodiak®	Gustafson	<i>B. subtilis</i> GB03	Hongos en algodón, soja y legumbres
Yield Shield®	Gustafson	<i>B. pumilus</i> GB34	Hongos de la soja
BioYield®	Gustafson	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Hongos

		GB99+ <i>B.subtilis</i> GB122	
Subtilex®	Beker Underwood	<i>B. subtilis</i> MB1600	Hongos en legumbres, algodón y soja
Hi Stick L+Subtilex®	Beker Underwood	<i>B. subtilis</i> MB1600+ <i>Rhizobium</i>	Hongos en soja

Otras patentes/solicitudes de patente que describen el uso de microorganismos del género *Bacillus* para el control biológico son:

- Una cepa de *B. velezensis* como biofungicida (US 2010/0179060 A1)
- 5 -Una cepa de *B. pumilus* como nematocida (WO 2013/067275)
- Una cepa de *B. thuringiensis* como nematocida (WO 2010/078708 A1, US 6077506)
- Una cepa de *B. thuringiensis*, sus genes y toxinas como nematocida (EP 0853671)
- Tres cepas de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* y *Sporobolomyces roseus* para el control de fitopatógenos (WO 2004/024865 A2)
- 10 -Varias cepas de *Bacillus spp.* y *Brevibacillus parabrevis* con efecto fungicida y bactericida (WO 2010/142055)

Otras bacterias utilizadas como PGPR y en control biológico están descritas en las patentes/solicitudes de patente siguientes:

- Una cepa de *Serratia* para el control de patógenos (CA2822178 A1)
- 15 -Tres cepas de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mojavensis* y *Azospirillum brasilense* como estimulantes del crecimiento de la planta y bionematicidas (WO2011121408 A1)
- Una preparación conteniendo distintas cepas de *Pseudomonas* como estimulante del crecimiento de plantas y como agente de control biológico (US6048713 A)
- Un cultivo de *Delftia acidovorans* que oxida los sulfuros y estimula el crecimiento
- 20 (US20080242543 A1)

-Cepas de *Rhizobium* para incrementar el crecimiento de las plantas (WO2003089640 A2)

Otras publicaciones (no patentes) relacionadas con *B. methylothrophicus* son:

5 Shan *et al.* (Crop Protection 44 (2013), 29-37) describen el uso de la cepa BC79 de *Bacillus methylothrophicus* en el biocontrol de la enfermedad del arroz, también conocida como añublo del arroz, causada por el hongo *Magnaporthe oryzae* ("rice blast" en inglés).

10 Madhaiyan *et al* (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2010), 60, 2490-2495) describen *Bacillus methylothrophicus* sp., aislada de la rizosfera del arroz.

Khusro *et al.* (Indian Journal of Research (2013) Vol. 2, Issue 11, pages 243-244) describen la mejora de una nueva cepa de *Bacillus methylothrophicus* para la producción aumentada de metabolitos antimicrobianos.

15 A pesar de los numerosos intentos de desarrollar estrategias para la estimulación del crecimiento vegetal y/o para el control biológico de bacterias, hongos y/o nematodos fitopatógenos, existe en la actualidad una imperiosa necesidad de desarrollar estrategias alternativas o estrategias mejores que las actuales, capaces de estimular el crecimiento vegetal y/o controlar biológicamente la presencia de fitopatógenos,  
20 como por ejemplo de bacterias, hongos y/o nematodos.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

25 La presente invención se refiere al uso de microorganismos como estimulantes del crecimiento vegetal y/o para el control biológico de bacterias, insectos, hongos y/o nematodos fitopatógenos. Más concretamente, la presente invención se refiere al uso de microorganismos de la especie ***Bacillus methylothrophicus***, a diferentes métodos de cultivo de dichos microorganismos y a los productos que los comprenden, como estimulantes del crecimiento vegetal y/o para el control biológico de fitopatógenos  
30 como bacterias, insectos, hongos y/o nematodos. Preferiblemente, la presente invención se refiere al uso de microorganismos de la especie ***Bacillus methylothrophicus***, a diferentes métodos de cultivo y a los productos que los

comprenden para el control biológico de fitopatógenos como bacterias, insectos, nematodos y hongos fitopatógenos.

5 En una realización particular, la presente invención se refiere al uso de microorganismos de la especie *Bacillus methylotrophicus*, a diferentes métodos de cultivo de dichos microorganismos y a los productos que los comprenden, como estimulantes del crecimiento vegetal y para el control biológico de fitopatógenos como bacterias, insectos, hongos y nematodos fitopatógenos. Preferiblemente, la presente  
10 invención se refiere al uso de microorganismos de la especie *Bacillus methylotrophicus*, a diferentes métodos de cultivo y a los productos que los comprenden para el control biológico de bacterias fitopatógenas, nematodos fitopatógenos, insectos fitopatógenos y hongos fitopatógenos con excepción de los hongos pertenecientes a la especie *Magnaporthe oryzae*.

15 Preferiblemente, la presente invención se refiere al uso de microorganismos de la de la especie *Bacillus methylotrophicus*, a diferentes métodos de cultivo y a los productos que los comprenden para el control biológico de **bacterias** como por ejemplo aquellas pertenecientes a la especie *Agrobacterium tumefaciens*, **hongos** como por ejemplo  
20 aquellos pertenecientes a las especies *Botrytis cinnerea*, *Aspergillus niger*, *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cactorum*, *Cladosporium* sp., *Rhizopus* sp. y *Penicillium* sp., insectos como por ejemplo la mosca blanca, el pulgón, *Botrytis* y oídio y/o **nematodos** como por ejemplo las especies pertenecientes a los géneros *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*,  
25 *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema*, *Trichodorus*, y en general todos los nematodos parásitos de plantas.

Es también objeto de la presente invención microorganismos pertenecientes a *Bacillus methylotrophicus* cepa XT1 (número de depósito CECT8661) depositada el 23 de abril  
30 de 2014 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) por la Universidad de Granada y/o microorganismos con un alto grado de homología con la cepa XT1 cuya secuencia de ADN sea idéntica en al menos el 99.6%, 99.7%, 99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN de la cepa XT1, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN; y/o microorganismos pertenecientes a  
35 *Bacillus methylotrophicus* cepa XT2 (número de depósito CECT8662) depositada el 23 de abril de 2014 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) por la Universidad

de Granada y/o microorganismos con un alto grado de homología con la cepa XT2 cuya secuencia de ADN sea idéntica en al menos el 99.6%,99.7%, 99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN de la cepa XT2, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN.

Es también objeto de la presente invención un cultivo de bacterias que comprende o consiste en microorganismos pertenecientes a *Bacillus methylotrophicus* cepa XT1 (número de depósito CECT8661) depositada el 23 de abril de 2014 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) por la Universidad de Granada y/o microorganismos con un alto grado de homología con la cepa XT1 cuya secuencia de ADN sea idéntica en al menos el 99.6%, 99.7%, 99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN de la cepa XT1, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN; y/o microorganismos pertenecientes a *Bacillus methylotrophicus* cepa XT2 (número de depósito CECT8662) depositada el 23 de abril de 2014 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) por la Universidad de Granada y/o microorganismos con un alto grado de homología con la cepa XT2 cuya secuencia de ADN sea idéntica en al menos el 99.6%,99.7%, 99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN de la cepa XT2, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN.

La presente invención tiene además por objeto una composición que comprende microorganismos pertenecientes a *Bacillus methylotrophicus* cepa XT1 (número de depósito CECT8661) depositada el 23 de abril de 2014 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) por la Universidad de Granada y/o microorganismos con un alto grado de homología con la cepa XT1 cuya secuencia de ADN sea idéntica en al menos el 99.6%, 99.7%, 99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN de la cepa XT1, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN; y/o microorganismos pertenecientes a *Bacillus methylotrophicus* cepa XT2 (número de depósito CECT8662) depositada el 23 de abril de 2014 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) por la Universidad de Granada y/o microorganismos con un alto grado de homología con la cepa XT2 cuya secuencia de ADN sea idéntica en al menos el 99.6%,99.7%, 99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN de la cepa XT2, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN.

La presente invención tiene por objeto también el uso de las bacterias, cultivos y/o composiciones anteriormente descritas en un procedimiento para estimular el crecimiento vegetal y/o en un procedimiento de control biológico de organismos fitopatógenos.

En particular, es objeto de la presente invención el uso de las bacterias pertenecientes a las cepas XT1 o XT2 (número de depósito CECT8661 y CECT8662, respectivamente, depositadas el 23 de abril de 2014, por la Universidad de Granada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (o aquellos microorganismos que presenten un alto grado de homología con estas cepas), sus cultivos o composiciones que las comprenden, así como de los productos que comprenden alguna de ellas o de los productos obtenibles de ellas o de su cultivo como estimulantes del crecimiento vegetal y/o para el control biológico de patógenos de plantas, como bacterias, insectos, hongos y/o nematodos.

En particular, es objeto de la presente invención el uso de las bacterias pertenecientes a las cepas XT1 o XT2 (número de depósito CECT8661 y CECT8662, respectivamente, depositadas el 23 de abril de 2014, por la Universidad de Granada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (o aquellos microorganismos que presenten un alto grado de homología con estas cepas), sus cultivos o composiciones que las comprenden, así como de los productos que comprenden alguna de ellas o de los productos obtenibles de ellas o de su cultivo como estimulantes del crecimiento vegetal y/o para el control biológico de patógenos de plantas, como hongos (con excepción de hongos pertenecientes a la especie *Magnaporthe oryzae*) y/o nematodos.

Preferiblemente, las bacterias pertenecientes a las cepas XT1 o XT2 (número de depósito CECT8661 y CECT8662, respectivamente, depositadas el 23 de abril de 2014, por la Universidad de Granada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (o aquellos microorganismos que presenten un alto grado de homología con estas cepas), sus cultivos o composiciones que las comprenden, así como los productos que comprenden alguna de ellas o los productos obtenibles de ellas o de su cultivo se usan como estimulantes del crecimiento vegetal y/o para el control biológico de patógenos de plantas, seleccionados de la lista que comprende o consiste en:

Bacterias pertenecientes a la especie *Agrobacterium tumefaciens*, hongos pertenecientes a las especies *Botrytis cinnerea*, *Aspergillus niger*, *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cactorum*,  
5 *Cladosporium* sp. *Rhizopus* sp. y/o *Penicillium* sp. y/o nematodos, como por ejemplo los pertenecientes a los géneros *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema* y/o *Trichodorus*.

Preferiblemente, las bacterias pertenecientes a las cepas XT1 o XT2 (número de  
10 depósito CECT8661 y CECT8662, respectivamente, depositadas el 23 de abril de 2014, por la Universidad de Granada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (o aquellos microorganismos que presenten un alto grado de homología con estas cepas), sus cultivos o composiciones que las comprenden, así como los  
15 productos que comprenden alguna de ellas o los productos obtenibles de ellas o de su cultivo se usan como estimulantes del crecimiento vegetal y/o para el control biológico de nematodos, preferiblemente nematodos pertenecientes una de los siguientes géneros: *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema* y/o *Trichodorus*.

20 Preferiblemente, las bacterias pertenecientes a las cepas XT1 o XT2 (número de depósito CECT8661 y CECT8662, respectivamente, depositadas el 23 de abril de 2014, por la Universidad de Granada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (o aquellos microorganismos que presenten un alto grado de homología con estas cepas), sus cultivos o composiciones que las comprenden, así como los  
25 productos que comprenden alguna de ellas o los productos obtenibles de ellas o de su cultivo se usan como estimulantes del crecimiento vegetal y/o para el control biológico de *Agrobacterium tumefaciens*.

Preferiblemente, las bacterias pertenecientes a las cepas XT1 o XT2 (número de  
30 depósito CECT8661 y CECT8662, respectivamente, depositadas el 23 de abril de 2014, por la Universidad de Granada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (o aquellos microorganismos que presenten un alto grado de homología con estas cepas), sus cultivos o composiciones que las comprenden, así como los  
35 productos que comprenden alguna de ellas o los productos obtenibles de ellas o de su cultivo se usan como estimulantes del crecimiento vegetal y/o para el control biológico de hongos pertenecientes a las especies *Botrytis cinnerea*, *Aspergillus niger*, *Alternaria*

sp., *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cactorum*, *Cladosporium* sp., *Rhizopus* sp. y/o *Penicillium* sp.

- 5 Preferiblemente, las bacterias pertenecientes a las cepas XT1 o XT2 (número de depósito CECT8661 y CECT8662, respectivamente, depositadas el 23 de abril de 2014, por la Universidad de Granada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (o aquellos microorganismos que presenten un alto grado de homología con estas cepas), sus cultivos o composiciones que las comprenden, así como los
- 10 productos que comprenden alguna de ellas o los productos obtenibles de ellas o de su cultivo se usan como estimulantes del crecimiento vegetal y/o para el control biológico de *Botrytis cinerea*.

La presente invención tiene también por objeto un procedimiento para estimular el

15 crecimiento vegetal que comprende las etapas de:

- a. Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones según lo descrito anteriormente; y
- b. Poner en contacto una planta con las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones obtenidas en la etapa a).

20

La presente invención tiene también por objeto un procedimiento para estimular el crecimiento vegetal que comprende las etapas de:

- a. Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones según lo descrito anteriormente; y
- 25 b. Poner en contacto una planta afectada por un fitopatógeno con las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones obtenidas en la etapa a).

La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de control biológico de organismos fitopatógenos que comprende las etapas de:

- 30
- a. Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones según lo descrito anteriormente; y
  - b. Poner en contacto una planta afectada por un fitopatógeno con las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones obtenidas en la etapa a).

35 La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de control biológico de hongos fitopatógenos pertenecientes a las especies *Botrytis cinerea*, *Aspergillus*

*niger*, *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cactorum*, *Cladosporium* sp., *Rhizopus* sp. y/o *Penicillium* sp., preferiblemente pertenecientes a la especie *Botrytis cinerea*, que comprende las etapas de:

- 5           a.       Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones según lo descrito anteriormente; y
- b.       Poner en contacto una planta afectada por un fitopatógeno con las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones obtenidas en la etapa a.

10       La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de control biológico de bacterias fitopatógenas pertenecientes a la especie *Agrobacterium tumefaciens* que comprende las etapas de:

- a.       Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones según lo descrito anteriormente; y
- 15           b.       Poner en contacto una planta afectada por un fitopatógeno con las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones obtenidas en la etapa a.

Por ejemplo, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de control biológico de nematodos fitopatógenos (como por ejemplo especies de *Meloidogyne*,  
20 *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema* y/o *Trichodorus*) que comprende las etapas de:

- a.       Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones según lo descrito anteriormente; y
- b.       Poner en contacto una planta afectada por un fitopatógeno con las  
25 bacterias, cultivos de bacterias o composiciones obtenidas en la etapa a).

Los procedimientos descritos en la presente invención pueden además comprender el uso de un sistema de distribución de las bacterias, cultivos o composiciones de la presente invención. Por ejemplo, los procedimientos de la presente invención pueden  
30 comprender el uso de goteros para la distribución de las bacterias, cultivos o composiciones de la presente invención. Por ejemplo, los procedimientos de la presente invención pueden comprender el uso de goteros autocompensantes para la distribución de las bacterias, cultivos o composiciones de la presente invención. Por ejemplo, los procedimientos de la presente invención pueden comprender el uso de  
35 sistemas de riego localizado (como por ejemplo microaspersores con elementos giratorios o difusores) para la distribución de las bacterias, cultivos o composiciones de

la presente invención. Por ejemplo, los procedimientos de la presente invención pueden comprender el uso de aspersores para la distribución de las bacterias, cultivos o composiciones de la presente invención.

5

En una realización preferente, la presente invención se refiere a los microorganismos aislados de *Bacillus methylotrophicus*, cepas XT1 y/o XT2, depositadas ante la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de depósito CECT8661 y CECT8662, respectivamente.

10

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Con la intención de complementar la descripción que se ha llevado a cabo, así como de ayudar a un mejor entendimiento de las características de la invención, de acuerdo con algunos ejemplos realizados, se muestran aquí, con carácter ilustrativo y no limitante, las siguientes figuras:

15

**Figura 1.** Zona de inhibición de XT1 y XT2 frente a *Botrytis* y zona de inhibición de XT1 frente a *Fusarium*

20

**Figura 2.** Actividad de la cepa XT1 frente a *Agrobacterium tumefaciens*

**Figura 3.** Actividad amilasa de la cepa XT1. Nota: la zona no coloreada corresponde (Z) a la hidrólisis del almidón alrededor de la zona de crecimiento bacteriano (XT1). Prueba realizada en una placa de Petri P, de 15 cm de diámetro con agar almidón; tras el crecimiento se añade una solución de lugol para realizar la lectura.

25

**Figura 4.** Crecimiento de plantas de calabaza tras 50 días de cultivo en maceta a temperatura ambiente. Las macetas B1 y B2 se han inoculado con la cepa XT1 mientras que las B3 y B4 no se han inoculado para utilizarlas de control.

30

**Figura 5.** Nectarino afectado por una plaga de pulgones antes del tratamiento con la cepa XT1

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

35

La presente invención se refiere al uso de microorganismos como estimulantes del

crecimiento vegetal y para el control biológico de bacterias, insectos, hongos y nematodos fitopatógenos. Más concretamente, la presente invención se refiere al uso de microorganismos del género *Bacillus*, concretamente de la especie ***Bacillus***  
 5 ***methylophilus***, a sus cultivos, a composiciones que comprenden estas bacterias, a diferentes métodos de cultivo y a los productos que los comprenden, como estimulantes del crecimiento vegetal y para el control biológico de bacterias, insectos, hongos y nematodos fitopatógenos. Preferiblemente, la presente invención se refiere al uso de microorganismos de la especie ***Bacillus methylophilus***, a sus cultivos, a  
 10 composiciones que comprenden estas bacterias, a diferentes métodos de cultivo y a los productos que los comprenden para el control biológico de bacterias, insectos, nematodos fitopatógenos y hongos.

Preferiblemente, la presente invención se refiere al uso de microorganismos de la especie ***Bacillus methylophilus***, a sus cultivos, a composiciones que comprenden estas bacterias, a diferentes métodos de cultivo y a los productos que los comprenden para el control biológico de bacterias, insectos, nematodos fitopatógenos y hongos, con excepción de los hongos pertenecientes a la especie *Magnaporthe oryzae*.

Preferiblemente, la presente invención se refiere al uso de microorganismos de la especie ***Bacillus methylophilus***, a sus cultivos, a composiciones que comprenden estas bacterias, a diferentes métodos de cultivo y a los productos que los comprenden para el control biológico de bacterias pertenecientes a la especie *Agrobacterium tumefaciens*, de hongos pertenecientes a las especies *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cactorum*, *Cladosporium* sp., *Rhizopus* sp. y/o *Penicillium* sp. y/o de nematodos como por ejemplo especies de *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema*, *Trichodorus*, y en general todos los nematodos parásitos de plantas.

30 El control biológico o biocontrol se define en la presente invención como un método de control de plagas, enfermedades y malezas que consiste en utilizar organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo (organismos fitopatógenos).

35 En una realización particular, la invención se refiere a bacterias que pertenecen a la cepa con número de depósito CECT8661, depositada el 23 de abril de 2014 por la

Universidad de Granada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). A lo largo de la presente memoria se podrá hacer referencia a esta cepa con el término cepa “XT1”.

5

En otra realización particular, la invención se refiere a bacterias que pertenecen a la cepa con número de depósito CECT8662, depositada el 23 de abril de 2014 por la Universidad de Granada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). A lo largo de la presente memoria se podrá hacer referencia a esta cepa con el término cepa “XT2”.

10

Es objeto de la presente invención el uso de las bacterias pertenecientes a las cepas XT1 y/o XT2 en un procedimiento de control biológico de organismos fitopatógenos y/o en un procedimiento de estimulación del crecimiento vegetal.

15

Dichas cepas han sido depositadas por la Universidad de Granada de acuerdo con el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) el 23 de abril de 2014 y les correspondió el nº de depósito CECT8661 (XT1) y CECT8662 (XT2). La dirección de dicha Autoridad Internacional de depósito (Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)) es: Universidad de Valencia / Edificio de investigación / Campus de Burjassot / 46100 Burjassot (Valencia, España).

20

25

Las cepas XT1 y XT2 pertenecen a la especie *Bacillus methylotrophicus*. Esta especie fue descrita por Madhaiyan *et al.* en 2010. Fue aislada de la rizosfera de una planta de arroz (*Oryza sativa*). La especie *Bacillus methylotrophicus* está muy relacionada filogenéticamente con *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens* microorganismos con diversas aplicaciones en el campo de la agricultura. El porcentaje de identidad con estas especies oscila entre 98,2 y 99,2 %. La cepas XT1 y XT2 tienen un 99,5 % y un 99,3%, respectivamente, de identidad con la especie tipo de *B. methylotrophicus*. Esta conclusión se alcanzó tras secuenciar el gen completo del RNAr 16S (1500 pb).

30

La clasificación científica de las cepas XT1 y XT2 de la presente invención es la siguiente: Dominio: *Bacteria* / Filo: *Firmicutes*/ Clase: *Bacilli*/ Orden: *Bacillales*/ Familia: *Bacillaceae* / Género: *Bacillus*.

5

Ambas cepas son bacilos Gram positivos esporulados. Su tamaño oscila entre 1,5 y 3,5 µm de longitud por 0,5 µm de ancho. Originan colonias de color blanco-marfil de bordes irregulares. Son oxidasa negativo y catalasa positivo.

10 Las cepas XT1 y XT2 presentan flagelos peritricos que les confieren una gran movilidad. Originan biofilms o películas que permiten su adherencia a sustratos animados e inanimados y que actúan como factor de protección frente a depredadores existentes en el medio ambiente. La formación de biofilms facilita la adherencia del microorganismo; si se administra por riego por goteo se adherirá a las raíces. Si se  
15 administra por vía foliar se mantendrá en la filosfera. Además la formación de biofilm tanto en las raíces como en las hojas y tallo protege a la planta frente al ataque de otros seres vivos.

En consecuencia, tanto la presencia de flagelos como la formación de biofilm suponen  
20 una ventaja que poseen estas bacterias (XT1 y XT2) para la colonización del hábitat.

Las cepas XT1 y XT2 originan esporas elipsoidales no deformantes. En el medio 2xSG, estas bacterias producen a los tres días más de  $5 \times 10^8$  esporas/mL. Son halotolerantes, crecen óptimamente en un amplio rango de concentraciones de sal  
25 [entre el 0 y el 12% (p/v)]. Crecen óptimamente entre 20-45°C y a pH de entre 5-10. Sus requerimientos nutricionales son escasos: pueden crecer con una gran variedad de compuestos orgánicos como única fuente de carbono, como citrato o sacarosa. Son capaces de crecer con nitrato amónico como única fuente de nitrógeno, sin necesidad de la presencia de extracto de levadura o de una fuente de nitrógeno compleja.

30

La formación de esporas, que permite a la bacteria su mantenimiento en el hábitat en condiciones adversas, y los escasos requerimientos nutricionales que permiten la elaboración de medios de cultivo de bajo coste, hacen a las cepas XT1 y XT2 muy atractivas desde el punto de vista industrial.

35

Las cepas XT1 y XT2 son anaerobias facultativas. Respiran aerobiamente en presencia de oxígeno y, en ausencia de éste, por ejemplo en las raíces y en las cercanías de éstas, realizan fermentación butanodiólica, produciendo 2,3 butanodiol y  
 5 acetoína. Utilizan numerosos azúcares como fuente de carbono y energía, produciendo ácidos a partir de ellos. Entre los azúcares que estas cepas utilizan se encuentran el glicerol, la glucosa, la fructosa, el manitol, el sorbitol, la celobiosa, la lactosa y la sacarosa. También pueden realizar la fijación de nitrógeno, es decir en  
 10 ausencia de una fuente nitrogenada captan el nitrógeno gaseoso y lo transforman en amonio que es la fuente de nitrógeno utilizable por las plantas. Producen dihidroxiacetona y H<sub>2</sub>S.

Las cepas XT1 y XT2 son capaces de sintetizar distintos compuestos estimulantes del desarrollo vegetal, como por ejemplo auxinas y/o compuestos quelantes, como los  
 15 compuestos sideróforos, que captan el Fe<sup>3+</sup> y lo transforman en Fe<sup>2+</sup>. El ion hierro Fe<sup>3+</sup> tiene muy poca solubilidad a pH neutro y por ende no puede ser utilizado por los organismos. Los sideróforos disuelven estos iones a complejos de Fe<sup>2+</sup>, que pueden ser asimilados por mecanismos de transporte activo.

Las cepas XT1 y XT2 son capaces de producir numerosos enzimas extracelulares con una alta capacidad hidrolítica, lo cual facilita la disponibilidad de sustratos a las plantas. Entre otros, las cepas XT1 y XT2 son capaces de producir amilasas que hidrolizan el almidón, ureasa que hidroliza la urea originando amonio, proteasas que hidrolizan la gelatina y la caseína, lipasas que hidrolizan el tween 80 y la lecitina,  
 25 DNasas que hidrolizan el DNA y fosfatasa que hidrolizan el fosfato orgánico y el fosfato inorgánico.

Las cepas XT1 y XT2 producen en medio CAS, utilizado para la detección de sideróforos, una zona de aclaración mayor (7 y 5 mm respectivamente) que la cepa de  
 30 *Bacillus velezensis* de Botrybel usada de control y que produce 3 mm. Ambas cepas crecen mejor que la cepa control (se observa una mayor cantidad de masa bacteriana en la superficie del medio sólido) en medios sólidos libres de nitrógeno, indicando una mayor actividad fijadora de nitrógeno. Por tanto su actividad como fertilizante microbiano es mayor.

35

Las cepas XT1 y XT2 son capaces de formar biofilm. Esta actividad no ha sido determinada en el preparado comercial anterior. Esta capacidad permite a las bacterias adherirse más fácilmente a las raíces o a las hojas de las plantas para  
5 ejercer su acción fitoprotectora o estimulante del crecimiento.

En particular, se ha comprobado que las cepas XT1 y/o XT2 objeto de la presente invención tienen una actividad enzimática superior a la cepa del preparado Botrybel; producen mayores halos de hidrólisis frente al almidón (actividad amilasa, véase la  
10 Figura 3), gelatina y caseína (actividad proteasa), tween 80 y lecitina (actividad lipasa), y mayor actividad fosfatasa, determinada utilizando fosfato de fenoltaleína y fosfato cálcico. Los halos de hidrólisis se observan como la aparición de una zona transparente en el caso de la hidrólisis del almidón, caseína y lecitina; para la gelatina se observa la licuación de la misma, es decir el paso a estado sólido a líquido; en el  
15 caso del tween 80 aparece una zona más opaca de precipitación; y finalmente la actividad fosfatasa se observa con la aparición de un color rosa al adicionar amoníaco en la placa con fosfato de fenoltaleína y la solubilización de fosfato cálcico se analiza viendo la zona transparente que se origina alrededor de la masa bacteriana crecida en un medio con este compuesto. Las actividades se han analizado utilizando como  
20 control la cepa de *Bacillus velezensis* del preparado Botrybel.

En cuanto a sus actividades como agentes de control biológico frente a hongos, se han determinado los valores de inhibición que presentan las cepas XT1 y XT2 frente a  
*Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Alternaria* sp., *Trichoderma viridae*, *Fusarium oxysporum*,  
25 *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cactorum*, *Cladosporium* sp. *Rhizopus* sp. y *Penicillium* sp. Los valores de inhibición de crecimiento son muy significativos en el caso de *Botrytis cinerea*, *Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cactorum*, *Cladosporium* sp. *Rhizopus* sp. y *Penicillium* sp. La actividad fue inferior frente a *Fusarium oxysporum*. El cultivo de la  
30 cepas XT1 y XT2 apenas presentó actividad frente a *Trichoderma viridae*, un hongo beneficioso para las plantas. En general la cepa de *Bacillus* de Botrybel presenta una actividad inferior (y en algunos casos semejante) a las cepas XT1 y XT2 (véase la tabla en el Ejemplo 1, más adelante).

35 Las cepa XT1 presenta también actividad frente a bacterias fitopatógenas como *Agrobacterium tumefaciens*, y sin embargo no afecta el crecimiento de *P. fluorescens* y

*Serratia* spp., bacterias consideradas PGPR. Las cepas XT1 y XT2 tampoco presentan actividad frente a la levadura responsable de la producción del vino, la cerveza y el pan, *Saccharomyces cerevisiae*.

5

Otra ventaja de las cepas XT1 y XT2 es su elevada sensibilidad a los agentes antimicrobianos generalmente utilizados en terapéutica. Son sensibles al ácido nalidixico (30 µg), amoxicilina (2 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (30 µg), cefalotina (30 µg), colistina (10 µg), doxiciclina 30 µg, eritromicina (15 µg), kanamicina (30 µg), nitrofurantoina (300 µg), norfloxacin (5 µg), novobiocina (30 µg), rifampicina (30 µg), trimetoprim sulfametoxazol (1,25 µg-23,75 µg) y vancomicina (30 µg) siguiendo la técnica de difusión en medio sólido (Bauer y Kirby 1966). Por tanto no pueden transferir genes de resistencia a otras poblaciones microbianas de la rizosfera.

15 Las cepas XT1 y XT2 presentan una ventaja adicional frente a hongos empleados para el control biológico y como estimulantes del crecimiento vegetal, que es su fácil cultivo y por tanto su fácil obtención a nivel industrial. La ventaja frente a otras cepas bacterianas de otros géneros descritas con el mismo propósito es la presencia de esporas por parte de las cepas XT1 y XT2, lo que supone una total estabilidad del producto durante el almacenaje y en el medio ambiente cuando las condiciones no son las adecuadas para la multiplicación de dichos microorganismos.

Las cepas XT1 y XT2 producen compuestos que disminuyen el pH como 2,3 butanodiol y acetoina cuando fermentan azúcares en condiciones de anaerobiosis. Además, las cepas XT1 y XT2 son capaces de fijar nitrógeno, producir auxinas y sideróforos y enzimas hidrolíticas. Todas estas características que presentan las cepas XT1 y XT2 son mecanismos de estimulación directa del crecimiento de las plantas (Sessitsch *et al.*, 2002; Perrine *et al.*, 2004; Rodríguez y Fraga, 1999; Carson *et al.* 2000; Essalmani y Lahlou, 2003; Choudhary y Johri 2009).

30

Las cepas XT1 y XT2 objeto de la presente invención producen distintos lipopéptidos, surfactantes. Entre estos lipopéptidos surfactantes se encuentra la surfactina, semejante a la producida por *Bacillus subtilis*, aunque la surfactina producida por la cepa XT1 no presenta ácidos grasos de 12 carbonos (12C) en su cadena lipídica.

35

Además de la surfactina, la cepa XT1 objeto de la presente invención produce otros lipopéptidos surfactantes del tipo fengicina y lichenisina.

- 5 En el caso de la cepa de *Bacillus* del preparado comercial Botrybel no se ha descrito la producción de lipopéptidos.

Tras la extracción de los lipopéptidos, siguiendo el método de Cooper *et al.* 1981, se obtuvo para las cepas XT1 y XT2 un rendimiento de 0,12 g/l y 0,10 g/L de cultivo  
10 respectivamente.

El peso seco celular (PSC) de las cepas XT1 y XT2 es de 2.7 g/L y 2.5 g/L respectivamente. En el caso de la cepa XT1, la concentración micelar crítica (CMC) es de 0.0025% (0.025 mg/mL); con este valor se obtuvo una tensión superficial de  
15 29.7mN/m. En el caso de la surfactina producida por *B. subtilis* y comercializada por Sigma<sup>®</sup> se obtuvieron valores de 26.7 mN/m a la misma CMC. Es decir, la cepa XT1 produce lipopéptidos surfactantes muy activos y con actividad análoga a la surfactina disponible comercialmente.

- 20 Muchos lipopéptidos producidos por especies de *Bacillus* presentan actividad antibiótica, actuando a nivel de las membranas celulares de hongos y bacterias Gram negativas son, por ejemplo, fengicinas, micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, surfactinas, micosubtilinas, fungistatinas (Volpon *et al.*, 2000; Yilmaz *et al.* 2006).

- 25 Los lipopéptidos producidos por la cepa XT1 son una mezcla de ácidos grasos de 13, 14 y 15 átomos de carbono, que se unen a un péptido cíclico por leucina o isoleucina. La proporción relativa de estos ácidos grasos es 1, 6.5 y 5.7 respectivamente.

La producción de enzimas (glucanasas, proteasas, lipasas, fosfatasas y ureasa) junto  
30 con los distintos lipopéptidos, y la liberación de SH<sub>2</sub> son, de acuerdo con la bibliografía (véase estado de la técnica), responsables de la acción de las cepas XT1 y XT2 en el control biológico de hongos, bacterias y nematodos.

También es objeto de la presente invención un procedimiento para el control biológico  
35 de organismos fitopatógenos que comprende las etapas de:

a. Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones de acuerdo con la presente invención; y

5 b. Poner en contacto una planta con las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones obtenidos en la etapa a.

También es objeto de la presente invención un procedimiento para estimular el crecimiento vegetal y/o para el control biológico de nematodos fitopatógenos (como por ejemplo las especies de los géneros *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*,  
10 *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema*, *Trichodorus*, y en general todos los nematodos parásitos de plantas) que comprende las etapas de:

a. Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones de acuerdo con la presente invención; y

15 b. Poner en contacto una planta afectada por un fitopatógeno con las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones obtenidos en la etapa a.

También es objeto de la presente invención un procedimiento para estimular el crecimiento vegetal en plantas (preferiblemente no afectada por organismos fitopatógenos) que comprende las etapas de:

20 a. Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones de acuerdo con la presente invención; y

b. Poner en contacto una planta preferiblemente no afectada por un fitopatógeno con las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones obtenidos en la etapa a.

25

La presente invención tiene también por objeto un procedimiento para estimular el crecimiento vegetal que comprende las etapas de:

a. Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones de acuerdo con la presente invención; y

30 b. Poner en contacto una planta afectada por un fitopatógeno con las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones obtenidos en la etapa a.

En los procedimientos de la presente invención, las bacterias, cultivos y/o composición de la presente invención se pueden poner en contacto con la planta (afectada) por vía  
35 foliar, como por ejemplo mediante pulverización y/o goteo, o por riego tradicional, o por inundación, etc.

Los procedimientos descritos en la presente invención pueden además comprender el uso de un sistema de distribución de las bacterias, cultivos o composiciones de la presente invención. Por ejemplo, los procedimientos de la presente invención pueden comprender el uso de goteros para la distribución de las bacterias, cultivos o composiciones de la presente invención. Por ejemplo, los procedimientos de la presente invención pueden comprender el uso de goteros autocompensantes para la distribución de las bacterias, cultivos o composiciones de la presente invención. Por ejemplo, los procedimientos de la presente invención pueden comprender el uso de sistemas de riego localizado (como por ejemplo microaspersores, opcionalmente con elementos giratorios o difusores) para la distribución de las bacterias, cultivos o composiciones de la presente invención. Por ejemplo, los procedimientos de la presente invención pueden comprender el uso de aspersores para la distribución de las bacterias, cultivos o composiciones de la presente invención.

Los sistemas de riego localizado se pueden definir como métodos de distribución de fluidos (agua, fertilizantes, o, en el caso que nos ocupa, las bacterias, cultivos o composiciones de acuerdo con la presente invención), que, para mantener un nivel adecuado y constante del fluido que distribuye en el suelo, aplica dicho fluido gota a gota, de manera lenta, localizada y uniforme en la masa radicular de la planta.

Los sistemas de riego localizado pueden comprender sistemas de goteo, de exudación y/o de microaspersión.

La persona experta en la materia conoce cómo funcionan los sistemas de riego localizado y cómo hacer uso de ellos.

Un gotero de acuerdo con la presente invención se define como un punto de emisión de las bacterias, cultivos o composiciones de la presente invención en la proximidad de las plantas que se quieren tratar. La persona experta en la materia conoce cómo funciona un gotero y cómo hacer uso de él.

Por lo tanto, también es objeto de la presente invención un procedimiento para el control biológico (prevención) de organismos fitopatógenos, preferiblemente hongos, bacterias y nematodos, que comprende las etapas de:

- 5
- a. Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones de acuerdo con la presente invención; y
  - b. Poner en contacto una planta utilizando para ello un sistema de distribución de las bacterias, cultivos o composiciones de la presente invención, con bacterias, cultivos o composiciones obtenidas en la etapa a.

10 De acuerdo con la presente invención, prevención es la disposición que se hace de forma anticipada para minimizar un riesgo. El objetivo de prevenir de acuerdo con la presente invención es lograr que un perjuicio eventual (infección de organismos fitopatógenos) no ocurra.

15 Por lo tanto, también es objeto de la presente invención un procedimiento para el control biológico (tratamiento) de organismos fitopatógenos, preferiblemente hongos, bacterias y nematodos, que comprende las etapas de:

- 20
- a. Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones de acuerdo con la presente invención; y
  - b. Poner en contacto una planta afectada por un fitopatógeno utilizando para ello un sistema de distribución de las bacterias, cultivos o composiciones de la presente invención, con las bacterias, cultivos o composiciones obtenidas en la etapa a.

25 En el contexto de la presente invención, el término "tratamiento" se entiende como el conjunto de medios cuya finalidad es la curación o el alivio (paliación) de las enfermedades o síntomas.

30 Por lo tanto, también es objeto de la presente invención un procedimiento para el control biológico de organismos fitopatógenos, preferiblemente hongos (excepto los pertenecientes a la especie *Magnaporthe oryzae*), bacterias (preferiblemente *Agrobacterium tumefaciens*) y/o nematodos (como por ejemplo las especies pertenecientes a los géneros *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema*, *Trichodorus*, y en general todos los nematodos parásitos de plantas), que comprende las etapas de:

- 35
- a. Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones de acuerdo con la presente invención; y

- 5 b. Poner en contacto una planta afectada por un fitopatógeno utilizando para ello un sistema de distribución de las bacterias, cultivos o composiciones de la presente invención, con las bacterias, cultivos o composiciones obtenidas en la etapa a.

Por lo tanto, también es objeto de la presente invención un procedimiento para el control biológico de organismos fitopatógenos, preferiblemente de hongos pertenecientes a las especies *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Alternaria* sp.,  
10 *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cactorum*, *Cladosporium* sp., *Rhizopus* sp. y *Penicillium* sp., bacterias, preferiblemente pertenecientes a la especie *Agrobacterium tumefaciens* y/o nematodos, como por ejemplo las especies de los géneros *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema*, *Trichodorus*, y en general todos  
15 los nematodos parásitos de plantas, que comprende las etapas de:

- a. Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones de acuerdo con la presente invención; y  
b. Poner en contacto una planta afectada por un fitopatógeno utilizando para ello un sistema de distribución de las bacterias, cultivos o  
20 composiciones de la presente invención, con bacterias, cultivos o composiciones obtenidos en la etapa a.

Los sistemas de distribución de las bacterias, cultivos o composiciones de la presente invención pueden comprender sistemas de riego localizado, goteros, goteros  
25 autocompensantes, microaspersores, y/o aspersores.

Además, en el procedimiento de la presente invención, las bacterias, cultivos y/o composiciones de la presente invención se pueden poner en contacto con la planta afectada al menos una vez, preferiblemente al menos dos veces, preferiblemente al  
30 menos tres veces, preferiblemente al menos cuatro veces, preferiblemente al menos cinco veces, preferiblemente al menos seis veces, o más.

Además, el intervalo de tiempo entre una aplicación de las bacterias, cultivo a/o composición de la presente invención y la siguiente (en el caso en el que se pongan  
35 en contacto o apliquen más de una vez) es de 2 días, o 3 días, o 5 días, o 10 días, o 15 días, o 20 días, o 30 días.

Preferiblemente las bacterias, cultivo y/o composición de la presente invención se ponen en contacto con la planta afectada dos veces, una a tiempo (t) = 0 y otra a los  
5 30 días.

Preferiblemente las bacterias, cultivo y/o composición de la presente invención se ponen en contacto con la planta afectada una vez cada 10 días, durante 60 días, o una vez cada día durante 8-12 días.

10 Además, en el procedimiento de la presente invención, el cultivo y/o composición de la presente invención que presentan una concentración de microorganismos de al menos  $10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) por mL son utilizados a una dilución entre 0,5-5%.(v/v), como por ejemplo de 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 3% y/o 5% (v/v).

15 Preferiblemente en el procedimiento de la presente invención, el cultivo y/o composición de la presente invención presentan una concentración de microorganismos de 1,5% (v/v) de un preparado que contenga  $5 \times 10^8$  UFC/mL.

Por lo tanto, es objeto de la presente invención un procedimiento para el control  
20 biológico de organismos fitopatógenos, preferiblemente de hongos pertenecientes a las especies *Botrytis cinnerea*, *Aspergillus niger*, *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cactorum*, *Cladosporium* sp., *Rhizopus* sp. y *Penicillium* sp., bacterias, preferiblemente pertenecientes a la especie *Agrobacterium tumefaciens* y/o nematodos, como por ejemplo las especies de los géneros  
25 *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema*, *Trichodorus*, y en general todos los nematodos parásitos de plantas e insectos, preferiblemente la mosca blanca, el pulgón, *Botrytis* y oidio, que comprende las etapas de:

a. Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones de acuerdo  
30 con la presente invención; y

b. Poner en contacto mediante por ejemplo sistemas de distribución, y/o goteros, y/o sistemas de riego localizado, y/o aspersores, al menos una vez, preferiblemente al menos dos veces, preferiblemente al menos tres veces, preferiblemente al menos cuatro veces, preferiblemente al  
35 menos cinco veces, preferiblemente al menos seis veces, o más, a una planta afectada por un fitopatógeno utilizando para ello un sistema de

distribución de las bacterias, cultivos o composiciones de la presente invención, donde los cultivos o composiciones presentan una concentración de microorganismos de al menos  $10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) por mL, utilizados a una dilución entre 0,5-5%.(v/v), como por ejemplo de 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 3% y/o 5% (v/v), con bacterias, cultivos o composiciones obtenidos en la etapa a, preferiblemente una vez cada 10 días, durante 60 días, o una vez cada día durante 8-12 días.

10

Por lo tanto, es objeto de la presente invención un procedimiento para el control biológico de organismos fitopatógenos, preferiblemente de hongos pertenecientes a las especies *Botrytis cinnerea*, *Aspergillus niger*, *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cactorum*, *Cladosporium* sp., *Rhizopus* sp. y *Penicillium* sp., que comprende las etapas de:

15

a. Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones de acuerdo con la presente invención; y

20

b. Poner en contacto mediante por ejemplo sistemas de distribución, y/o goteros, y/o sistemas de riego localizado, y/o aspersores, al menos una vez, preferiblemente al menos dos veces, preferiblemente al menos tres veces, preferiblemente al menos cuatro veces, preferiblemente al menos cinco veces, preferiblemente al menos seis veces, o más, a una planta afectada por un fitopatógeno utilizando para ello un sistema de distribución de las bacterias, cultivos o composiciones de la presente invención, donde los cultivos o composiciones presentan una concentración de microorganismos de al menos  $10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) por mL, utilizados a una dilución entre 0,5-5%.(v/v), como por ejemplo de 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 3% y/o 5% (v/v), con bacterias, cultivos o composiciones obtenidos en la etapa a, preferiblemente una vez cada 10 días, durante 60 días, o una vez cada día durante 8-12 días.

25

30

Por lo tanto, es objeto de la presente invención un procedimiento para el control biológico de organismos fitopatógenos, preferiblemente de bacterias, preferiblemente pertenecientes a la especie *Agrobacterium tumefaciens* que comprende las etapas de:

35

- 5
- 10
- 15
- a. Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones de acuerdo con la presente invención; y
  - b. Poner en contacto mediante por ejemplo sistemas de distribución, y/o goteros, y/o sistemas de riego localizado, y/o aspersores, al menos una vez, preferiblemente al menos dos veces, preferiblemente al menos tres veces, preferiblemente al menos cuatro veces, preferiblemente al menos cinco veces, preferiblemente al menos seis veces, o más, a una planta afectada por un fitopatógeno utilizando para ello un sistema de distribución de las bacterias, cultivos o composiciones de la presente invención, donde los cultivos o composiciones presentan una concentración de microorganismos de al menos  $10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) por mL, utilizados a una dilución entre 0,5-5%.(v/v), como por ejemplo de 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 3% y/o 5% (v/v), con bacterias, cultivos o composiciones obtenidos en la etapa a, preferiblemente una vez cada 10 días, durante 60 días, o una vez cada día durante 8-12 días.

20

Por lo tanto, es objeto de la presente invención un procedimiento para el control biológico de organismos fitopatógenos, preferiblemente de nematodos, como por ejemplo las especies de los géneros *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema*, *Trichodorus*, y en general todos los nematodos parásitos de plantas, que comprende las etapas de:

- 25
- 30
- 35
- a. Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones de acuerdo con la presente invención; y
  - b. Poner en contacto mediante por ejemplo sistemas de distribución, y/o goteros, y/o sistemas de riego localizado, y/o aspersores, al menos una vez, preferiblemente al menos dos veces, preferiblemente al menos tres veces, preferiblemente al menos cuatro veces, preferiblemente al menos cinco veces, preferiblemente al menos seis veces, o más, a una planta afectada por un fitopatógeno utilizando para ello un sistema de distribución de las bacterias, cultivos o composiciones de la presente invención, donde los cultivos o composiciones presentan una concentración de microorganismos de al menos  $10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) por mL, utilizados a una dilución entre 0,5-5%.(v/v), como por ejemplo de 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 3% y/o 5%

(v/v), con bacterias, cultivos o composiciones obtenidos en la etapa a, preferiblemente una vez cada 10 días, durante 60 días, o una vez cada día durante 8-12 días.

5

Por lo tanto, es objeto de la presente invención un procedimiento para estimular el crecimiento vegetal que comprende las etapas de:

- a. Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones de acuerdo con la presente invención; y
- 10 b. Poner en contacto mediante por ejemplo sistemas de distribución, y/o goteros, y/o sistemas de riego localizado, y/o aspersores, al menos una vez, preferiblemente al menos dos veces, preferiblemente al menos tres veces, preferiblemente al menos cuatro veces, preferiblemente al menos cinco veces, preferiblemente al menos seis veces, o más, a una  
15 planta (afectada o no por un fitopatógeno) utilizando para ello un sistema de distribución de las bacterias, cultivos o composiciones de la presente invención, donde los cultivos o composiciones presentan una concentración de microorganismos de al menos  $10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) por mL, utilizados a una dilución entre  
20 0,5-5%.(v/v), como por ejemplo de 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 3% y/o 5% (v/v), con bacterias, cultivos o composiciones obtenidos en la etapa a, preferiblemente una vez cada 10 días, durante 60 días, una vez cada día durante 8-12 días, o dos veces en un periodo de 30 días (una vez a tiempo 0 días y otra vez a tiempo 30 días).

25

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. El término “comprende” engloba también al término “consiste en”. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los  
30 siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## EJEMPLOS

35

### **Ejemplo 1. Aislamiento de las cepas XT1 y XT2**

La cepa XT1 (número de depósito CECT8661), objeto de la invención fue aislada en 1999 de una muestra de la rizosfera de un suelo cercano a la laguna de Capacete, situada en Fuente de Piedra, Málaga (España). La cepa XT2 (número de depósito CECT8662) fue aislada en 2010 en un suelo cercano a la desembocadura del río Velez (Málaga, España). El medio empleado fue el medio MY (Moraine y Rogovin 1966) adicionado con un 7.5 % de sales marinas en el caso de la cepa XT1 y el medio MY con un 3% de sales marinas en el caso de la cepa XT2. Se seleccionaron ambas cepas por sus características entre unas 5000 colonias (buscando aquellas con mayor actividad surfactante mediante el método de Jain *et al.* 1991).

### Ejemplo 2. Uso de las cepas XT1 y XT2 como antifúngicos

La actividad frente a los hongos fue realizada sembrando las cepas XT1 y XT2 en una pequeña extensión en agar malta e incubando durante tres días a 30°C.

Composición del medio agar-malta.

Componentes	g/L
Extracto de malta	30
Agar	15
Agua	1000

15

A continuación se colocó en el extremo opuesto un trozo de agar de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> con micelio del hongo a testar, y a los 20 días y tras incubación a 25°C se procedió a medir la zona de inhibición. Los valores de inhibición obtenidos entre la zona de crecimiento del hongo y de la bacteria expresados en mm fueron los siguientes:

20

“Zona de inhibición” tal y como se entiende en la presente invención se refiere a la máxima y mínima distancia entre el cultivo bacteriano y el cultivo de hongos.

Actividad antifúngica	XT1	XT2	Botrybel
<i>Alternaria sp.</i>	15 y 20	21	18
<i>Aspergillus niger</i>	22 y 30	10 y 25	7 y 10
<i>Botrytis cynerea</i>	22 y 25	25 y 30	18 y 20
<i>Cladosporium sp.</i>	12	10	ND
<i>Fusarium oxysporum</i>	6	4	4
<i>Penicillium sp.</i>	12	10	ND
<i>Phytophthora cactorum</i>	25	18	10
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	16 y 22	15	14 y 20
<i>Rhizopus sp.</i>	20 y 22	15 y 18	18 y 21
<i>Trichoderma viridae</i>	6 y 8	5 y 12	5 y 7

Valores de inhibición máximos y mínimos expresados en mm. ND: No determinado

- 5 Entre los hongos ensayados, la mayor inhibición se logró frente a *Botrytis* y la menor frente a *Fusarium* (Figura 1).

Se determinó la actividad antimicrobiana de las cepas XT1 y XT2 frente a *Saccharomyces cerevisiae* (levadura beneficiosa y con grandes aplicaciones industriales) y se observó la ausencia de la misma, es decir la zona de inhibición fue de cero mm.

**Ejemplo 3. Uso de las cepas XT1 y XT2 como agentes antibacterianos**

La actividad antibacteriana se determinó incorporando en agar tripticasa soja (TSA) estéril a 45°C un cultivo de la cepa a analizar en fase exponencialde crecimiento. A continuación la mezcla resultante se vertió en una placa Petri; una vez solidificado el medio se inoculó en un pocillo 100 µL de sobrenadante de los cultivos. Tras 24 horas de incubación se realizó la medida de la zona de inhibición (Figura 2).

Actividad antibacteriana	XT1	XT2	Botrybel
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	6	R	R

- 20 Resultados expresados en mm de inhibición. R: Resistente

**Ejemplo 4. Uso de las cepas XT1 y XT2 como agentes para control biológico de nematodos**

Las bacterias objeto de la presente invención, como por ejemplo las cepas XT1 y XT2, producen numerosos enzimas (glucanasas, lipasas, proteasas y DNAasas) y H<sub>2</sub>S que de acuerdo con la bibliografía (véase estado de la técnica) evitan el ataque de nematodos. Además producen biofilms (determinados según la técnica de O’Toole y Kolter 1998) que al recubrir la raíz protegen de dicho ataque.

- 30 a) Ensayo en invernadero con cultivo de pepino holandés con problemas recurrentes cada año por exceso de humedad en suelo, dificultad para el enraizamiento y alta incidencia de pudrición en la raíz, así como infección por nematodos.

Se utilizó un sector de 2000 m<sup>2</sup> para inyectar en el riego por goteo y otro sector similar como control. Se aplicaron 7.5 L de cultivo en 6 aplicaciones separadas por un periodo de 10 días (1, 250 l de un cultivo con al menos 10<sup>8</sup> UFC/mL en cada aplicación). Tanto en el sector control como tratamiento se mantuvieron los tratamientos habituales tanto fertilizantes como fitosanitarios. El número de plantas perdidas durante este tratamiento en el sector control fue de 36 mientras que el tratado con la cepa XT1 fue de 6. Las diferencias en la producción fueron también significativas obteniéndose un 30% más de producción en el sector tratado.

#### **Ejemplo 5. Uso de la cepa XT1 como agente para control biológico de insectos**

Además de en el ejemplo 6a en el que se describe la recuperación de cultivos de tomate tras plagas de mosca blanca, pulgón, *Botrytis* y oidio, se llevo a cabo el tratamiento de un nectarino *Prunus persica* var. *nectarina* altamente afectado por una plaga de pulgones, verdes y negros (véase Fig. 5).

Se aplicó durante un mes un cultivo de XT1 con 5 x 10<sup>8</sup> UFC/ml. Concretamente se administró por vía foliar 50 ml de una dilución al 5% de dicho cultivo cada 10 días. Tras la segunda aplicación la población prácticamente desapareció aunque quedaron pequeñas zonas con pulgones en el extremo de algunas hojas que permanecían enrolladas y se eliminaron manualmente. Trascurrido un mes la plaga quedó controlada.

#### **Ejemplo 6. Uso de las cepas XT1 y XT2 como agentes fitofortificantes**

Las cepas XT1 y XT2 mostraron *in vitro* propiedades estimulantes del crecimiento vegetal. Ambas cepas sintetizan numerosos enzimas que hidrolizan moléculas complejas en otras más sencillas utilizables por las plantas. Además producen 2,3 butanodiol y acetoína; fijan nitrógeno y excretan auxinas y sideróforos.

Se realizaron los siguientes experimentos *in vivo* con la cepa XT1 que respaldan esta actividad:

##### a) Ensayo en cultivos de tomate de pera de invernaderos.

Se realizaron tratamientos por vía foliar a tres dosis distintas del caldo de cultivo conteniendo al menos 10<sup>8</sup> UFC/mL (0.5, 1 y 1.5% v/v) mediante pulverización y con

dos repeticiones (a tiempo cero y a los 30 días). En cada tratamiento se trataron 6 plantas. Se utilizó un control, sin tratar. Durante el período del estudio, en el invernadero, y por tanto en el control, hubo varias plagas: mosca blanca, pulgón, oidio y *Botrytis*. El número de plantas que se perdieron en las zonas tratadas con el cultivo de la cepa XT1 fue inferior a las pérdidas en la zona control, siendo la dosis más adecuada la del 1.5% (v/v). Por otra parte el peso de los tomates recolectados de las plantas tratadas fue superior a la de la planta control (véase tabla adjunta).

Tratamiento Experiencia	1.5 % (1)	CONTROL (1)	1.5 % (2)	CONTROL (2)
Plantas perdidas	1	4	0	3
Peso de los tomates (total Kg)	3,6	3,1	3.8	3.1

10

Estos resultados mostraron una tendencia clara entre la aplicación del producto y el incremento en la producción de las plantas con respecto a los controles atribuible al efecto estimulante sobre el metabolismo de la planta. Asimismo las plantas tratadas tuvieron una disminución importante de la plaga por mosca blanca y pulgón y se recuperaron de la infección de *Botrytis* y oidio

15

b) Ensayo en maceta con cultivo de plantas de tomates (*Solanum lycopersicum*), pimientos (género *Capsicum*), calabaza (género *Cucurbita*) y pepino (*Cucumis sativus*) sanas.

20

Se utilizaron cuatro plántulas de 10 cm de altura de cada una de las especies anteriores (tomates (*Solanum lycopersicum*), pimientos (género *Capsicum*), calabaza (género *Cucurbita*) y pepino (*Cucumis sativus*)). Se trasplantaron a macetas de 10 cm de diámetro y 15 cm de altura y se dejaron al aire libre a temperatura ambiente (rango de temperatura 15-32°C). Las macetas se regaron cada 48 h con la misma cantidad de agua (aproximadamente 100 mL). Cada siete días se adicionó a la mitad de las macetas y después de regar 5 mL de una dilución 1/100 de un cultivo de *Bacillus* XT1 con  $5 \times 10^8$  UFC/mL (en la tabla se refiere a este tratamiento con el término "+microorganismo"). La otra mitad se utilizó como control y por tanto no se inoculó. A los 50 días se cortó la parte aérea y se pesó. Igualmente se anotó el número de hojas, flores y frutos así como la altura de las mismas. Los resultados obtenidos se observan en la tabla adjunta. Se obtiene un incremento del peso de la vegetación aérea del

30

86%, un aumento del número de hojas del 57,5% y un incremento del número de frutos y flores del 112,5 y 137,5% respectivamente. Además el tamaño de la planta tratada se incrementó un 10,4%. En la Fig. 4 pueden observarse los resultados en el cultivo de calabaza.

5

		Nº de hojas	Peso parte aérea en gramos (sin fruto)	Altura cm	Frutos	Flores
<b>A1</b>	Pimiento + Microorganismo	13	11,3	47	1	2
<b>A2</b>	Pimiento + Microorganismo	15	13,6	46	1	0
<b>A3</b>	Pimiento	11	7,7	38	1 pequeño	0
<b>A4</b>	Pimiento	13	7,7	38	0	0
<b>Porcentaje de incremento del rendimiento en Pimiento + Microorganismo</b>		<b>16,70%</b>	<b>62%</b>	<b>22,4 %</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
<b>B1</b>	Calabaza + Microorganismo	13	25,8	30	2	7
<b>B2</b>	Calabaza + Microorganismo	12	15,1	37	2	4
<b>B3</b>	Calabaza	9	9,1	30	0	5
<b>B4</b>	Calabaza	7	8,8	31	0	2
<b>Porcentaje de incremento del rendimiento en Calabaza+ Microorganismo</b>		<b>56,20%</b>	<b>128,50%</b>	<b>9,80%</b>	<b>200%</b>	<b>57,1 %</b>
<b>C1</b>	Pepino + Microorganismo	11	25,5	36	1 (de 2cm)	9
<b>C2</b>	Pepino + Microorganismo	17	23,2	30	0	8
<b>C3</b>	Pepino	8	11,5	29	0	7
<b>C4</b>	Pepino	6	12,7	32	0	0
<b>Porcentaje de incremento del rendimiento en Pepino+ Microorganismo</b>		<b>100,00%</b>	<b>101,20%</b>	<b>8,20%</b>	<b>50%</b>	<b>142,9%</b>
<b>D1</b>	Tomate + Microorganismo	12 ramas	22,7	52	1 (6,5 g)	4
<b>D2</b>	Tomate + Microorganismo	10 ramas	17,6	41, torcido por el fruto	1 (51,6 g)	1
<b>D3</b>	Tomate	6 ramas	11,9	46	0	0
<b>D4</b>	Tomate	8 ramas	14,5	46	0	0
<b>Porcentaje de incremento del rendimiento en Tomate+ Microorganismo</b>		<b>57,10%</b>	<b>52,70%</b>	<b>1,10%</b>	<b>100%</b>	<b>250%</b>
<b>Incremento global del rendimiento (valor medio)</b>		<b>57,51%</b>	<b>86,00%</b>	<b>10,40%</b>	<b>112,50%</b>	<b>137,50%</b>

**REIVINDICACIONES**

1. Microorganismo perteneciente a la especie *Bacillus methylotrophicus*, cepa XT1  
5 (número de depósito CECT8661) depositada el 23 de abril de 2014 por la Universidad de Granada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y/o microorganismo con un alto grado de homología con la cepa XT1 cuya secuencia de ADN sea idéntica en al menos el 99.6%, 99.7%, 99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN de la cepa XT1, basándose en la identidad de la totalidad de los  
10 nucleótidos de dichas secuencias de ADN.
2. Cultivo de microorganismos que comprende bacterias de *Bacillus methylotrophicus* XT1 (número de depósito CECT8661) depositada el 23 de abril de 2014 por la Universidad de Granada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y/o cultivo de microorganismos que comprende bacterias con un alto grado de  
15 homología con la cepa XT1 cuya secuencia de ADN sea idéntica en al menos el 99.6%, 99.7%, 99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN de la cepa XT1, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN.
3. Cultivo de microorganismos de acuerdo con la reivindicación 5 que consiste en  
20 bacterias pertenecientes a la especie *Bacillus methylotrophicus*, cepa XT1 (número de depósito CECT8661) depositada 23 de abril de 2014 por la Universidad de Granada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y/o cultivo de microorganismos de acuerdo con la reivindicación 5 que consiste en bacterias con un alto grado de homología con la cepa XT1 cuya secuencia de ADN sea idéntica  
25 en al menos el 99.6%, 99.7%, 99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN de la cepa XT1, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN.
4. Composición que comprende bacterias pertenecientes a la especie *Bacillus methylotrophicus*, cepa XT1 (número de depósito CECT8661) depositada 23 de  
30 abril de 2014 por la Universidad de Granada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y/o bacterias pertenecientes a la especie *Bacillus methylotrophicus* y/o composición que comprende bacterias con un alto grado de homología con la cepa XT1 cuya secuencia de ADN sea idéntica en al menos el 99.6%, 99.7%,

99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN de la cepa XT1, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN.

- 5 5. Uso de los microorganismos de acuerdo con la reivindicación 1 y/o del cultivo de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 2 a 3 y/o de la composición de acuerdo con la reivindicación 4 en un procedimiento para estimular el crecimiento vegetal.
- 10 6. Uso de los microorganismos de acuerdo con la reivindicación 1 y/o del cultivo de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 2 a 3 y/o de la composición de acuerdo con la reivindicación 4 en un procedimiento de control biológico de organismos fitopatógenos.
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que los organismos fitopatógenos son bacterias y/o insectos y/o hongos y/o nematodos.
- 15 8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que los organismos fitopatógenos son nematodos.
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que el nematodo pertenece a una de los siguientes géneros: *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema* o *Trichodorus*.
- 20 10. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que los hongos pertenecen a una o más especies seleccionadas de la lista que consiste en: *Botrytis cinnerea*, *Aspergillus niger*, *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cactorum*, *Cladosporium* sp., *Rhizopus* sp. y *Penicillium* sp.
- 25 11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado por que los hongos pertenecen a la especie *Botrytis cinnerea*.
12. Uso de acuerdo con la reivindicación 7 caracterizado, caracterizado por que las bacterias pertenecen a la especie *Agrobacterium tumefaciens*.
13. Uso de acuerdo con la reivindicación 7 caracterizado, caracterizado por que los insectos son mosca blanca o pulgón
- 30 14. Procedimiento para estimular el crecimiento vegetal que comprende las etapas de:

- 5
- a. Obtener un microorganismo y/o un cultivo de bacterias y/o una composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4; y
  - b. Poner en contacto una planta con el microorganismo y/o cultivo de bacterias y/o composición obtenidas en la etapa a.
15. Procedimiento de control biológico de organismos fitopatógenos que comprende las etapas de:
- a. Obtener un microorganismo y/o un cultivo de bacterias y/o una composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4; y
  - 10 b. Poner en contacto una planta afectada por un fitopatógeno con el microorganismo y/o cultivo de bacterias y/o composición obtenidas en la etapa a.
16. Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado por que el organismo fitopatógeno es un nematodo.
17. Procedimiento según la reivindicación 16, caracterizado por que el nematodo pertenece a una de los siguientes géneros: *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema* o *Trichodorus*.
- 15
18. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-17, caracterizado por que los microorganismos, el cultivo de bacterias y/o composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4 se ponen en contacto con la planta afectada por vía foliar.
- 20
19. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado por que los microorganismos, el cultivo de bacterias y/o composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4 se ponen en contacto con la planta afectada mediante pulverización y/o goteo.
- 25
20. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-19, caracterizado por que los microorganismos, el cultivo de bacterias y/o composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4 se ponen en contacto con la planta afectada mediante el uso de sistemas de riego localizado.
- 30
21. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, caracterizado por que el sistema de riego localizado es un microaspersor.

- 5 22. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-19, caracterizado por que los microorganismos, el cultivo de bacterias y/o composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4 se ponen en contacto con la planta afectada mediante el uso de aspersores.
23. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-22, caracterizado por que los microorganismos, el cultivo de bacterias y/o composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4 se ponen en contacto con la planta afectada mediante el uso de goteros.
- 10 24. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-22, caracterizado por que los microorganismos, el cultivo de bacterias y/o composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4 se ponen en contacto con la planta afectada al menos dos veces, una a  $t=0$  y otra al menos tras 30 días.
- 15 25. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-24, caracterizado por que los microorganismos, el cultivo de bacterias y/o composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 7 presentan una concentración de microorganismos de al menos  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) por ml utilizados a una dilución entre 0,5-5%.(v/v).
- 20 26. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25, caracterizado por que los microorganismos, el cultivo de bacterias o composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4 presentan una concentración de microorganismos de 1,5% (v/v).
- 25 27. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-26 caracterizado por que los microorganismos, el cultivo de bacterias y/o composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4 se ponen en contacto con la planta afectada al menos 6 veces durante 6 días.
- 30 28. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-26 caracterizado por que los microorganismos, el cultivo de bacterias y/o composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4 se ponen en contacto con la planta afectada al menos 2 veces durante 30 días.
29. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-26 caracterizado por que los microorganismos, el cultivo de bacterias y/o composición

de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4 se ponen en contacto con la planta afectada al menos 2 veces durante 30 días, una vez a tiempo  $t=0$  días y otra vez a tiempo  $t=30$  días.

5

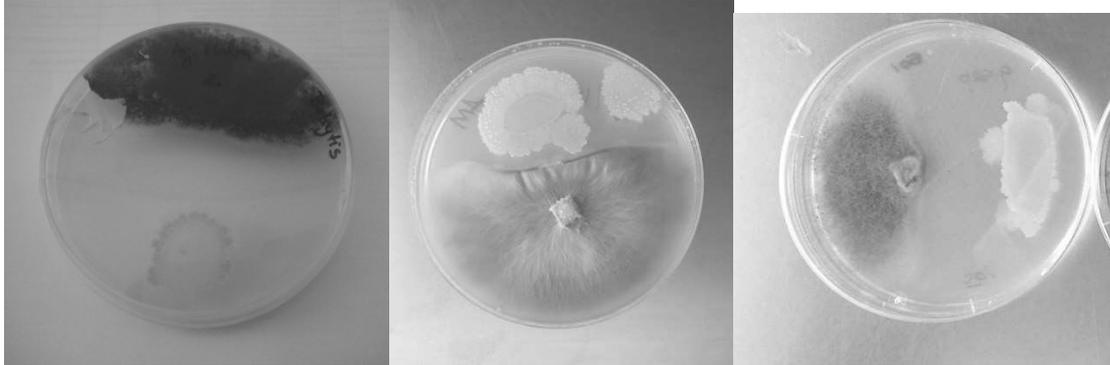
10

15

20

25

Figura 1



*Botrytis y XT1*

*Fusarium y XT1*

*Botrytis y XT2*

Figura 2.

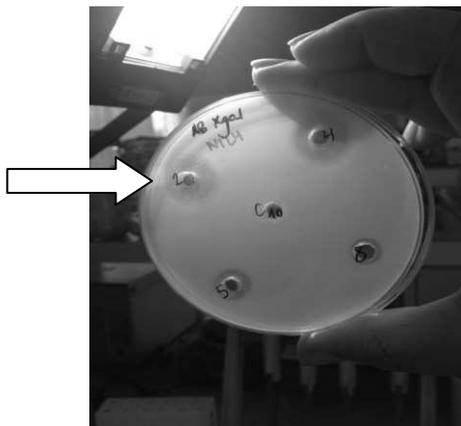
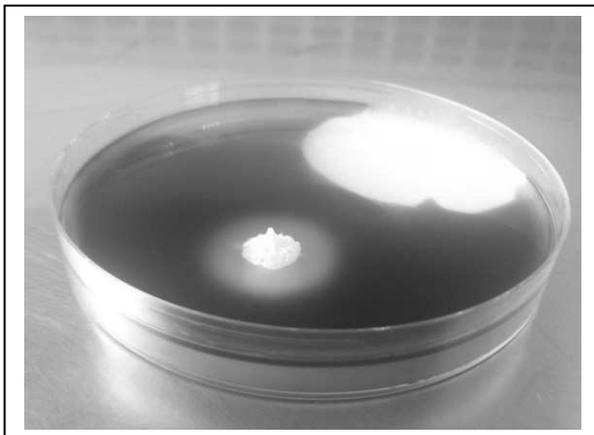


Figura 3.



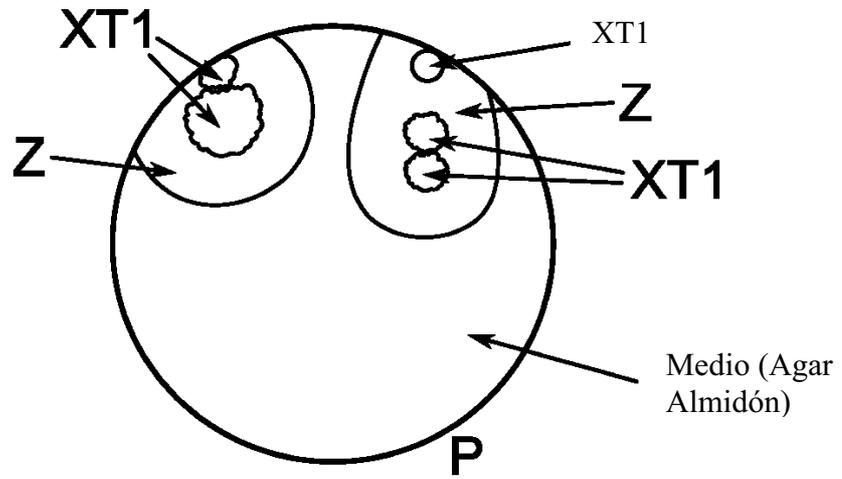


Fig.4



Fig. 5

