

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 538**

21 Número de solicitud: 201530415

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)  
**A01P 1/00** (2006.01)  
**A01P 3/00** (2006.01)  
**C12R 1/07** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**27.03.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**28.09.2016**

Fecha de concesión:

**03.07.2017**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**10.07.2017**

73 Titular/es:

**INDUSTRIAS QUÍMICAS DEL VALLÉS, S.A.**  
**(100.0%)**  
**C/ Rafael de Casanova, 81**  
**08100 Mollet del vallès (Barcelona) ES**

72 Inventor/es:

**MONTESINOS SEGUÍ, Emilio;**  
**MORA PONS, Isabel y**  
**CABREFIGA OLAMENDI, Jordi**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

54 Título: **Cepa de Bacillus amyloliquefaciens y uso en el control de enfermedades causadas por bacterias y hongos en las plantas**

57 Resumen:

Cepa de Bacillus amyloliquefaciens y uso en el control de enfermedades causadas por bacterias y hongos en plantas.

La presente invención se refiere a la cepa Bacillus amyloliquefaciens CECT8836, así como mutantes de la misma, y al uso de dicha cepa como plaguicida en el control de enfermedades de plantas causadas por hongos y bacterias. Aspectos adicionales de la invención se refieren a métodos de preparación de suspensiones y extractos de la cepa B. amyloliquefaciens CECT8836, composiciones plaguicidas que comprenden dicha cepa y un extracto de B. amyloliquefaciens CECT8836 con actividad antimicrobiana. Por último la invención se refiere a un método de control biológico de diferentes enfermedades de plantas causadas por hongos y bacterias tanto en plantas hortícolas como frutales que comprende el tratamiento de estas plantas con la cepa B. amyloliquefaciens CECT8836, una composición que la incluya o un extracto libre de células derivado de B. amyloliquefaciens CECT8836.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

ES 2 584 538 B1

## DESCRIPCIÓN

### Cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* y uso en el control de enfermedades causadas por bacterias y hongos en las plantas

5

La presente invención se refiere al campo de los fitosanitarios, concretamente a una nueva cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* y a su uso en el control biológico de micosis y bacteriosis en cultivos de interés agronómico, especialmente en hortícolas y frutales de pepita.

10

#### ESTADO DE LA TÉCNICA

15

Es bien conocido el impacto que causa el uso masivo de productos fitosanitarios sintéticos en el medio ambiente y en la salud de los consumidores. Por este motivo se ha reorientado el control de enfermedades en las plantas hacia el uso racional de fungicidas y bactericidas, y la aplicación de métodos menos tóxicos y con menor impacto ambiental. En este sentido se tiende a un manejo integrado de plagas (MIP), en el que se combinan diferentes métodos (físicos, mecánicos, químicos, biológicos, genéticos, legales y culturales) con el fin de obtener un buen control de los agentes patógenos reduciendo la cantidad de tratamientos realizados. Esta reorientación en el control ha sido en parte forzada por una demanda social de productos agrícolas más sanos, lo cual ha propiciado un nuevo marco legislativo para productos fitosanitarios en la Unión Europea regulado por la directiva 2009/128/CE y el Reglamento (CE) 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo relativos al uso sostenible y comercialización de los plaguicidas. Esta directiva tiene como objetivo principal la reducción del uso de productos fitosanitarios y su sostenibilidad a través de una gestión integrada de plagas y enfermedades, y de la protección del medio ambiente, estableciendo que los medios de lucha fitosanitaria deben ser preferentemente biológicos y físicos.

30

Actualmente los antibióticos son los productos fitosanitarios que muestran mayor efectividad en el control de enfermedades bacterianas en plantas. Sin embargo, el uso prolongado de antibióticos favorece la generación de cepas resistentes del patógeno que está siendo erradicado, lo cual limita su efectividad. Además, la aparición de resistencia a los antibióticos en bacterias fitopatógenas puede transferirse a otras

35

bacterias, incluyendo patógenos humanos. Este hecho explica la prohibición del uso de antibióticos en agricultura en muchos países, entre los que se encuentra la Unión Europea. Una alternativa a los antibióticos son los antimicrobianos de amplio espectro, tales como los compuestos cúpricos, pero en este caso presentan una eficacia limitada y un impacto ambiental negativo debido a su toxicidad y acumulación en el medio ambiente.

Dentro de este nuevo escenario, los plaguicidas microbianos basados en cepas microbianas, principalmente de especies fúngicas y bacterianas, ofrecen una alternativa o complemento a los plaguicidas químicos. Sin embargo, en la actualidad se dispone de un número reducido de plaguicidas microbianos, siendo además la gran mayoría efectivos en el control de enfermedades fúngicas y no de enfermedades bacterianas.

Así, es de gran interés el desarrollo de plaguicidas microbianos capaces de controlar la bacteriosis en las plantas.

A pesar de los esfuerzos que se están haciendo en la búsqueda y desarrollo de cepas bacterianas activas útiles en el control de infecciones bacterianas y fúngicas, se ha comprobado que la mayoría de estas cepas dan lugar a la producción de metabolitos secundarios tóxicos, carecen de una adecuada aptitud ecológica para la colonización de las plantas, muestran una menor eficacia que los productos químicos sintéticos así como cierta inestabilidad a lo largo del tiempo, lo cual dificulta la formulación de estas cepas en composiciones de larga duración.

En algunos casos se ha tenido evidencia de que las cepas bacterianas no colonizan ni sobreviven de manera efectiva en los órganos del hospedador a proteger, requiriéndose la aplicación de estas cepas a elevadas concentraciones o de formulaciones complejas de dichas cepas, para conseguir un efecto significativo de control de la enfermedad. Además, aunque se trata de productos biológicos que presentan ventajas sobre otros productos plaguicidas de síntesis, el hecho de tratarse de organismos vivos implica que las condiciones ambientales y del hospedador influyen en su actividad biológica, lo que hace que su eficacia sea en general variable y significativamente inferior a la de los productos químicos de referencia.

35

Un aspecto muy importante a tener en cuenta está relacionado con la bioseguridad, uno de los principales requisitos que tienen en cuenta las autoridades responsables de la aprobación de productos de consumo humano, incluyendo productos fitosanitarios (EPA en USA, EFSA en Europa). Así, algunas de las especies que han sido descritas  
5 como buenos agentes de biocontrol se han visto relacionadas con la posible patogenicidad oportunista o no oportunista, como es el caso de las especies *Pseudomonas fluorescens* y *Pantoea agglomerans*, que han sido citadas como causantes de infecciones y sepsis hospitalarias, consideración que puede ser un obstáculo en la autorización de cepas de estas especies para su uso como agente  
10 plaguicida. En la UE, las cepas *Pseudomonas fluorescens* A506, *Pantoea vagans* C9-1, *P. agglomerans* E325 y *P. agglomerans* P10c no han sido consideradas como QPS (“Qualified presumption of safety” en inglés, que significa presunción cualificada de seguridad, un término similar al conocido GRAS, “generally recognized as safe”, que significa generalmente reconocido como seguro).

15

Otro punto importante a tener en cuenta es el proceso de producción a nivel industrial. La necesidad de disponer de productos con una mayor vida útil requiere la preparación de estos productos preferiblemente en forma de sólido deshidratado. Los procesos de deshidratación utilizados requieren etapas de secado que afectan significativamente a  
20 la viabilidad de los microorganismos, limitando el rendimiento del proceso, en especial en bacterias Gram negativas como *Pseudomonas* sp. y *Pantoea* sp., las cuales son más sensibles a los tratamientos térmicos y de deshidratación que las Gram positivas. En el caso concreto del género *Bacillus*, el hecho que produzcan esporas favorece enormemente su formulación en forma de polvo deshidratado ya que la pérdida de  
25 viabilidad es muy baja, obteniendo un rendimiento muy elevado al final del proceso.

En este sentido, son varias las cepas de *Bacillus subtilis* o especies relacionadas que se han desarrollado como agentes de biocontrol, como son la cepa QST713 (Bonaterra A et al, “Prospects and limitations of microbial biopesticides for control of  
30 bacterial and fungal pomefruit tree diseases”, Trees 2012, vol. 26, pp. 215-226) y la FZB42 de la especie *B. amyloliquefaciens*. Ambas cepas son el ingrediente activo de productos autorizados o pendientes de autorización para su uso como plaguicidas microbianos. Sin embargo, muchas de estas cepas muestran un perfil de actividad limitado y normalmente focalizado en el control de hongos.

35

Por lo tanto, a pesar de los esfuerzos realizados existe todavía la necesidad de cepas bacterianas alternativas a las existentes que, aun siendo eficientes en el control de hongos fitopatógenos, también muestren eficacia en el control de la infección causada por bacterias fitopatógenas y que superen los inconvenientes del estado de la técnica.

5

#### EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han aislado una nueva cepa del género *Bacillus* que se caracteriza por tener un espectro de actividad amplio, siendo muy eficiente en el control de diferentes patógenos bacterianos y fúngicos. Además supera algunas de las limitaciones mostradas por otras cepas ya descritas en el estado de la técnica, tal y como se muestra más abajo.

Así, en un primer aspecto la invención se refiere a una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT8836, o un mutante de la misma, donde dicho mutante: (a) se obtiene utilizando la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CECT8836 como producto de partida y (b) mantiene la actividad antagonista así como la capacidad de colonizar o sobrevivir de la cepa de partida en una parte de una planta.

20

La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* de la invención, aislada de flores de *Lobularia maritima* de la región de Girona, fue depositada por el solicitante de acuerdo con el Tratado de Budapest el 11 de febrero de 2015 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), situada en la Universidad de Valencia, Edificio de investigación, Campus de Burjassot, 46100 Burjassot, Valencia, España. La cepa recibió el número de acceso CECT8836 después de que fuera considerada viable.

La invención también se refiere a mutantes de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CECT8836. Se entiende por “mutantes” bacterias que se obtienen utilizando como producto de partida la cepa *B. amyloliquefaciens* CECT8836 de la invención y que se caracterizan por mantener las propiedades de dicha cepa depositada, en cuanto a la capacidad antagonista frente a bacterias fitopatógenas, bioseguridad y aptitud ecológica en la colonización de las plantas. Un “mutante” de *B. amyloliquefaciens* CECT8836 se entiende también según la presente invención como una “variante” de *B. amyloliquefaciens* CECT8836. El experto en la materia entenderá que usando la

35

cepa de la invención como material de partida es posible obtener de forma rutinaria, por ejemplo mediante mutagénesis espontánea o mutación dirigida, mutantes que conserven las características y ventajas pertinentes descritas en la presente memoria. Los métodos para obtener mutantes de una cepa bacteriana concreta son conocidos en la técnica. Un ejemplo puede encontrarse en (Sambrook, J. y Russell, D.W. "Molecular cloning: a laboratory Manual", Capítulo 13, "Mutagenesis", Cold Spring Harbor, 3ª Ed., 2001).

En la presente invención el término "cepa de la invención" se refiere no sólo a la cepa *B. amyloliquefaciens* CECT8836, sino también a mutantes de la misma.

Tal y como se ilustra más abajo, la cepa de la invención se caracteriza por mostrar:

- (i) actividad antagonista de la cepa de partida frente a las bacterias *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv *syringae*, *P. syringae* pv *tomato*, *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria*, *X. arboricola* pv *fragariae*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium radiobacter*, *Pectobacterium carotovorum*, y a los hongos *Phytophthora cinnamomi*, *P. cactorum*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Pytium ultimum* (FIG. 3);
- (ii) presencia de los genes *fenD*, *srfAA*, *bacA*, *spaS*, *bmyB*, e *ituC* relacionados con la síntesis de péptidos antimicrobianos (FIG. 1). Además, se comprobó que esta cepa también incluía los genes *beaS*, *dfnM*, *dhbA* y *mInI*, relacionados con la síntesis de poliquétidos y otros compuestos diversos con actividad antimicrobiana;
- (iii) capacidad de colonizar o sobrevivir en una parte aérea de una planta; y
- (iv) capacidad de inhibir infecciones causadas por *E. amylovora* y *P. syringae* pv. *syringae* en plantas de peral, por *P. syringae* pv. *tomato* en plantas de tomate; y por *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* en plantas de pimiento (FIG. 6).

La elevada actividad antagonista de la cepa de la invención es en parte consecuencia de la producción de compuestos peptídicos y no peptídicos que inhiben el crecimiento de bacterias y hongos patógenos. Entre estos compuestos cabe destacar las surfactinas, fengicinas, bacilomicinas, iturinas, bacilisina y subtilina. Aunque muchas cepas de *Bacillus* contienen genes relacionados con la biosíntesis de estos péptidos

con actividad antimicrobiana, no todas ellas muestran actividad antagonista frente a patógenos vegetales, ya sean bacterianos o fúngicos. En este sentido, en el Ejemplo 1 de abajo se muestra que muchas de las cepas de *Bacillus* (que poseen genes de síntesis de alguno de estos péptidos antimicrobianos), no tienen actividad antagonista relevante frente a hongos y bacterias fitopatógenas. En cambio, en la FIG. 3 se puede observar que la cepa *B. amyloliquefaciens* CECT8836 de la invención exhibe un amplio espectro de antagonismo destacado frente a diferentes fitopatógenos bacterianos, además de frente a diferentes hongos fitopatógenos. Dicho efecto antagonista sorprendente también queda reflejado en la FIG. 6, donde se muestra la efectividad de la cepa de la invención en la inhibición de infecciones de *E. amylovora*, *P. syringae* pv. *syringae* en plantas de peral, *P. syringae* pv *tomato* en plantas de tomate y *X. axonopodis* pv *vesicatoria* en plantas de pimiento. En el Ejemplo 1 también queda demostrado que la cepa de la invención tiene la capacidad de producir todas las isoformas detectables de los diferentes péptidos antimicrobianos analizados (FIG. 2), donde se incluyen las surfactinas, fengicinas, bacilomicinas e iturinas. Además, sorprendentemente, como ya se ha indicado más arriba, la cepa CECT8836 presenta 6 genes relacionados con la síntesis de péptidos antimicrobianos, así como otros 4 genes relacionados con la síntesis de poliquétidos y otros compuestos diversos con actividad antimicrobiana. Este perfil antimicrobiano, esto es, elevado número de genes involucrados en la síntesis de diferentes antimicrobianos para un amplio abanico de actividades, es algo peculiar y sorprendente de la cepa de la invención cuando se compara con otras cepas de *Bacillus* procedentes de ambientes naturales relacionados con las plantas (ver FIG. 1 donde se listan otras cepas de *Bacillus* aisladas del medio).

25

En la presente invención el término “aptitud ecológica” se refiere a la capacidad de un microorganismo para colonizar, multiplicarse en condiciones favorables, y sobrevivir en condiciones adversas en un ambiente (en este caso planta).

30 En la presente invención el término “parte aérea de una planta” incluye la flor, hoja y fruto de una planta.

La planta puede ser una planta de tipo hortícola o frutal, tal como un peral, tomate, coliflor o pimiento, entre otras.

35

La presencia de los genes relacionados con la síntesis de péptidos antimicrobianos puede determinarse mediante parejas de cebadores definidos por las secuencias SEC ID NO: 3-26 tal y como se describe en el Ejemplo 1. La actividad antagonista *in vitro* y *ex vivo* contra hongos y bacterias fitopatógenas puede determinarse según se describe en los Ejemplos 3-4. La capacidad para inhibir infecciones de *E. amylovora*, *P. syringae* pv *syringae*, *P. syringae* pv *tomato* y *X. axonopodis* pv *vesicatoria* puede determinarse según se describe en el Ejemplo 3. La capacidad de colonización y supervivencia en plantas en condiciones de campo se describe en el Ejemplo 6. La capacidad de control de enfermedades fúngicas y bacterianas en condiciones de campo puede determinarse según se describe en el Ejemplo 7.

La cepa de la invención posee varias ventajas que la hacen especialmente adecuada para su uso en el control integrado de plagas. En la presente invención el término “control integrado de plagas” (o “manejo integrado de plagas”) tiene el significado habitual en el campo de la agricultura, donde se entiende como una estrategia que usa una gran variedad de métodos complementarios: físicos, mecánicos, químicos, biológicos, genéticos, legales y culturales para el control de plagas. Estos métodos se aplican en tres etapas: prevención, observación y aplicación. Es un método ecológico que aspira a reducir o eliminar el uso de plaguicidas de síntesis química y a minimizar el impacto en el medio ambiente. Se habla también de control ecológico o biológico de plagas. Así, en la presente invención los términos “control de plagas”, “control biológico de plagas” se usan indistintamente y se refieren al control integrado de plagas.

Para empezar, los miembros de la especie *B. amyloliquefaciens* en particular, son seguros al estar consideradas como GRAS por la FDA en Estados Unidos y como QPS por la EFSA en la Unión Europea. En consecuencia, la cepa de la invención es adecuada para su uso en agricultura.

Además de su reconocida bioseguridad, tal y como se muestra más abajo la cepa de la invención es altamente efectiva en la prevención de infecciones causadas por diferentes patógenos bacterianos y fúngicos en plantas hortícolas y frutales. De los datos mostrados más abajo se puede concluir, además, que esta efectividad se debe principalmente a su elevada actividad antagonista frente a estos patógenos y a su sorprendente aptitud ecológica para colonizar y sobrevivir en los órganos aéreos de la

plantas como hojas, frutos y/o flores. En particular, en el Ejemplo 6 se muestra que la cepa de la invención tiene una elevada capacidad para colonizar y sobrevivir en órganos de las plantas a proteger contra diferentes infecciones, especialmente bacterianas. Esta sorprendente aptitud ecológica es muy importante para el control biológico de las plagas.

En vista de lo anterior, en otro aspecto la invención se refiere al uso de la cepa *B. amyloliquefaciens* CECT8836 o un mutante de la misma como plaguicida en plantas.

En la presente invención el término “plaguicida” se entiende con su acepción habitual en el campo de la agronomía como un producto destinado a matar, repeler, regular o interrumpir el crecimiento de seres vivos considerados plagas. Queda claro que, debido a la naturaleza de la cepa *B. amyloliquefaciens* CECT8836 o mutante de la misma, en la presente invención se entiende que “plaguicida” es un plaguicida biológico o ecológico, también denominado bioplaguicida. En el ámbito de la presente invención el término “plaguicida” tendría el mismo significado que el término “fitosanitario”.

En un aspecto más la invención proporciona el uso de la cepa *B. amyloliquefaciens* CECT8836 o mutante de la misma en el control de una enfermedad causada por una bacteria u hongo en una planta.

En la presente invención el término “control de la enfermedad” significa que previene, cura o erradica la enfermedad.

En una realización, la planta a ser tratada es una planta hortícola o frutal.

En otra realización la cepa de la invención o un mutante de la misma se usa en la prevención de infecciones causadas por bacterias u hongos en plantas.

De cara a su uso como plaguicida en plantas, es importante poder obtener grandes cantidades de células viables de la cepa. Tal y como se muestra en el Ejemplo 5, una vez concentrada y liofilizada, la composición muestra una viabilidad celular del 100% que se mantiene durante el almacenaje.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de una suspensión de células viables derivada de la cepa de la invención que comprende: (i) inocular la cepa de la invención en un medio de cultivo apropiado, y (ii) someter el medio de cultivo inoculado de la etapa (i) a condiciones propicias para el crecimiento de la cepa.

La expresión “derivada de la cepa de la invención” significa que la suspensión se obtiene a partir de la cepa objeto de la presente invención.

La cepa de la invención puede inocularse en el medio de cultivo a una concentración final entre el 1 y el 5%. Preferentemente el cultivo a inocular se encuentra en fase de crecimiento exponencial. El crecimiento celular se frenará al alcanzar, preferentemente, una concentración celular entre  $7 \times 10^8$  y  $2 \times 10^9$  UFC/ml. Medios de cultivo adecuados para el crecimiento de la cepa de la invención son medios sintéticos, como LB (de Lysogenic broth) y PM (medio de producción salino), o medios de origen vegetal como melazas (por ejemplo de caña de azúcar, remolacha). Condiciones adecuadas para el crecimiento de la cepa son temperaturas entre 25 y 35 °C, pH entre 6 y 8, y concentración de oxígeno entre 10 y 50%. El crecimiento de la cepa de la invención se produce bajo agitación. Un ejemplo del procedimiento detallado de obtención de células de la cepa de la invención está reflejado en el Ejemplo 4.

En otra realización del procedimiento de obtención de la suspensión, las células se separan del medio para obtener una suspensión concentrada. Técnicas de separación adecuadas incluyen la centrifugación o filtración del cultivo. Llevando a cabo la centrifugación del cultivo, por ejemplo, a un mínimo de 8000 rpm, se obtienen células en el sedimento, que se resuspenden en parte del medio de cultivo o en un medio tamponado adecuado de manera que la concentración de la cepa sea de aproximadamente alrededor de  $10^{10}$  UFC/ml.

Una vez obtenida la suspensión, ésta puede someterse a una etapa de deshidratación. La deshidratación se puede llevar a cabo mediante un proceso de liofilización. Alternativamente, se puede deshidratar la suspensión por secado mediante lecho fluidizado. Otra opción es deshidratar la suspensión mediante atomización. En este sentido otra característica ventajosa de la cepa de la invención

es que exhibe una elevada resistencia a los procesos de deshidratación que son habituales en la obtención de microorganismos a escala industrial. Con el fin de mejorar la viabilidad de las células se puede añadir a la suspensión, antes de llevar a cabo el proceso de deshidratación, un ingrediente osmoprotector inerte.

5

En otra realización particular, el procedimiento para la obtención de una suspensión de células viables de la invención comprende resuspender las células resultantes de la etapa de separación en un tampón adecuado para dar lugar a una suspensión concentrada de células.

10

Con vistas a su uso en el control de plagas, los agentes plaguicidas suelen ser formulados en composiciones que incluyen también aditivos adecuados para el uso agrícola para el cual están diseñados. Las composiciones de la invención pueden ser sólidas (incluyendo, por ejemplo, concentrado de bacterias deshidratadas) o líquidas (incluyendo suspensiones concentradas de bacterias).

15

“Compuestos adecuados para el uso agrícola” se refiere a aquellos compuestos y/o materiales que son adecuados para su uso en agricultura. En general dichos compuestos deben ser no tóxicos para el ser humano y preferentemente deben ser respetuosos con el medio ambiente.

20

En una realización particular, las composiciones plaguicidas de la invención pueden contener compuestos para mejorar la adherencia de las cepas en las plantas a tratar, compuestos fitofortificantes, nutrientes, humectantes, estabilizantes, osmoprotectores, antioxidantes, protectores solares, compuestos tamponadores o combinaciones de los mismos. Algunos compuestos para mejorar la adherencia son gelatinas, almidones, pectinas, alginatos y diversos tipos de gomas como xantanos. Muchos de estos compuestos son también humectantes. Entre los protectores solares se incluyen colorantes como rojo Congo. Los fitofortificantes son compuestos que pueden favorecer que los cultivos desarrollen vigor o tolerancia frente a patógenos o a condiciones ambientales adversas como, por ejemplo, análogos del ácido jasmónico y ciertos estimulantes de las defensas en plantas como harpinas, quitosanos, y laminarinas. En particular las composiciones plaguicidas de la invención contienen al menos un osmoprotector como aditivo. Ejemplos de compuestos osmoprotectores son betaínas, aminoácidos y trealosa.

35

En un aspecto más la presente invención proporciona una composición que comprende la cepa de la invención y al menos un agente plaguicida adicional, dicho plaguicida adicional no afectando negativamente a la actividad de la cepa CECT8836.

5 En una realización, la composición de la invención comprende un plaguicida adicional. En otra realización, el agente plaguicida adicional se selecciona del grupo que consiste en una cepa bacteriana efectiva en el control de una infección bacteriana o fúngica, un fungicida, un insecticida o un nematocida.

10 En una realización particular, el agente plaguicida adicional es otra cepa bacteriana con efectividad en el control de la infección bacteriana o fúngica. Entre las cepas bacterianas con efectividad en el control de varias infecciones, además de la cepa de la invención CECT8836, se encuentra otra cepa *B. amyloliquefaciens* la CECT8837, o un mutante de la misma, aislada por los inventores de la presente invención. En una  
15 realización, la composición de la invención comprende *B. amyloliquefaciens* CECT8836 y *B. amyloliquefaciens* CECT8837 junto con aditivos adecuados para el uso agrícola.

En otro aspecto la invención se refiere a una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*  
20 depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT8837, o un mutante de la misma, donde dicho mutante: (a) se obtiene utilizando la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CECT8837 como producto de partida, y (b) se caracteriza por mantener la actividad antagonista así como la capacidad de colonizar o sobrevivir de la cepa de partida en una parte aérea de una planta.

25

La cepa *B. amyloliquefaciens* CECT8837, aislada de hojas de un abeto común procedente de la región de Lleida (España), fue depositada por el solicitante de acuerdo con el Tratado de Budapest el 11 de febrero de 2015 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), situada en la Universidad de Valencia, Edificio de  
30 investigación, Campus de Burjassot, 46100 Burjassot, Valencia, España. La cepa de *B. amyloliquefaciens* recibió el número de acceso CECT8837.

Se entiende por "mutante" una bacteria que se obtiene utilizando como producto de partida la cepa *B. amyloliquefaciens* CECT8837 de la invención y que se caracteriza  
35 por mantener las propiedades de dicha cepa depositada, en cuanto a la capacidad

antagonista frente a bacterias fitopatógenas, bioseguridad y aptitud ecológica en la colonización de las plantas. Un “mutante” de *B. amyloliquefaciens* CECT8837 se entiende también según la presente invención como una “variante” de *B. amyloliquefaciens* CECT8837. El experto en la materia entenderá que usando esta  
5 cepa de la invención como material de partida es posible obtener de forma rutinaria, por ejemplo mediante mutagénesis espontánea o mutación dirigida, mutantes que conserven las características y ventajas pertinentes descritas en la presente memoria. Los métodos para obtener mutantes de una cepa bacteriana concreta son conocidos en la técnica. Un ejemplo puede encontrarse en (Sambrook, J. et al., 2001 citado más  
10 arriba).

Al igual que la cepa *B. amyloliquefaciens* CECT8836, los inventores han observado que la cepa *B. amyloliquefaciens* CECT8837, así como mutantes de la misma, tienen propiedades ventajosas para su uso como plaguicidas en el control de infecciones  
15 causadas por hongos o bacterias en plantas, especialmente las causadas por bacterias. Esta cepa es segura, posee una elevada actividad antagonista frente a gran diversidad de fitopatógenos bacterianos y fúngicos y es capaz de colonizar y sobrevivir en las plantas en diferentes condiciones ambientales. Tal y como se ilustra en los ejemplos de más abajo, la cepa CECT8837 se caracteriza por tener las siguientes  
20 propiedades:

- (i) actividad antagonista frente a las bacterias *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv *syringae*, *P. syringae* pv *tomato*, *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria*, *X. arboricola* pv *fragariae*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *E. carotorova*, y a los hongos *Phytophthora cinnamomi*, *P. cactorum*, *Penicillium expansum*, *Stemphylium vesicarium*, *Botrytis cinerea*, y *Pytium ultimum*; y no presenta antagonismo contra *F. oxysporum*;
- (ii) presencia de los genes *fenD*, *srfAA*, *bacA*, *bmyB*, e *ituC*,  
30 relacionados con la síntesis de péptidos antimicrobianos (FIG. 1). Además, se comprobó que esta cepa también incluía los genes *beaS*, *dfnM*, *dhbA* y *mlnI*, relacionados con la síntesis de poliquétidos y otros compuestos diversos con actividad antimicrobiana. Esta cepa no presenta los genes *spaS* a diferencia  
35 de la cepa CECT8836;

- (iii) capacidad de colonizar o sobrevivir en una parte aérea de la planta;  
y
- (iv) capacidad de inhibir infecciones causadas por *E. amylovora* y *P. syringae* pv. *syringae* en plantas de peral, por *P. syringae* pv. *tomato* en plantas de tomate; y por *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* en plantas de pimiento.

Así, la presente invención se refiere al uso de la cepa CECT8837 como plaguicida en una planta, particularmente en la prevención, curación o erradicación de enfermedades causadas por bacterias u hongos en plantas, preferiblemente del tipo hortícola o frutal. Otros aspectos se refieren a composiciones que comprenden la cepa o un mutante de la misma junto con compuestos aceptables a nivel agrícola y/o al menos un plaguicida, dichos compuestos no afectando negativamente a la actividad de la cepa CECT8837 y dichos plaguicidas siendo tal y como se definen más arriba; y al uso de estas composiciones en el control de la infección causada por bacterias u hongos en plantas.

La invención también se refiere a un procedimiento de obtención de una suspensión de células viables a partir de *B. amyloliquefaciens* CECT8837 o un mutante de la misma, que es análogo al descrito para *B. amyloliquefaciens* CECT8836.

La invención se refiere en otro aspecto a un extracto libre de células derivado de la cepa *B. amyloliquefaciens* CECT8836, *B. amyloliquefaciens* CECT8837, o de un mutante de las mismas, obtenible mediante el procedimiento que comprende: (i) inocular la cepa en un medio de cultivo apropiado, (ii) someter el medio de cultivo inoculado a condiciones de crecimiento adecuadas, (iii) separar las células del medio de cultivo de la etapa (ii), (iv) recoger extracto libre de células; y (v) opcionalmente someter el extracto libre de células a un proceso de concentración.

Medios de cultivo, condiciones de inoculación y condiciones de crecimiento adecuados para la cepa de la invención para la obtención del extracto son los mismos que los descritos más arriba para el procedimiento de obtención de una suspensión de células a partir de la cepa CECT8836 o una mutante de la misma. Preferentemente, el crecimiento de las células se frenará en fase estacionaria, más preferentemente después de 30-48 horas. En otra realización, la etapa (ii) tiene lugar a una temperatura

- entre 25 y 35°C, un pH entre 6 y 9, y una concentración de oxígeno entre 10 y 50%, con agitación hasta alcanzar una concentración celular superior a  $1 \times 10^9$  UFC/ml. En cuanto a la etapa (v), ejemplos no limitantes de procesos de concentración adecuados son deshidratación (liofilización, atomización), filtración, ultrafiltración, precipitación, centrifugación, y cromatografía. Adicionalmente, con el fin de incrementar su actividad, el extracto de la invención se puede someter a un proceso de fraccionamiento para separar las fracciones más activas. Preferentemente, el fraccionamiento comprende una cromatografía de discriminación molecular y/o de fase reversa.
- 10 Los extractos de la cepa *B. amyloliquefaciens* CECT8836, CECT8837 o un mutante de estas pueden usarse directamente en el control de enfermedades bacterianas y fúngicas, aunque preferentemente, formarán parte de una composición plaguicida junto con otros compuestos aceptables a nivel agrícola. Por lo tanto, aspectos adicionales de la invención proporcionan una composición que comprende el extracto de la invención, uno o más compuestos aceptables a nivel agrícola y/o uno o más plaguicidas adicionales, así como el uso de dichas composiciones como plaguicida y en el control de enfermedades causadas por bacterias u hongos de plantas. En una realización la composición plaguicida comprende un extracto libre de células obtenido a partir de CECT8836 según se define más arriba y un plaguicida adicional seleccionado de entre la cepa CECT8836 y la cepa CECT8837. En otra realización la composición plaguicida comprende un extracto libre de células obtenido a partir de la cepa CECT8837 y un plaguicida adicional seleccionado de entre la cepa CECT8836 y la cepa CECT8837.
- 25 Por último la invención se refiere a un método de control biológico de una enfermedad bacteriana o fúngica en una planta que comprende la administración de una cepa de la invención (CECT8836, CECT8837) o mutante de la misma, una composición, una suspensión que comprenda dicha cepa, o un extracto libre de células derivado de dicha cepa.
- 30 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. Además, la palabra "comprende" incluye el caso "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
- 35

siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Los signos numéricos relativos a los dibujos y colocados entre paréntesis en una reivindicación, son solamente para intentar aumentar la comprensión de la reivindicación, y no deben ser interpretados como limitantes del alcance de la protección de la reivindicación. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10

FIG. 1. Dendrograma correspondiente al coeficiente de disimilaridad de 64 aislados de *Bacillus* sp. según su perfil de presencia de genes biosintéticos de péptidos antimicrobianos (*srfAA*, *bacA*, *bmyB*, *fenD*, *spaS* e *ituC*). Los símbolos indican presencia (+) o ausencia (-) del gen. Se indican las siete agrupaciones principales al nivel de disimilaridad de 7 (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7), así como la posición de la cepa CECT8836 en el dendrograma (flecha).

15

FIG. 2. Dendrograma correspondiente al coeficiente de disimilaridad de 64 aislados de *Bacillus* sp., según su perfil de producción de isoformas de péptidos cíclicos correspondientes a las familias de las iturinas (I1, I2, I3, I4), fengicinas (F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7) y surfactinas (S1, S2, S3, S4). Los símbolos indican presencia (+) y ausencia (-) de la isoforma mayoritaria. Se indican las cuatro agrupaciones principales al nivel de disimilaridad de 5 (G1, G2, G3, G4), así como la posición de la cepas CECT8836 en el dendrograma (flecha).

20

FIG. 3. Dendrograma correspondiente al coeficiente de disimilaridad de 64 aislados de *Bacillus* sp., según su perfil de antagonismo *in vitro* en agar LB y NA, frente a ocho bacterias fitopatógenas (*Erwinia amylovora* PMV6076, *Pseudomonas syringae* pv *syringae* EPS94, *P. syringae* pv *tomato* DC3000, *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria* CFBP3275, *X. arboricola* pv. *fragariae* CFBP3549, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* CECT790, *Ralstonia solanacearum* CECT125, *Rhizobium radiobacter* CECT472 y *Pectobacterium carotovorum* CECT225), y en PDA, frente a cinco hongos fitopatógenos (*Phytophthora cinnamomi* CECT2965, *P. cactorum* F490, *Penicillium expansum* EPS26, *Fusarium oxysporum* ATCC201829 y *Pythium ultimum* CECT2364). La actividad inhibitoria de cada cepa de *Bacillus* contra cada

35

indicador se clasificó en: 1, halos de inhibición inferiores a 10 mm; 2, halos de inhibición entre 10 y 20 mm; 3, halos de inhibición superiores a 20 mm. Finalmente, para cada cepa de *Bacillus* se calculó un índice global de actividad (GAI) a partir del sumatorio de la actividad inhibitoria para los correspondientes hongos o bacterias indicadores y medio de cultivo utilizado. Los valores máximos de GAI eran de 24 para la actividad contra bacterias (8 bacterias indicadoras para un nivel máximo de actividad de 3) y de 15 para la actividad contra hongos (5 hongos indicadores para un nivel máximo de actividad de 3). Así, valores elevados indican una actividad antifúngica/antibacteriana alta y con amplio espectro de actividad. Con los datos de actividad inhibitoria de cada cepa se calcula la matriz de distancias entre las diferentes cepas por el método de Ward y se obtiene finalmente el dendrograma de la figura. Este método permite calcular el coeficiente de disimilaridad entre dos cepas de modo que la distancia respectiva es mayor cuanto mayor sea su valor (más diferentes son las cepas).

15

Se indican las cinco agrupaciones principales que se observan al nivel de disimilaridad de 3.5 (G1, G2, G3, G4, G5), así como la posición de la cepa CECT8836 en el dendrograma (flecha).

20 FIG. 4. Árbol filogenético correspondiente al coeficiente de disimilaridad de 31 cepas de *Bacillus* sp., según la interrelación entre las secuencias *rpoB* de las distintas cepas. Se señala la posición de la cepa CECT8836 en el dendrograma (flecha).

FIG. 5. Patrón de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) obtenido con el cebador SPASF (A) y el SRFAF (B). M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen); 1, CECT8836; 2, CECT8837; 3, EPS2068; 4, EPS2113; 5, EPS2119; 6, EPS2128; 7, EPS2064; 8, EPS2068; 9, QST713; 10, FZB42; 11, EPS2004; 12, Control negativo.

30 FIG. 6. Efecto de los tratamientos con diferentes cepas de *Bacillus* sp., en la intensidad de las infecciones causadas por *E. amylovora* y *P. syringae* pv. *syringae* en plantas de peral (A y B), por *P. syringae* pv. *tomato* en plantas de tomate (C) y por *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* en plantas de pimiento (D). Los resultados se comparan con un control no tratado (NTC), con un control tratado con la cepa QST713 de *B. amyloliquefaciens* y con un control tratado con el antibiótico estreptomina (Str). Los

35

valores son las medias de tres réplicas y las barras de error representan el 95% del intervalo de confianza de la media. Letras iguales sobre las barras indican que los tratamientos no difieren significativamente según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ). Y, intensidad de las infecciones (%).

5

FIG. 7. Cinética de crecimiento (●), porcentaje de esporulación (□) y evolución del pH (○) de *Bacillus amyloliquefaciens* CECT8836 en medio LB (A) y medio salino modificado (B) a 28 °C y de la actividad antimicrobiana de los extractos libres de células derivados de CECT8836 sobrenadantes frente a *Erwinia amylovora* (▲) y *P. syringae* pv. *syringae* (△). X, tiempo (horas). Y, concentración de viables ( $\text{Log}_{10}$  UFC/ml). W, esporulación (%). Z, Porcentaje de inhibición (%).

10

FIG. 8. Perfil cromatográfico resultante de la HPLC correspondiente a las cepas de *Bacillus* CECT8836 (A), QST713 (B) y FZB42 (C) enriquecidas en medio de cultivo líquido PM. En el eje Y se representa la Absorbancia para cada una de las fracciones recogidas (mAU= miliunidades de absorbancia) y en el eje X el tiempo en el que se recoge cada una de las fracciones (en minutos).

15

FIG. 9. Recuento de viables después del proceso de fermentación en medio LB (■) y después del proceso de la liofilización en lactosa 15% (□) en dos ensayos independientes. Eje Y= concentración de viables ( $\text{Log}_{10}$  UFC/g).

20

FIG. 10. Multiplicación y supervivencia de la cepa CECT8836 de *Bacillus amyloliquefaciens* (●) y de la población total de bacterias en el control no tratado (○) en un parcela comercial de coliflor (A) y de remolacha (B) bajo condiciones de campo. X= tiempo (días). Y= supervivientes ( $\text{Log}_{10}$  UFC/hoja).

25

FIG. 11. Efecto de los tratamientos con la cepa de CECT8836 de *Bacillus amyloliquefaciens* sola (CECT8836) o juntamente con el extracto de cultivo (CECT8836 + S) en la reducción de la intensidad de las infecciones causadas por *Hyaloperonospora brassicae* en plantas de coliflor (A), por *Cercospora beticola* en plantas de remolacha (B) y por *Erwinia amylovora* en plantas de peral (C). Los resultados se comparan con un control no tratado (NTC) y con un control tratado con un producto de referencia, un compuesto de cobre (Cu) en los ensayos de control contra hongos y con el antibiótico estreptomycin (Str) en el ensayo contra la bacteria.

30

35

Los valores son las medias de tres réplicas y las barras de error representan el 95% del intervalo de confianza de la media. Letras iguales sobre las barras indican que los tratamientos no difieren significativamente según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ). Y, intensidad de las infecciones (%).

5

## EJEMPLOS

Ejemplo 1. Aislamiento y caracterización de las cepas *B. amyloliquefaciens* CECT8836 y *B. amyloliquefaciens* CECT8837

10

Para obtener los aislados se tomaron muestras de hojas, flores y frutos obtenidos a partir de plantaciones comerciales de plantas hortícolas y de frutales de pepita y hueso, así como de plantas silvestres en terrenos colindantes a parcelas comerciales. Todas las muestras eran procedentes de campos de cultivo y entornos naturales de clima mediterráneo. Las muestras se procesaron según métodos microbiológicos convencionales (Mora et al., "Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments", *International Microbiology*, 2011, vol. 14, pp. 213-223), y se aislaron bacterias del género *Bacillus* en medio LB a 40°C durante 48 h, constituyendo una colección de 68 aislados. Dichos aislados se sometieron a un estudio para determinar la presencia de los genes *srfAA*, *bmyB*, *ituC*, *fenD*, *spaS* y *bacA*, involucrados en la producción de péptidos antimicrobianos (PAMs), concretamente, de los ciclopéptidos surfactina, bacilomicina, iturina y fengicina, del lantibiótico subtilina, y del dipéptido bacilisina, respectivamente (Chen et al., "Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42", *Nature Biotechnology*, 2007, vol. 25, pp. 1007-1014). El DNA de los aislados y de las cepas de referencia *B. amyloliquefaciens* FZB42 (control positivo) (Koumoutsi et al., *Structural and Functional Characterization of Gene Clusters Directing Nonribosomal Synthesis of Bioactive Cyclic Lipopeptides in Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42, 2004, *Journal of bacteriology*, vol. 186, pp.1084 - 1096) y *B. polymyxa* RGAF84 (control negativo) (Landa et al., *Integrated management of Fusarium wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control*, 2004, *Phytopathology*, Vol. 94, pp. 946-960) se utilizaron para verificar la correcta amplificación de los genes mediante PCR. El DNA se obtuvo a partir de cultivos de la cepa en fase exponencial obtenidos mediante cultivo en caldo LB inoculado al 1% (v/v) e incubado a 28 °C mediante agitación (100 rpm). El material obtenido se sometió a

35

centrifugación a 8000 rpm durante 15 minutos y el sedimento que contenía las células y esporas se utilizó para extraer el DNA mediante tampón Tris-salino-EDTA-SDS antioxidante y precipitación con isopropanol, ajustando la concentración a 10 ng DNA/ $\mu$ L utilizando el sistema Nanodrop. Las reacciones de amplificación se realizaron

5 en condiciones estándar utilizando los cebadores definidos para cada uno de los genes. Concretamente las secuencias SEC ID NO: 1 (srfAAF: TCGGGACAGGAAGACATCAT) y 2 (srfAAR: CCACTCAAACGGATAATCCTGA) para el gen *srfAA*, SEC ID NO: 3 (bmyBF: GAATCCCGTTGTTCTCCAAA) y 4 (bmyBR: GCGGGTATTGAATGCTTGTT) para el gen *bmyB*, SEC ID NO: 5 (ituCF: GGCTGCTGCAGATGCTTTAT) y 6 (ituCR: TCGCAGATAATCGCAGTGAG) para el

10 gen *ituC*, SEC ID NO: 7 (fenDF: GGCCCGTTCTCTAAATCCAT) y 8 (fenDR: GTCATGCTGACGAGAGCAAA) para el gen *fenD*, SEC ID NO: 9 (spaSF: GGGTTTGGATGGAGCTGT) y 10 (spaSR: GCAAGGAGTCAGAGCAAGGT) para el gen *spaS*, y SEC ID NO: 11 (bacAF: CAGCTCATGGGAATGCTTTT) y 12 (bacAR: CTCGGTCCTGAAGGGACAAG) para el gen *bacA*. Las condiciones fueron de 4 min a 95°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C, y 1 min a 72°C, con una etapa de extensión final de 5 min at 72 °C seguida de una parada a 4°C. Para los cebadores del gen *bmyB* la temperatura de anillamiento fue de 55°C en vez de 58°C. Los productos

amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.8 % en 1X

20 Tris-acetato EDTA (TAE) durante 45 min a 90 V y visualizados con bromuro de etidio. Sorprendentemente, se observó gran diversidad en cuanto a la presencia de los genes. Entre los aislados se observó que la distribución de estos genes era bastante dispersa, pero que la presencia de más de 3 genes de forma simultanea era menos frecuente (FIG. 1). Las cepas se distribuyeron en 7 grupos. La cepa CECT8836

25 aparece en el grupo 7. Destaca esta cepa por ser la única que comprende todos los genes amplificados. La cepa CECT8837 aparece en el grupo 5 y se caracteriza por tener los genes, *srfAA*, *bacA*, *bmyB*, *ituC* y *fenD*, pero no presenta el gen *spaS*. Además de estos genes, en las cepas CECT8836 y CECT8837, también se han detectado los genes *beaS*, *mlnI*, *dfnM* y *dhbA* relacionados con la síntesis de los

30 poliquétidos bacillaeno, macrolactina y difucidina, y el sideroforo bacillibactina, respectivamente. Estos genes se detectan con las secuencias SEC ID NO: 19 (beaSF1: CGCAAAGCTCTTCGACCGCCGTC) y 20 (beaSR1: CTCTCGTGCCGTCGGAATATCCGC) para el gen *beaS*, SEC ID NO: 21 (dfnMF1: CGGAGTGAAACCGTGCCGGGATAAAGA) y 22 (dfnMR1: GACCATTGAGAGCGGAAAGCTCC) para el gen *dfnM*, SEC ID NO: 23 (mlnIF1:

35

GGAAGAAAACAGTCGAGGCGATGCTG) y 24 (mInIR1:  
 GAGAAGCTCCGCCGTACCCAGTG) para el gen *mInI*, SEC ID NO: 25 (dhbAF1:  
 CGCCTAAAGTAGCGCCGCCATCAACGC) y 26 (dhbAR2:  
 CCGCGATGGAGCGGGATTATCCG) para el gen *dhbA* (Arguelles-Arias et al., *Bacillus*  
 5 *amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary  
 metabolites for biocontrol of plant pathogens. 2009. Microbial Cell Factories. Vol: 8,  
 Art: 63).

También se determinó el patrón de producción de ciclolipopéptidos (incluyendo las  
 10 fengicinas, iturinas, surfactinas) de los 68 aislados de *Bacillus* obtenidos. En primer  
 lugar se realizó la extracción de los ciclolipopéptidos a partir del cultivo de las cepas en  
 medio LB durante 48h a 28°C mezclando a partes iguales el sobrenadante del cultivo  
 libre de células con isoamil-alcohol. Las mezclas se removieron enérgicamente  
 durante 2 minutos y posteriormente se recuperó la fase orgánica (fase superior) al  
 15 centrifugar la mezcla durante 10 minutos a 10.000 rpm. Posteriormente la fase  
 orgánica se evaporó mediante un evaporador (Scan Speed 40 Teflon, AAPPTEC,  
 LCC, Louisville, USA) y se disolvió en agua destilada al 0.085 % de ácido  
 trifluoroacético (TFA). La fase orgánica ya disuelta se fraccionó mediante  
 cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando el equipo Agilent Technologies  
 20 1200 Series. utilizando una columna de fase reversa Kinetex XB-C18 (Phenomenex,  
 Madrid, España). La elución se llevó a cabo en las siguientes condiciones: gradiente  
 lineal de 2-50% de acetonitrilo conteniendo 0,085% TFA durante 18 min, gradiente  
 lineal de 50-100% de acetonitrilo durante 4 min, a un flujo constante de 1,85 ml/min.  
 Los compuestos eluidos se detectaron mediante absorbancia a 220 nm.

25

Las fracciones obtenidas se analizaron mediante dos técnicas de espectrometría de  
 masas, concretamente se analizaron por MALDI-TOF utilizando el equipo Bruker  
 Daltonics Ultraflex (Bruker Daltonics, Bruker corporation, Billerica, USA) y también por  
 ESI-MS utilizando el equipo (Esquire 6000 ESI ion Trap LC/MS (Bruker Daltonics,  
 30 Bruker corporation, Billerica, USA). Utilizando estas dos técnicas en paralelo fue  
 posible la asignación de cada pico de elución a cada ciclolipopéptido en base a su  
 masa molecular. Los resultados de producción para las 68 cepas fueron analizados  
 mediante un análisis jerárquico utilizando la distancia euclídea al cuadrado usando el  
 software PC-SAS (version 9.1; SAS Institute Inc., Cary, NC) (FIG. 2). Las cepas se  
 35 distribuyeron en 4 grupos caracterizados por la producción diferencial de las diferentes

isoformas. Las cepas *B. amyloliquefaciens* CECT8836 y CECT8837 se agruparon en el grupo 3. Este grupo se caracteriza por agrupar cepas productoras de la mayor parte de las isoformas correspondientes a las tres familias de ciclolipopéptidos analizadas, concretamente de las fengicinas, iturinas, surfactinas. Destaca el hecho sorprendente  
 5 que las cepas CECT8836 y CECT8837 producen todas las 15 isoformas de cLPs.

Las 68 cepas de *Bacillus* spp. también fueron sometidas a pruebas de actividad antimicrobiana *in vitro* contra ocho bacterias fitopatógenas (*Erwinia amylovora* PMV6076, *Pseudomonas syringae* pv *syringae* EPS94, *P. syringae* pv *tomato* DC3000,  
 10 *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria* CFBP3275, *X. arboricola* pv. *fragariae* CFBP3549, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* CECT790, *Ralstonia solanacearum* CECT125, *Rhizobium radiobacter* CECT472 y *Pectobacterium carotovorum* CECT225) y 5 hongos fitopatógenos (*Phytophthora cinnamomi* CECT2965, *P. cactorum* F490, *Penicillium expansum* EPS26, *Fusarium oxysporum*  
 15 ATCC201829 y *Pytium ultimum* CECT2364), utilizando la técnica del repicado de colonias en sobrecapa de agar Luria Bertani (LB) y agar nutritivo (AN) para las bacterias y en sobrecapa de agar patata dextrosa (PDA) para los hongos. Los halos de inhibición del crecimiento en los indicadores se determinaron al cabo de 48 h a 28°C para las bacterias y al cabo de 4 días a 25°C para los hongos. Los resultados de  
 20 diámetro de inhibición se normalizaron y se utilizaron para realizar un análisis jerárquico de agregación utilizando el coeficiente de Jaccard de disimilaridad con el algoritmo UPGMA (NTSYS, Exeter, USA) (FIG. 3). Se observan 5 agrupaciones diferentes en función del patrón de actividad antibacteriana y antifúngica a un nivel de similitud de 5, siendo el grupo G5 el que incluye las cepas más activas, tanto a nivel  
 25 de grado de actividad como de espectro de actividad contra bacterias y hongos fitopatógenos. Una vez más y de forma inesperada, este grupo incluye las cepas CECT8836 y CECT8837. Los restantes grupos presentaron cepas con una actividad menor o con un espectro de actividad limitado a algunos patógenos o a un medio de cultivo. Por lo tanto las cepas CECT8836 y CECT8837 poseen un potente efecto  
 30 antifúngico y antibacteriano de amplio espectro, que las diferencia del resto de los aislados que se obtienen de fuentes naturales.

Para determinar la especie de *Bacillus* a la que pertenecían los 15 aislados que poseían mayor presencia de genes biosintéticos de PAMs y mayor actividad  
 35 antimicrobiana y espectro, se procedió a la caracterización bioquímica mediante la

galería API<sup>®</sup> 50 CHB/E (Biomerieux, France). A partir de los cultivos puros crecidos a 28°C durante 24h, se obtuvo una suspensión de la que se depositaron 200 µl en cada pocillo después de mezclar con el medio E. Las tiras de pruebas se leyeron después de incubar a 37°C durante 16-24h dependiendo de cada cepa. Un test positivo  
5 aparecía como rojo debido al viraje del indicador colorimétrico como consecuencia de la acidificación del medio. Para la determinación de la cepa se utilizó el programa API system databases APILAB Plus software version 3.3.3 (BioMemrieux, France). Las cepas QST713 y FZB42 de *Bacillus amyloliquefaciens* y las cepas UMAF6614 y UMAF6639 de *B. subtilis* se incluyeron como controles de referencia. Así se concluyó  
10 que las cepas *B. amyloliquefaciens* CECT8836 y CECT8837 eran *B. subtilis*/*B. amyloliquefaciens* y se mostraron íntimamente relacionadas con las cepas de referencia.

Con el fin de identificar las cepas CECT8836 y CECT8837 a nivel de especie de una  
15 forma más fiable, se procedió a secuenciar parcialmente el gen *16S rDNA* (Romero et al., 'Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera fusca*', 2004, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 64, pp. 263-269) y el gen *rpoB* (Ki et al. 'Structure of a protein-DNA complex essential for DNA protection in spores of Bacillus species', 2009, Proceedings of the  
20 National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 105, pp. 2806-2811). Para ello se procedió a realizar una PCR sobre el DNA extraído de los cultivos con los cebadores SEQ16 F-1 (SEC ID NO: 13: GCGGCGTGCCTAATACAT) y SEQ16 R-3 (SEC ID NO: 14: TAAGGTTCTTCGCGTTGCTT) para el gen *16S rDNA*, y los cebadores RPOBF (SEC ID NO: 15: TCAACTAGTTCAGTATGGACGACA) y RPOBR  
25 (SEC ID NO: 16: ATGACAGTCGCGGTAAAACC) en condiciones estándar (Lane, D.J., "Nucleic acid techniques in bacterial systematics", Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, 1991, pp. 115-175). Los productos de PCR fueron purificados, concentrados convenientemente y secuenciados mediante un secuenciador ABI PRISM<sup>™</sup> 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, CA, USA).  
30 Las secuencias obtenidas fueron analizadas y alineadas mediante BioEdit Sequencing Editor, y la homología determinada mediante el programa BLAST en la base de datos NCBI database. Con esta metodología las cepas CECT8836 y CECT8837 se identificaron como *B. amyloliquefaciens*. Aunque ambas cepas están relacionadas con otras cepas de la especie *Bacillus amyloliquefaciens*, cabe destacar que se agrupan  
35 en un sub-grupo claramente diferenciado dentro de esta especie al analizar la

secuencia correspondiente al gen *rpoB* (FIG. 4). Este resultado pone de manifiesto la singularidad de las cepas CECT8836 y CECT8837 con respecto de otras cepas conocidas de *B. amyloliquefaciens*.

5 Finalmente con el fin de diferenciar las cepas de *B. amyloliquefaciens* CECT8836 y CECT8837 de otras cepas de *Bacillus* relacionadas con el biocontrol de enfermedades de plantas, se procedió a la amplificación aleatoria de ADN polimórfico, técnica conocida por el acrónimo inglés RAPDs (Random Amplification of Polymorphic DNA), que utiliza cebadores cortos arbitrarios (8-12 nucleótidos) que generan tras la PCR con  
10 un solo cebador, amplificaciones que permiten realizar tipado de cepas (Williams J G et al, "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers", Nucleic Acids Res., 1990, vol. 18, pp. 6531-6535). Dicho estudio se realizó mediante cultivo de las cepas en medio LB en las condiciones descritas anteriormente, extracción del DNA, y realización de PCRs mediante cebadores específicos conocidos  
15 en el estado de la técnica así como los genes previamente descritos para la detección específica de genes biosintéticos de AMPs. Los siguientes cebadores fueron utilizados: SRFAAF (SEC ID No: 1), SRFAAR (SEC ID No: 2), BMYBF (SEC ID No: 3), ITUCF (SEC ID No: 5), FENDF (SEC ID No: 7), FENDR (SEC ID No: 8), SPASF (SEC ID No: 9), SPASR (SEC ID No: 10), BACA (SEC ID No: 11) previamente descritos en  
20 el presente documento, y BOX-A1R (SEC ID No: 17: CTACGGCAAGGCGCAGCTGACG) (De Clerk and De Vos. 'Genotypic diversity among *Bacillus licheniformis* strains from various sources', 2004, FEMS Microbiol Lett., Vol. 231, pp. 91–98) y RAPD-OPG 5 (SEC ID No: 18: CTGAGACGGA) (Daffonchio et al., 'PCR fingerprinting of whole genomes: the spacers between the 16S and 23s  
25 rRNA genes and of intergenic tRNA gene regions reveal a different intraspecific genomic variability of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*', 1998, Int J. Syst. Bacteriol., Vol. 48, pp. 107–116). El mix de PCR consistió en un volumen total de 25 µl conteniendo 1x de tampón, 2 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM de cebador y 0,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 3,5 µl de DNA (25 ng/µl). Las condiciones optimizadas para la reacción de PCR fueron una fase de desnaturalización de 5' a  
30 95°C; una fase de amplificación consistente en 5 ciclos de 1' a 94°C, 1' a 40°C y 1' a 72°C y 30 ciclos de 1' a 94°C, 1' a 60°C y 1' a 72°C, y finalmente una fase de elongación de 5' a 72°C. En la FIG. 5, se puede apreciar que las cepas CECT8836 y CECT8837 se pueden diferenciar de otras cepas de referencia como FZB42 y QST713  
35 y de cepas aisladas aleatoriamente de ambientes naturales, mediante los patrones de

bandas obtenidas con los cebadores SRFAAF (SED ID No: 1) y SPASF (SED ID No: 9). Dichos patrones son reproducibles en las mismas condiciones experimentales para todas las cepas y por tanto son una herramienta muy útil para la identificación específica de las cepas CECT8836 y CECT8837, y su diferenciación de otras de la misma especie.

Ejemplo 2. Preparación de cultivos de las cepas de la invención para la obtención de suspensiones celulares concentradas o extractos del medio de cultivo.

La cepa de la invención, preferentemente en fase exponencial de crecimiento, se inoculó en el caldo de cultivo LB a una concentración final del 3%. El medio de cultivo inoculado se incubó a 30 °C, y pH 7, bajo agitación a 500 rpm en cultivos en "batch". En cultivos en biorreactor la concentración de oxígeno fue del 40%. En la fase estacionaria de crecimiento, tras las 24 h del inicio del cultivo, se obtuvo una concentración celular de  $2,0 \times 10^9$  UFC/ml.

Para obtener una suspensión celular concentrada y el sobrenadante del cultivo libre de células, el material obtenido en fase estacionaria se sometió a centrifugación a 8000 rpm durante 15 min. El sedimento que contenía las células y esporas se resuspendió en un pequeño volumen de tampón fosfato para obtener una suspensión celular concentrada de  $10^{10}$  UFC/ml. El sobrenadante resultante de la centrifugación, libre de células, que contenía los componentes del medio de cultivo transformados y metabolitos producidos por la cepa, se utilizó también para ensayos de actividad.

Ejemplo 3. Ensayos de control de infecciones causadas por bacterias fitopatógenas en plantas mediante tratamientos preventivos con las cepas de la invención.

Para demostrar la eficacia de las cepas de *B. amyloliquefaciens* de la invención en el control de bacteriosis se realizaron ensayos con plantas en condiciones de ambiente controlado en invernadero. El estudio se realizó con los 8 aislados que mostraron mayor producción de ciclolipopéptidos, presencia de genes biosintéticos de péptidos antimicrobianos y mayor espectro de actividad antagonista *in vitro* frente a diferentes patógenos bacterianos. Se realizaron ensayos en 4 patosistemas diferentes, concretamente se determinó la capacidad de las 8 cepas en la inhibición de las infecciones causadas por *P. syringae* pv. *syringae* y *E. amylovora* en plantas de peral,

por *P. syringae* pv. tomato en plantas de tomate y por *X. axonopodis* pv. vesicatoria en plantas de pimiento.

Para los ensayos con plantas de peral, se utilizaron plantas auto-enraizadas de 2 años de edad de la variedad Conference. En este caso se utilizaron las plantas cuando presentaban brotes de 3 a 4 centímetros conteniendo de 5 a 6 hojas jóvenes por brote. Para los ensayos con plantas de tomate y pimiento, se partió de semillas certificadas sembradas en contenedores de 1 L. Las plantas se utilizaron en ambos casos al alcanzar entre 25 y 30 centímetros de altura. En el caso del ensayo en tomate se utilizaron plantas de la variedad Rio Grande, mientras que en el ensayo en pimiento se utilizaron plantas de la variedad Dulce Italiano. En todos los casos se realizaron los tratamientos con fungicidas e insecticidas preventivos así como la fertilización una vez por semana con una solución de 200 ppm de NPK (20:10:20).

- 15 1- Los ensayos de eficacia se basaron en tratamientos preventivos de las cepas de *Bacillus*. En los ensayos en peral, tanto contra *E. amylovora* como contra *P. syringae* pv. *syringae*, se practicó una incisión doble en el nervio principal de las tres hojas expandidas en cada uno brotes. Posteriormente las plantas fueron pulverizadas hasta el punto de goteo (10 mL por planta) con la correspondiente  
20 suspensión de la cepa de *Bacillus* a 10\*8 UFC/mL (obtenida en el Ejemplo 2), obtenida a partir del ajuste por absorbancia de una suspensión celular en solución Ringer 1/4 de acuerdo con un calibración realizada previamente. El material tratado fue cubierto con bolsas de plástico y mantenido a 25°C durante 24 h con un fotoperiodo de 16h luz-8 h oscuridad. Posteriormente, se procedió a inocular las  
25 heridas practicadas en las hojas con una suspensión de *E. amylovora* EPS101 y *P. syringae* pv. *syringae* EPS31 a 10\*7 UFC/ml (ambas cedidas por la Universidad de Girona, Instituto de Tecnología Agroalimentaria, CIDADSAV) (Moragrega, C.; et al. 1998. Evaluation of drench treatments with phosphonate derivatives against *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on pear under controlled environment  
30 conditions. European Journal of Plant Pathology 104: 171-180; Cabrefiga, J.; Montesinos, E. 2005. Analysis of aggressiveness of *Erwinia amylovora* using disease-dose and time relationships. Phytopathology. 95: 1430-1437).
- 35 2- El material se introdujo de nuevo en bolsas de plástico y se mantuvo a 25°C en fotoperiodo. Para el ensayo en tomate y pimiento, a diferencia de los ensayos anteriores, no se realizaron heridas mediante el corte de las hojas, sino que estas

se generaron durante el tratamiento con las cepas de *Bacillus* como consecuencia de la adición de tierra de diatomeas a la suspensión bacteriana. Así el tratamiento con las cepas de *Bacillus* se realizó mediante pulverización con una suspensión de la cepa de *Bacillus* sp. a  $10^8$  UFC/mL, como en el caso anterior, pero añadiendo  
 5 tierra de diatomeas (1 mg/ml) a la suspensión. Las plantas tratadas se incubaron a 25°C durante 24 h con un fotoperiodo de 16 h luz-8 h oscuridad. Posteriormente, se procedió a inocular los patógenos mediante pulverización utilizando una suspensión ajustada a  $10^7$  UFC/ml de *P. syringae* pv. tomato DC3000 para el ensayo en tomate y de *X. axonopodis* pv. vesicatoria CFBP3275 para el ensayo en  
 10 pimiento.

En todos los ensayos el diseño experimental consistió en tres repeticiones de tres plantas por tratamiento de cepa de *Bacillus*. Se realizaron también controles no tratados, un control con una cepa de *Bacillus* de referencia (QST713) y un control  
 15 tratado con estreptomycin a 100 mg/L. Se realizaron dos experimentos independientes para cada patógeno. La intensidad de las infecciones se midió en base a una escala semi-cuantitativa que se adaptó para cada uno de los patógenos debido a que los síntomas de las infecciones y la progresión de la infección son característicos de cada patógeno. Para *P. syringae* pv. *syringae* se utilizó una escala  
 20 de 0 a 3, donde: 0, sin síntomas; 1, necrosis localizada alrededor de la herida; 2, necrosis progresiva a los nervios próximos; y 3, necrosis de toda la hoja. Para *E. amylovora* se utilizó una escala de 0 a 4, 0, sin síntomas; 1, necrosis alrededor del nervio central; 2, necrosis total de la hoja; 3, progresión de la infección a través del peciolo; y 4, progresión de la infección a través del tallo. Para *P. syringae* pv. tomato  
 25 se utilizó una escala de 0 a 2, donde, 0, sin síntomas; 1, presencia de pocas heridas necróticas en la hoja; 2, con alta densidad de heridas necróticas en la hoja. Finalmente para *X. axonopodis* pv. vesicatoria se utilizó una escala de 0 a 3, donde: 0, sin síntomas; 1, aparición de pocas verrugas amarillas; 2, verrugas amarillas afectando la mitad de la hoja; 3, verrugas amarillas afectando la totalidad de la hoja.

30

En los 4 patosistemas, la cepa CECT8836 fue la que mostró una mayor reducción de la severidad de las infecciones. Las eficacias con respecto al control no tratado (NTC) fueron muy elevadas en todos los casos, concretamente del 92,9% contra *E. amyovora* en peral, del 88,6% contra *P. syringae* pv. *syringae* en peral, del 62,8%  
 35 contra *P. syringae* pv. tomato en tomate y del 66,7% contra *X. axonopodis* pv.

vesicatoria en pimiento (FIG. 6). Estas eficacias fueron similares a las observadas en el control basado en estreptomicina (100 mg/L) y mejores que las observadas en el tratamiento de referencia basado en la cepa QST713 (para la que se siguió el mismo protocolo que en el Ejemplo 2), cuando esta se incluyó (FIG. 6A). La cepa CECT8837  
5 también destacó por su actividad.

Ejemplo 4. Estudio de la producción de péptidos antimicrobianos en diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación.

10 La singularidad de las cepas CECT8836 y CECT8837, pone de manifiesto el interés en determinar la naturaleza de su actividad antagonista e inhibitoria contra los diferentes patógenos. En primer lugar, se verificó que existía actividad antimicrobiana en el extracto resultante del crecimiento en "batch" de dichas cepas en caldo LB y en medio salino modificado a 28 °C, pH 7,0 y pO<sub>2</sub> 20%, y se determinó cómo variaba esta  
15 actividad a lo largo del proceso de cultivo. Para ello, alícuotas de los cultivos tomadas a distintos tiempos, filtrados para eliminar las células, fueron liofilizados y el material resultante resuspendido en agua. El extracto fue ensayado mediante la técnica ensayo de contacto en suspensión, aplicando alícuotas de 20 µl del extracto a 180 µl de una suspensión ajustada a 10<sup>8</sup> UFC/ml de *E. amylovora* y *P. syringae* pv. *syringae*.  
20 Pasadas 2 horas, se procedió a la determinación de la inhibición del crecimiento de cada suspensión respecto al control tratado con agua. Durante la realización de las curvas de crecimiento en cultivo en "batch", además de la actividad antibacteriana, también se determinó la concentración de células viables, el pH y el porcentaje de esporulación (FIG. 7). Se observó que los cultivos crecían exponencialmente llegando  
25 a concentraciones celulares de alrededor de 10<sup>9</sup> UFC/mL en caldo LB y alrededor de 5x10<sup>8</sup> UFC/mL en medio salino modificado. La actividad inhibidora del crecimiento de las bacterias fitopatógenas por parte de los extractos de cultivo se inició durante la fase exponencial y se estabilizó a partir de las 48 horas de cultivo ya entrada la fase estacionaria. La actividad contra *E. amylovora* fue mayor en los extractos obtenidos a  
30 partir de los cultivos en medio salino modificado. En cuanto a la actividad contra *P. syringae* fue similar en ambos casos, aunque los extractos obtenidos a partir de cultivos en caldo LB fueron ligeramente más activos que los obtenidos a partir de cultivos en medio salino modificado, en contraste con los resultados obtenidos contra *E. amylovora*. Estos resultados son indicativos que durante el cultivo se están  
35 produciendo componentes con alta actividad antibacteriana, que son producidos de

manera diferencial en función del medio de cultivo utilizado, y que seguramente diferentes componentes son los que definen la actividad contra cada uno de los patógenos.

- 5 Los extractos de cultivo para diferentes cepas de *Bacillus*, incluyendo dos cepas de referencia, concretamente FZB42 y QST713, se analizaron mediante HPLC en una columna de fase reversa tal y como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1 durante la identificación de los ciclolipopéptidos. Esta caracterización permitió observar que había picos característicos que permitían diferenciar la cepa CECT8836 de las  
10 cepas de *Bacillus* de referencia (FIG. 8). Estos picos podrían corresponder a metabolitos que estarían relacionados con la actividad antimicrobiana mostrada por la cepa CECT8836.

#### Ejemplo 5. Producción a escala industrial de una composición de la invención.

15

Para la producción a escala industrial de composiciones con las cepas de la invención se pueden utilizar las condiciones óptimas de fermentación que se detallan a continuación mediante bioreactor de tipo CSTR en medio líquido, aunque también se pueden utilizar técnicas basadas en fermentación en medio sólido, todos ellos siendo  
20 métodos estándar utilizados en la industria microbiológica.

- Para determinar las condiciones óptimas se utilizó un fermentador Braun Biostat de 5 litros en medio LB a 28°C, pH 7,0, pO<sub>2</sub> 20% con rampa, y agitación a 100 rpm. Se inoculó un cultivo exponencial de la cepa *B. amyloliquefaciens* CECT8836 al 1% y se  
25 monitorizaron los parámetros operacionales del bioreactor, finalizando el crecimiento en fase estacionaria a las 12 h, consiguiendo concentraciones celulares de entre 1-2x 10<sup>9</sup> UFC/ml. A continuación se centrifugó el cultivo en continuo a 8000 rpm y 10 l/h y se recogieron las células asépticamente mediante una centrifuga SA-1 Westfalia-Separator. Al final de esta etapa la biomasa se concentró unas 10-12 veces,  
30 resuspendiéndose en tampón fosfato, obteniéndose alrededor de 0,5 litros de concentrado 2-4x10<sup>10</sup> UFC/ml. Posteriormente al concentrado se le añadió un ingrediente osmoprotector inerte (lactosa 15%) y se deshidrató en un Liofilizador Virtis en condiciones estándar durante 36 h, obteniéndose unos 40-50 g de peso seco (15% materia activa), con una concentración de 1x10<sup>11</sup> UFC/g p.s (FIG. 9). En dichas  
35 condiciones se obtiene un producto con una viabilidad de las células cercana al 100 %,

estable y fácil de almacenar y manejar, que a las dosis operativas de  $10^8$  UFC/ml permite preparar unos 100 litros de producto listo para ser aplicado en las plantas de cultivo a proteger. Posteriormente se envasó el material en bolsas herméticas al vacío, que conservadas a 4°C mantienen durante más de un año su vida útil.

5

Ejemplo 6. Colonización de la superficie de plantas por la cepa CECT8836 en condiciones de campo.

Se estudió la capacidad de la cepa CECT8836 para colonizar y sobrevivir en hojas de remolacha y coliflor en condiciones de campo. Esta propiedad es muy importante para proteger las principales vías de entrada de infecciones fúngicas y bacterianas en las plantas. Para ello, a cepa CECT8836 fue cultivada en "batch" en caldo LB a 28°C, pH 7,0, pO<sub>2</sub> 20% hasta alcanzar una concentración de  $5 \times 10^9$  UFC/mL (aproximadamente durante 24 h). Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en solución Ringer 1/4, hasta conseguir una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Con el fin de disponer de un sistema para el análisis específico de las cepas durante el experimento de colonización y evitar la interferencia de microbiota autóctona que pudiera quedar tras la desinfección, se obtuvieron mutantes espontáneos resistentes a rifampicina (cepa CECT8836R), de modo que esta propiedad se utilizó como herramienta de contra-selección en el recuento de viables en placa añadiendo los correspondientes antibióticos al agar. Estos mutantes espontáneos se obtuvieron sembrando una cantidad de  $10^9$  UFC en una placa de agar que contenía rifampicina (100 microgramos/ml), incubando a 30 °C durante 48 h. De las colonias resistentes a rifampicina que crecían en dicho medio se purificó una de ellas mediante aislamiento con el método de dilución por "agotamiento del asa de siembra" y se verificó su identidad comparando con la cepa salvaje CECT8836. La identidad se confirmó mediante, marcadores moleculares (genes *16S rDNA* y *rpo*, genes biosintéticos de péptidos antimicrobianos *srfAA*, *bacA*, *bmyB*, *fenD*, *spaS* e *ituC*), espectro de actividad *in vitro* contra las bacterias y hongos fitopatógenos de la FIG. 3.

30

Los ensayos se realizaron en fincas comerciales localizadas en la provincia de Valladolid en el caso de remolacha, y en la provincia de Valencia en el caso de coliflor. El diseño experimental consistió en 4 bloques aleatorizados. Juntamente con los bloques correspondientes al tratamiento con la cepa CECT8836 se incluyeron los mismos bloques para el tratamiento control basado sólo en agua. La aplicación de la

35

cepa CECT8836 se realizó mediante un pulverizador de mochila a 10 bar de presión y a 1000 L/ha de volumen de aplicación. Los niveles poblacionales se determinaron justo después de la aplicación y posteriormente pasados 20 y 30 días del tratamiento. Para la determinación de los niveles poblacionales se recolectaron 6 hojas de diferentes plantas para cada bloque experimental y una vez en el laboratorio las hojas correspondientes a cada bloque se homogeneizaron conjuntamente en tampón fosfato peptonado neutro mediante un agitador de palas. Los homogeneizados obtenidos de las hojas, que contenían las células de la cepa CECT8836 inoculada se diluyeron adecuadamente y las diluciones se sembraron utilizando un sistema automático de siembra en espiral sobre placas de agar LB suplementadas con rifampicina 100 mg/L. Para el recuento de bacterias totales en el control no tratado los extractos se sembraron en LB sin dicho antibiótico. Una vez sembrados los extractos, las placas se incubaron a 28°C durante 48 h y se contaron las colonias mediante un sistema de recuento automático. La dinámica poblacional de la cepa CECT8836 fue similar tanto en remolacha como en coliflor (FIG. 10). En ambos casos los niveles poblacionales decrecieron en 10 y 100 veces pasados 20 días y a partir de ese momento se mantuvieron estables pasados 30 días. Estos resultados confirman la capacidad de la cepa de la invención en la colonización o supervivencia en órganos de plantas con unos niveles que serían suficientemente altos para conseguir un control adecuado de las posibles infecciones.

Ejemplo 7. Capacidad de control de enfermedades fúngicas y bacterianas en condiciones de campo por la cepa CECT8836.

El primer ensayo en condiciones de campo se realizó en coliflor para el control de *Hyaloperonospora brassicae*, que causa el mildiu de la coliflor. El tratamiento con la suspensión de la cepa CECT8836 consistió en el producto formulado en lactosa 15% re-suspendido en agua para obtener una concentración final de  $5 \times 10^7$  UFC/ml. En el ensayo se incorporó un control no tratado y un control basado en un compuesto cúprico aplicado a la concentración sugerida por el fabricante. Se realizaron un total de 3 aplicaciones mediante pulverización con la cepa CECT8836 en intervalos de 20 días mientras que 5 aplicaciones con el producto cúprico con una cadencia de entre 10 y 15 días. El diseño experimental consistió en 4 bloques aleatorizados de 15 m<sup>2</sup> con 25 plantas por bloque. Al final del ensayo se determinó la eficacia del tratamiento basado en la cepa CECT8836 en comparación con el tratamiento basado en el compuesto

cúprico. En este ensayo no se inoculó el patógeno de forma artificial sino que las infecciones fueron producidas por inóculo ya presente en la zona del ensayo. La evaluación de la severidad se hizo calculando el porcentaje de superficie foliar afectada por la infección del hongo.

5

El segundo ensayo en condiciones de campo se realizó en remolacha y se focalizó en el control de *Cercospora beticola* causante del cercosporiosis o mancha de la hoja de la remolacha. El tratamiento con la suspensión de la cepa CECT8836 consistió en el producto formulado en lactosa 15% re-suspendido en agua para obtener una concentración final de  $5 \times 10^7$  UFC/ml. En el ensayo se incorporó un control no tratado y un tratamiento en base a un compuesto cúprico aplicado a la dosis sugerida por el fabricante. Se realizaron un total de 3 aplicaciones con la cepa CECT8836 en intervalos de 20 días mientras que 5 aplicaciones con el producto cúprico con una cadencia de entre 10 y 15 días. El diseño experimental consistió en 4 bloques aleatorizados de 28 m<sup>2</sup> con 150 plantas. En este caso tampoco se realizó inoculación artificial del patógeno.

Finalmente, se realizó un tercer ensayo en condiciones de campo en este caso focalizado contra una bacteria, concretamente contra *Erwinia amylovora* que causa el fuego bacteriano de las rosáceas. El ensayo se realizó en una parcela de peral de la variedad Conference situada en la Tallada d'Empordà dentro de la estación experimental Mas Badia. Los tratamientos consistieron en la aplicación por pulverización de la suspensión de la cepa CECT8836 a una dosis de  $10^8$  UFC/mL diluida con agua o con el sobrenadante del cultivo (extracto) libre de células. En el ensayo se incorporó también un control tratado con estreptomycinina (100 mg/L) y un control no tratado.

Todos los tratamientos se realizaron en condiciones de campo. Transcurridos dos días de los tratamientos, se recolectaron las flores tratadas en campo y se colocaron de forma individualizada dentro de tubos eppendorf para su inoculación en condiciones controladas de laboratorio. Una vez colocadas todas las flores en gradillas se inocularon con la cepa EPS101 de *E. amylovora* por deposición de 10 mL de una suspensión bacteriana ajustada a  $10^7$  UFC/mL. Las flores se cubrieron con bolsas de forma hermética y se incubaron durante 7 días a 23 °C y humedad relativa del 100%.

Tras este período de incubación se determinó la intensidad de las infecciones producidas por *E. amylovora* en las flores.

5 En los tres ensayos se observó que la cepa CECT8836 redujo significativamente la intensidad de las infecciones producidas por los 3 patógenos (FIG. 11). En el caso de los hongos, concretamente *H. brassicae* y *Cercospora beticola*, el tratamiento con la cepa CECT8836, además de reducir significativamente la severidad de las infecciones, presentó unos niveles de eficacia similares a los observados en los tratamientos con productos cúpricos. En el caso del ensayo contra *E. amylovora* en peral, se observó  
10 que los tratamientos basados en la cepa CECT8836 redujeron significativamente la severidad de las infecciones producidas por *E. amylovora* en las flores con respecto al control no tratado. Además ambos tratamientos basados en la cepa CECT8836 presentaron una eficacia similar o superior a la observada con el tratamiento de referencia realizado con estreptomycin. Cabe destacar que el tratamiento consistente  
15 en la cepa CECT8836 diluida con el extracto del cultivo libre de células, presentó una eficacia muy elevada, incluso superior a la presentada por el tratamiento con estreptomycin, poniendo de manifiesto la existencia de metabolitos con actividad antibacteriana en el extracto de crecimiento que mejoran la actividad de la cepa sola.

## REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT8836, o un mutante de la misma, 5 donde dicho mutante se obtiene utilizando la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CECT8836 y además mantiene las siguientes características de la cepa de partida: (a) actividad antagonista frente a las bacterias *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv *syringae*, *P. syringae* pv *tomato*, *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria*, *X. arboricola* pv *fragariae*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium radiobacter*, *Pectobacterium carotovorum*, y a los hongos *Phytophthora cinnamomi*, *P. cactorum*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Pytium ultimum*; y (b) la capacidad de colonizar o sobrevivir en una parte aérea de una planta.
- 15 2. Uso de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CECT8836 o de un mutante de la misma según se define en la reivindicación 1, como plaguicida en plantas.
3. Uso según la reivindicación 2, para la prevención, curación o erradicación de una enfermedad causada por un patógeno fúngico o bacteriano en una planta.
- 20 4. Procedimiento de obtención de una suspensión de células viables derivadas de una cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CECT8836 o de un mutante de la misma según se define en la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento: (i) inocular la cepa en un medio de cultivo y (ii) someter el medio de cultivo inoculado de la etapa (i) a 25 condiciones adecuadas para el crecimiento de la cepa.
5. Extracto libre de células derivado de una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* CECT8836 o de un mutante de la misma, según se define en la reivindicación 1, dicho extracto siendo obtenible mediante un procedimiento que comprende:
- 30 (i) inocular la cepa en un medio de cultivo apropiado,  
(ii) someter el medio de cultivo inoculado a condiciones de crecimiento adecuadas,  
(iii) separar las células del medio de cultivo de la etapa (ii),  
(iv) recoger extracto libre de células; y  
(v) opcionalmente someter el extracto libre de células a un proceso de concentración.
- 35

6. Extracto de *Bacillus amyloliquefaciens* CECT8836 o de un mutante de la misma, según la reivindicación 5, donde el proceso de concentración de la etapa (v) se lleva a  
5 cabo mediante deshidratación, filtración, ultrafiltración, centrifugación, precipitación o cromatografía.
7. Composición que comprende la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CECT8836 o un mutante de la misma según se define en la reivindicación 1, o un extracto según se  
10 define en la reivindicación 5, y uno o más compuestos aceptables a nivel agrícola.
8. Composición según la reivindicación 7, donde el uno o más compuestos aceptables a nivel agrícola se selecciona del grupo que consiste en fitofortificantes, nutrientes, humectantes, compuestos que mejoran la adherencia, compuestos tamponadores,  
15 estabilizantes, antioxidantes, osmoprotectores y protectores solares.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 7-8 que comprende al menos un plaguicida adicional.
- 20 10. Composición según la reivindicación 9 donde el plaguicida adicional se selecciona del grupo que consiste en una cepa bacteriana con actividad antifúngica y/o antibacteriana, un fungicida, un insecticida o un nematocida.
11. Composición según la reivindicación 9, en donde el plaguicida adicional es la cepa  
25 de *Bacillus amyloliquefaciens* CECT8837.
12. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 7-10 como plaguicida en una planta.
- 30 13. Uso según la reivindicación 12 para el control de patógenos fúngicos y bacterianos en una planta.
14. Método para el control de una infección causada por un patógeno fúngico o  
35 bacteriano en una planta que comprende la administración de la cepa o mutante de la

misma según se define en la reivindicación 1, el extracto según se define en cualquiera de las reivindicaciones 5-6, o la composición según se define en cualquiera de las reivindicaciones 7-11, a la planta.

ÁÁÁÁ

FIG. 1

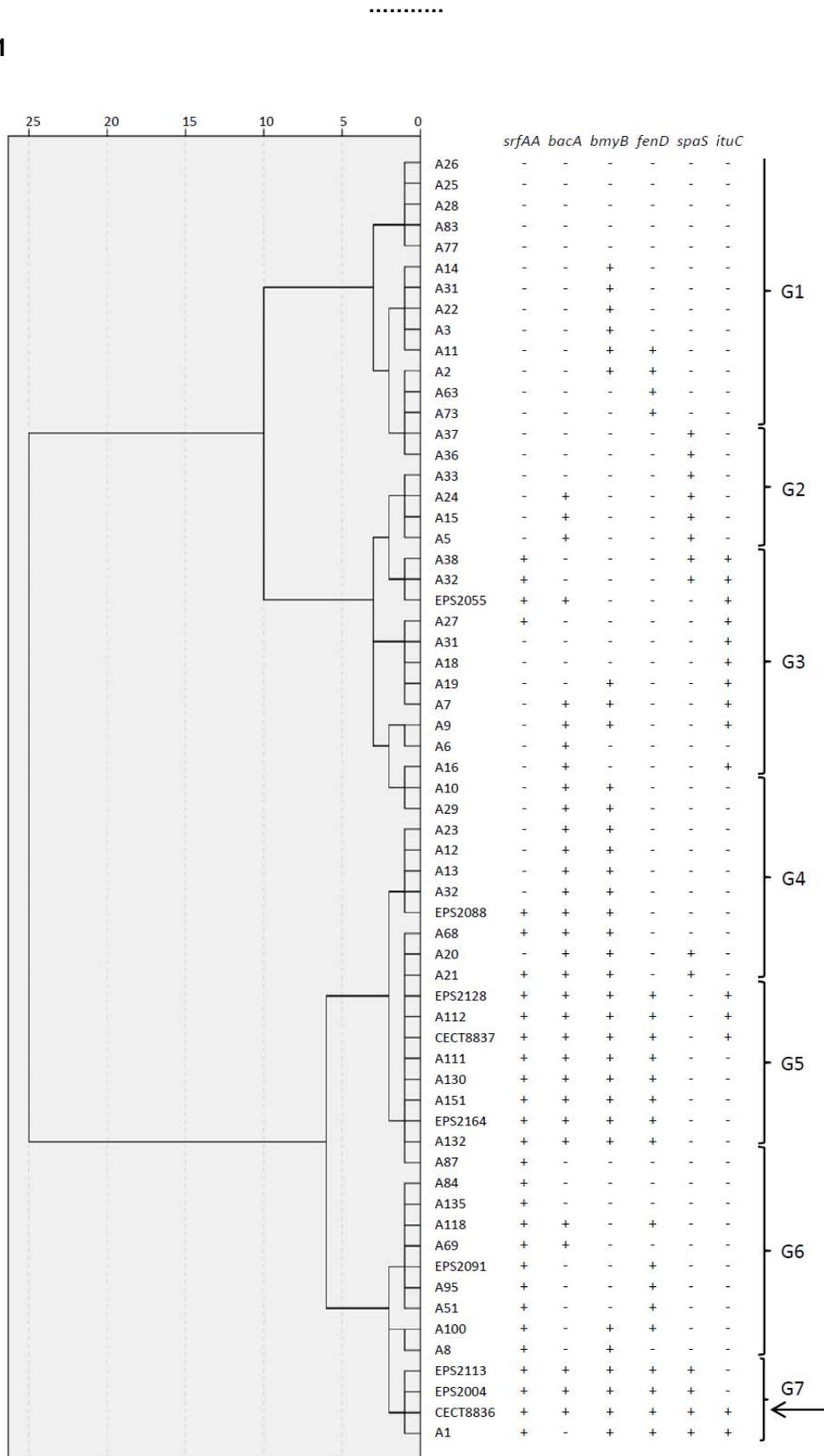


FIG. 2

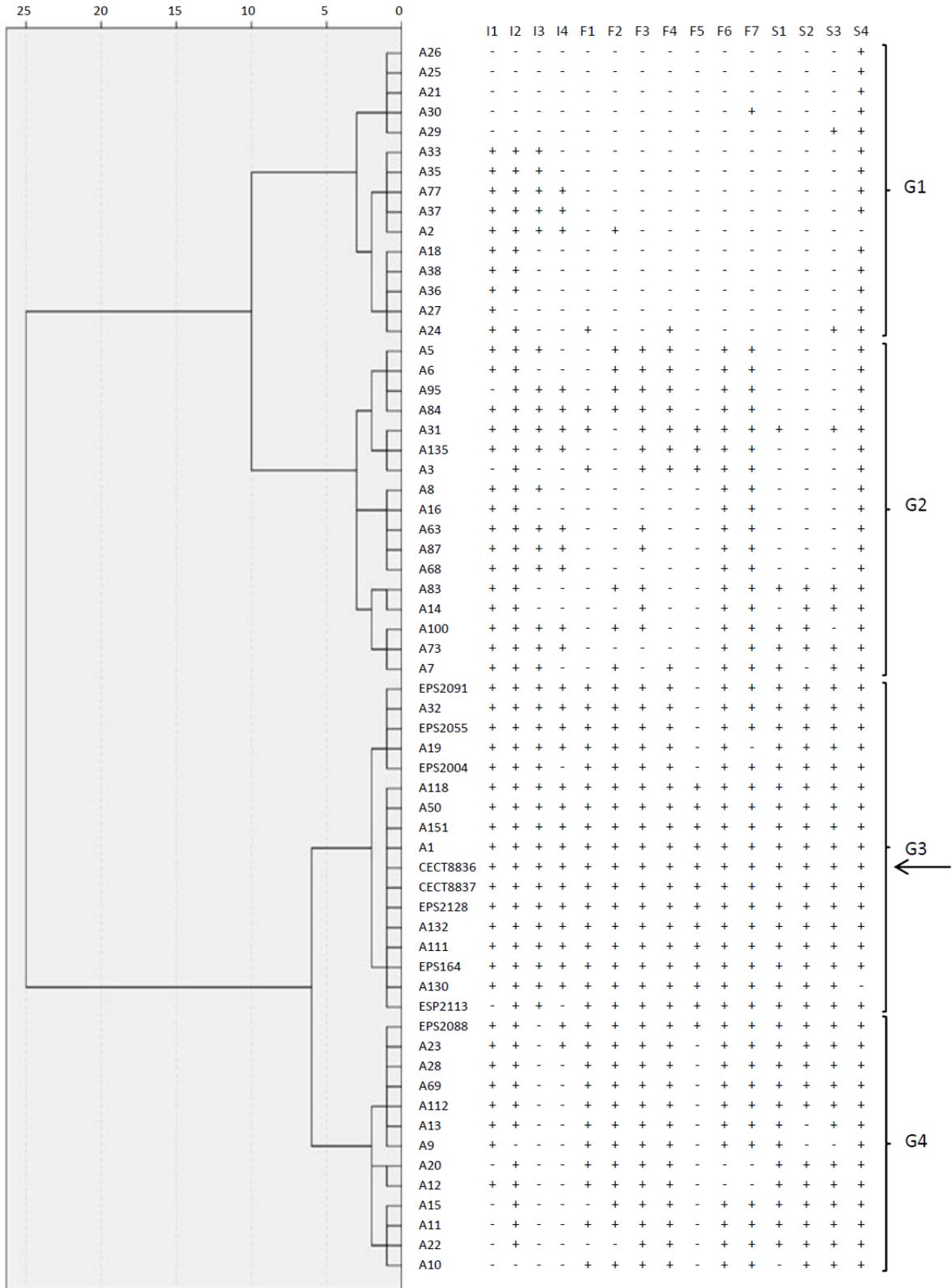


FIG. 3

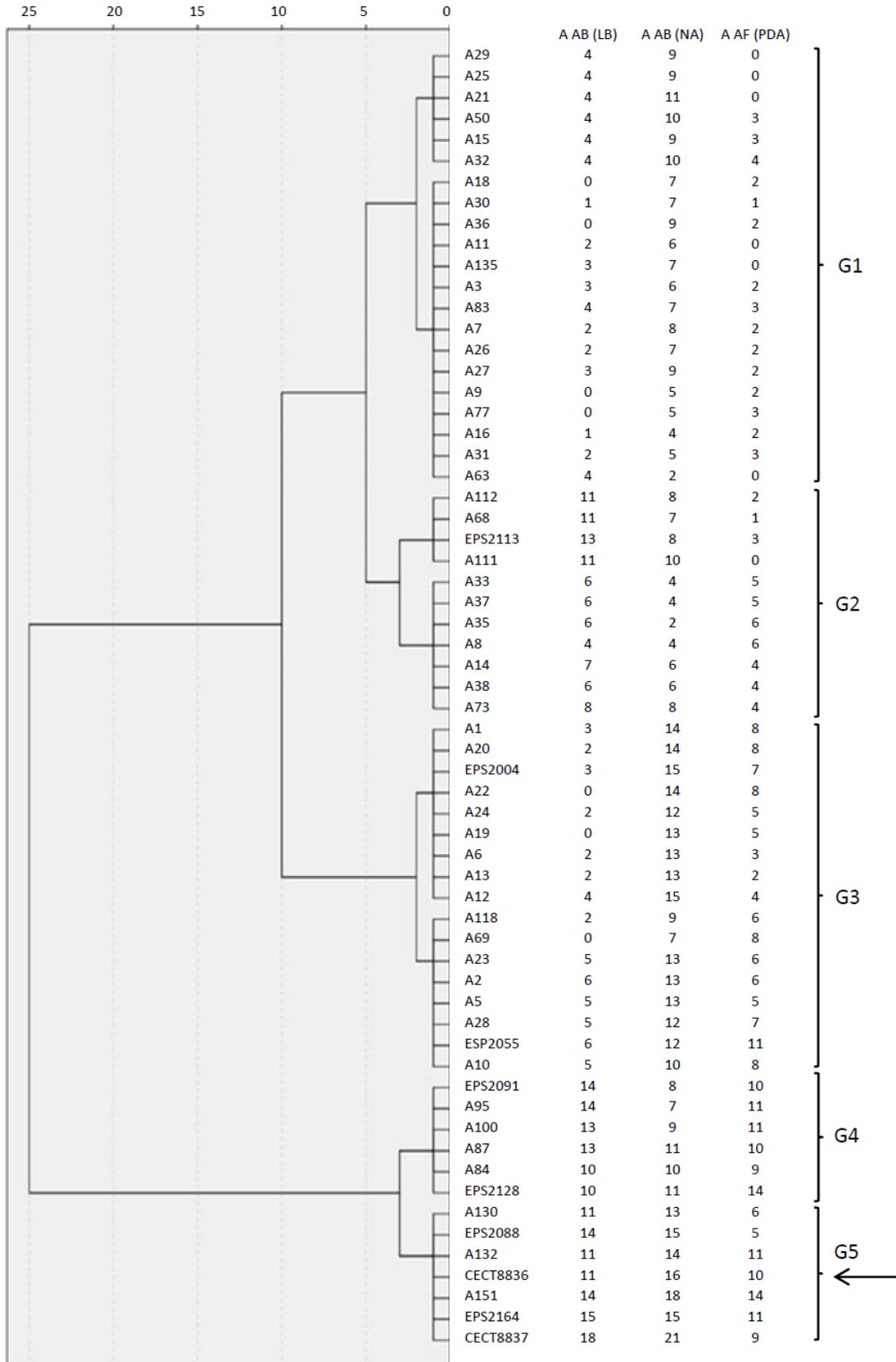


FIG. 4

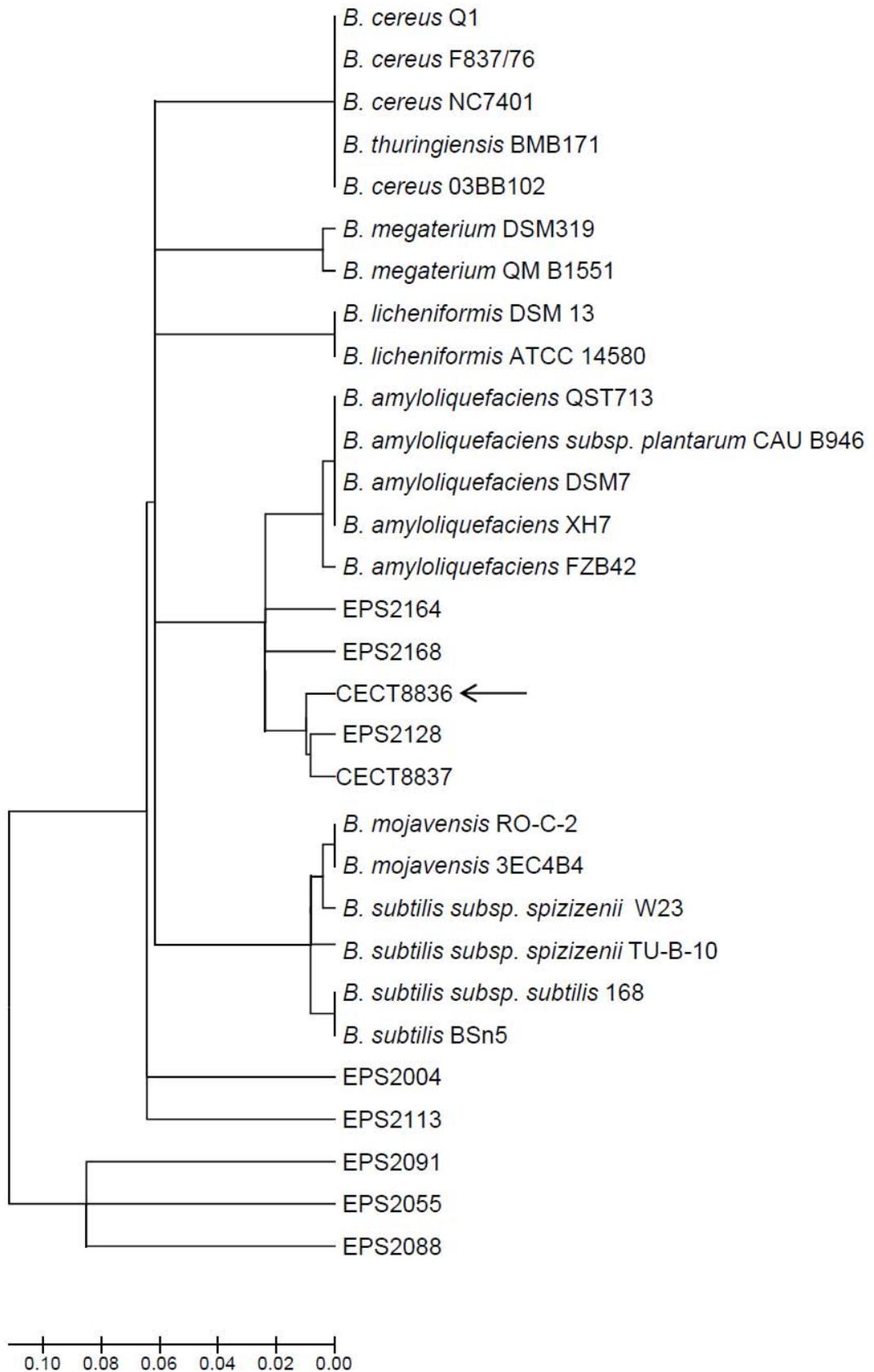


FIG. 5

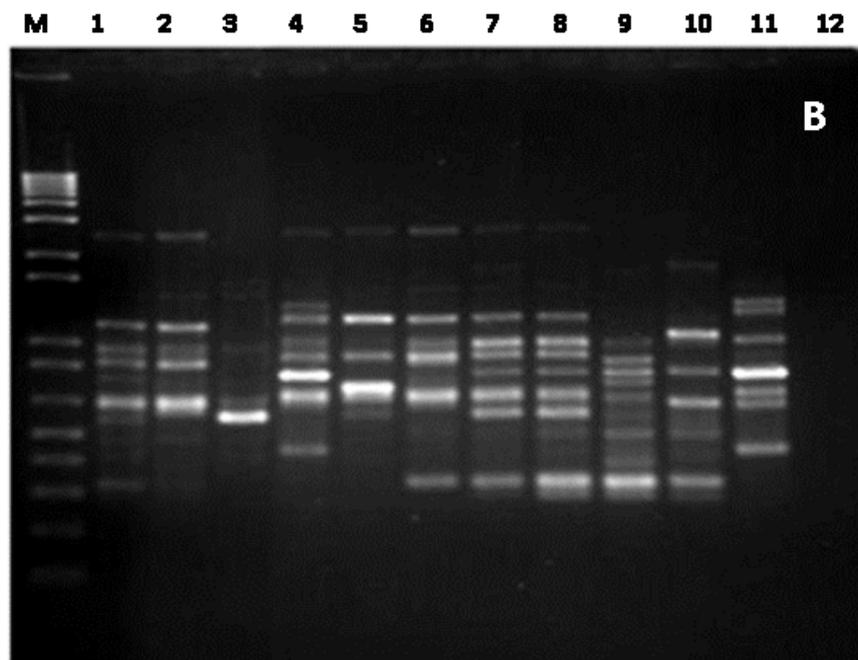
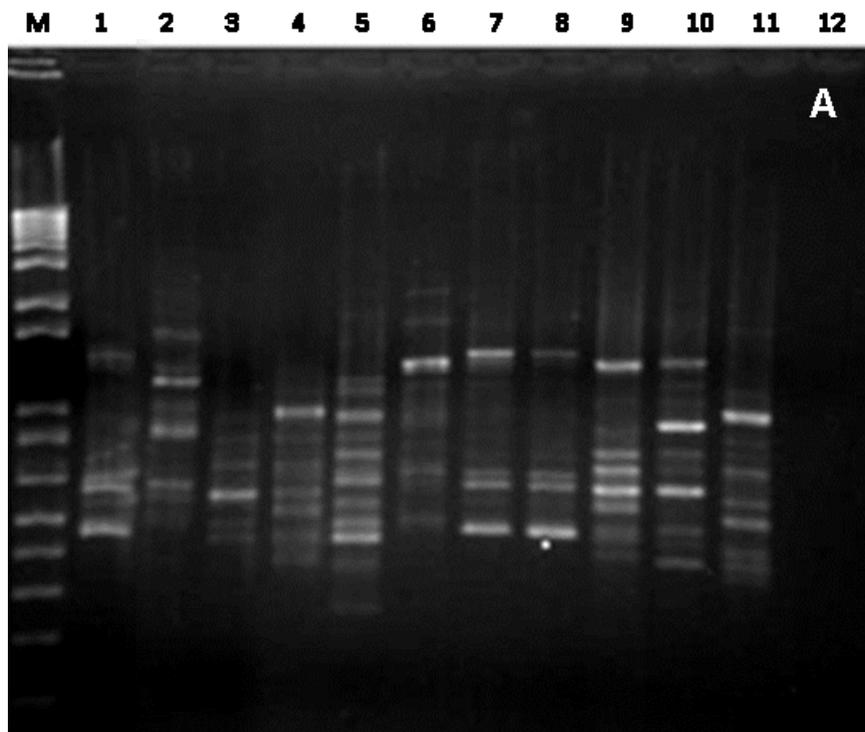


FIG. 6

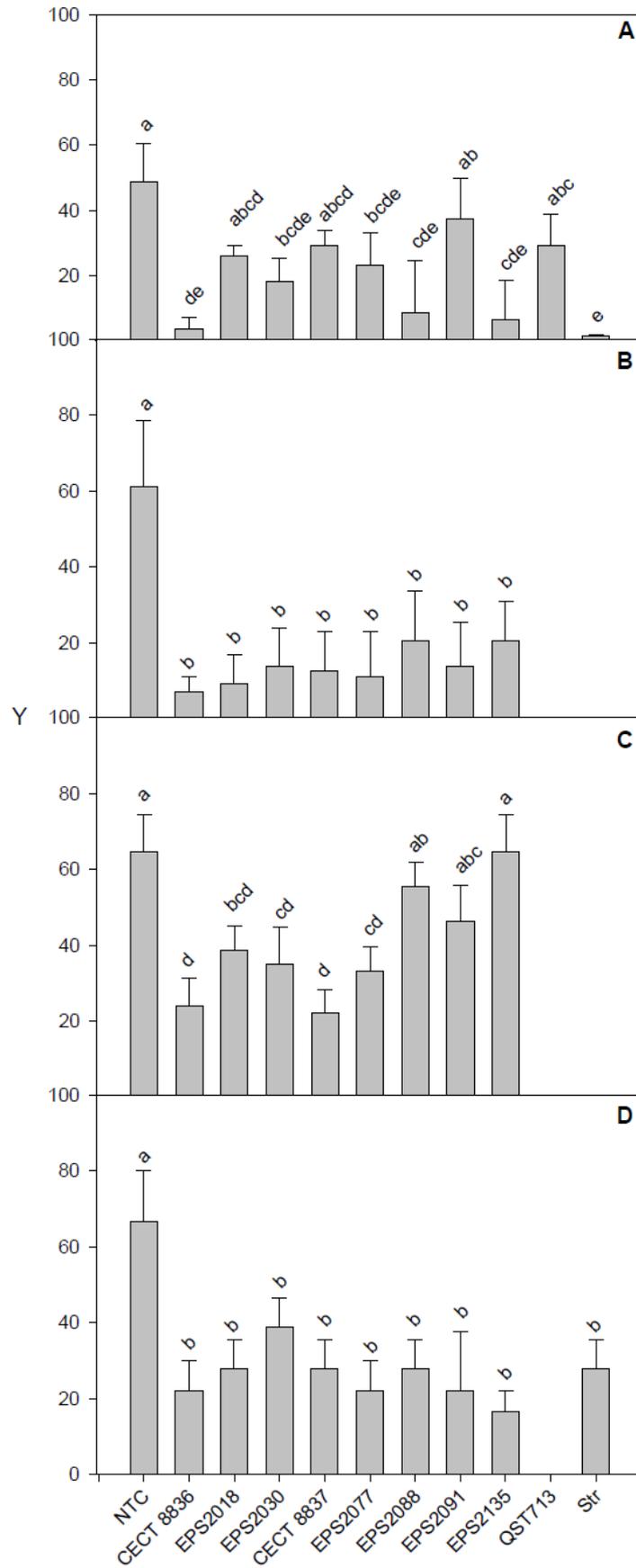


FIG. 7

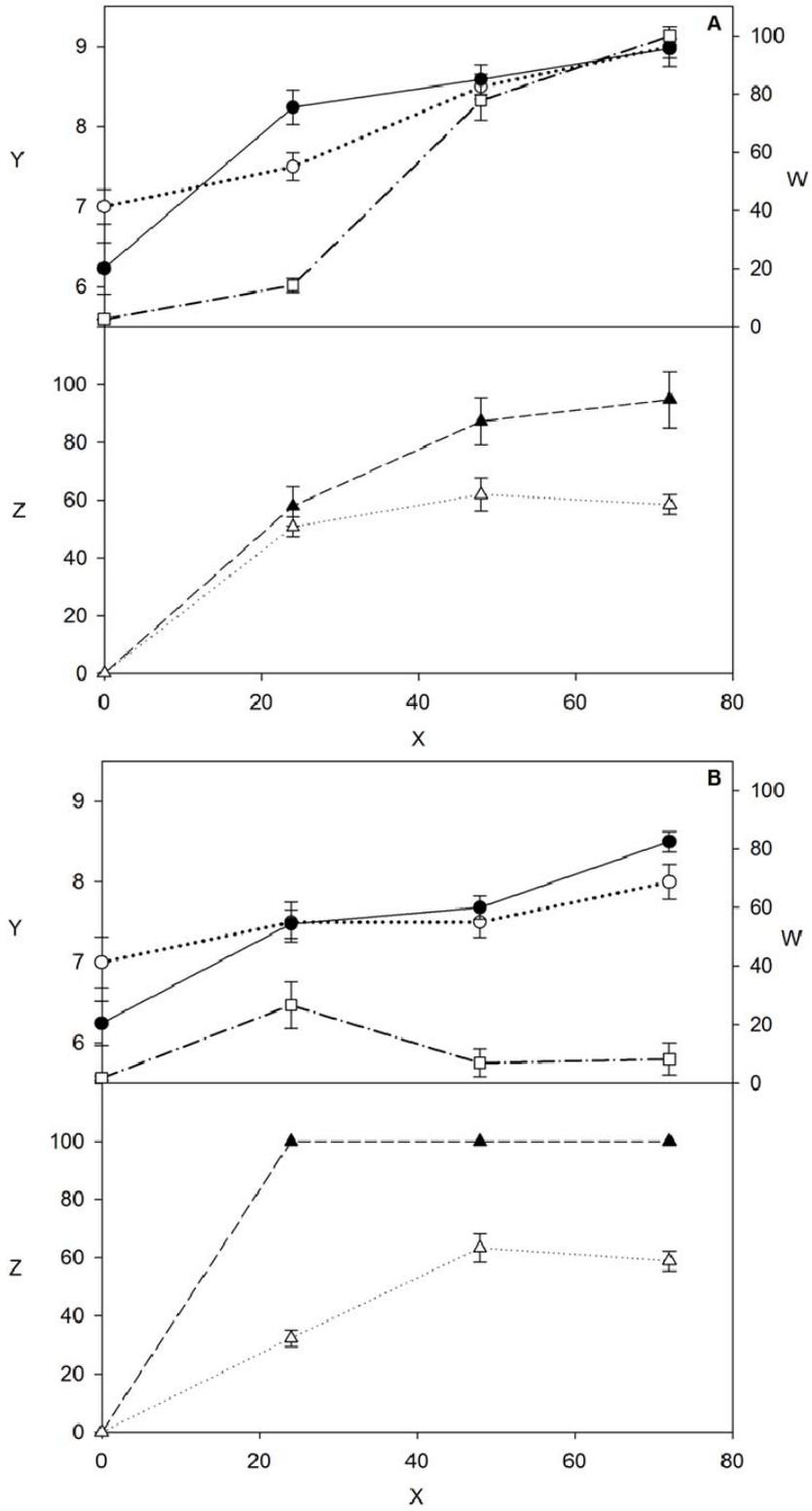


FIG. 8

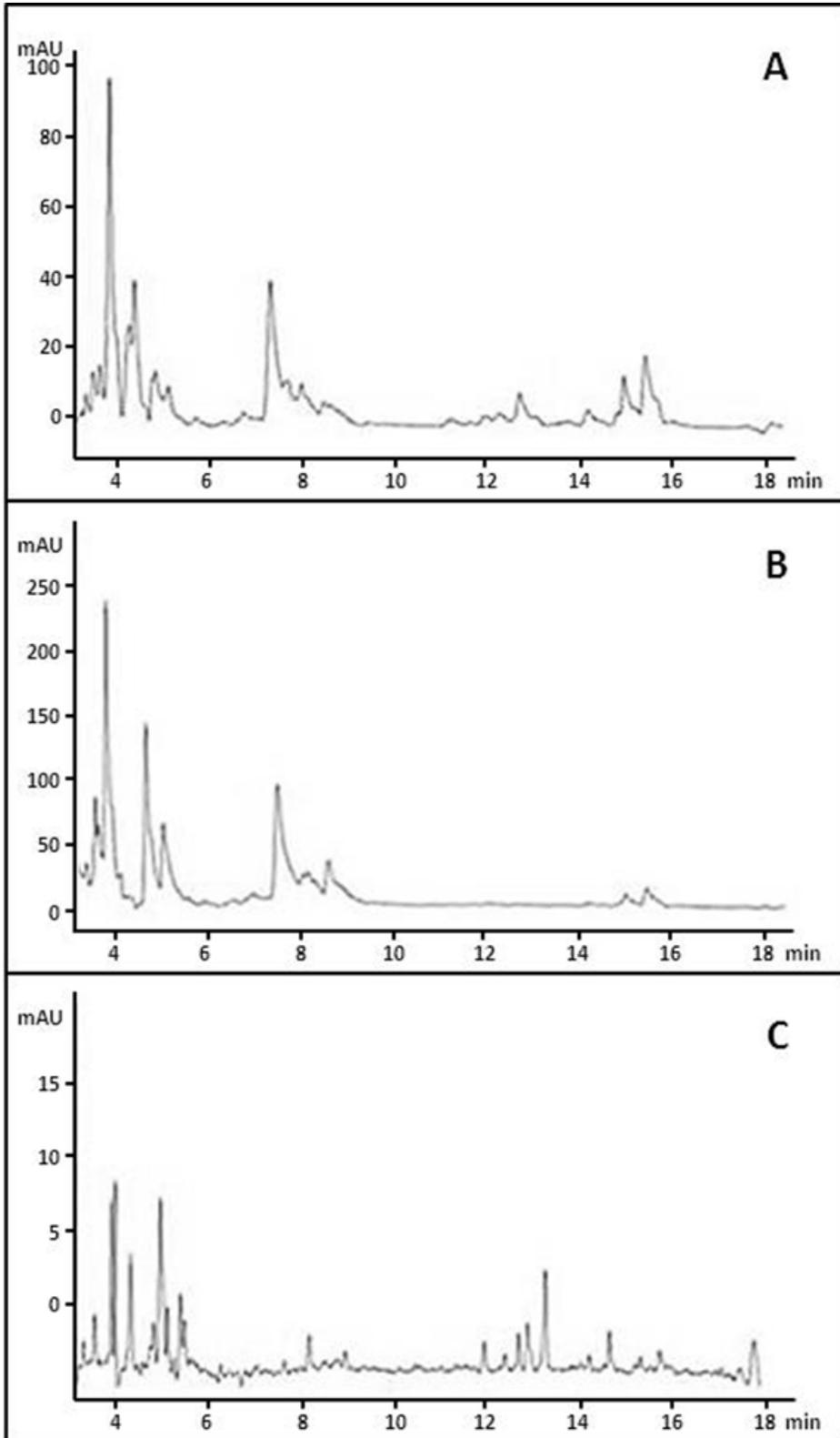


FIG. 9

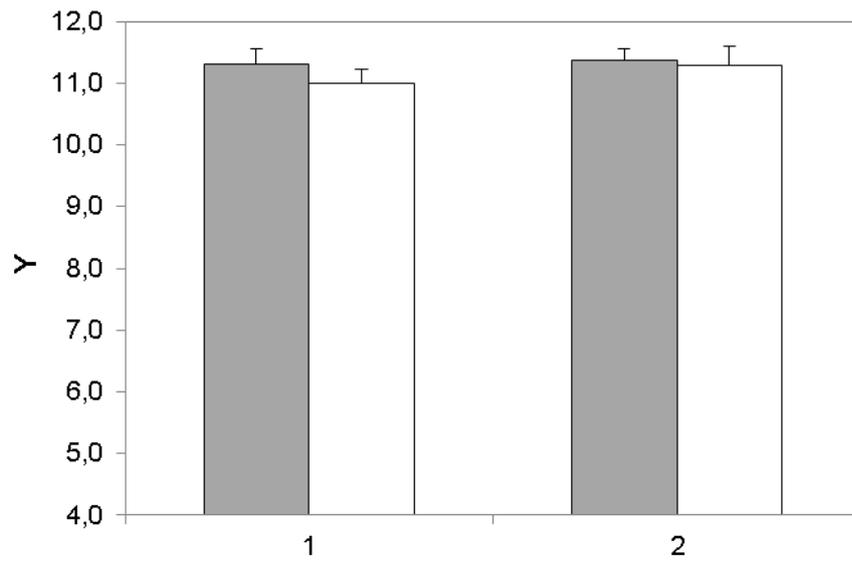


FIG. 10

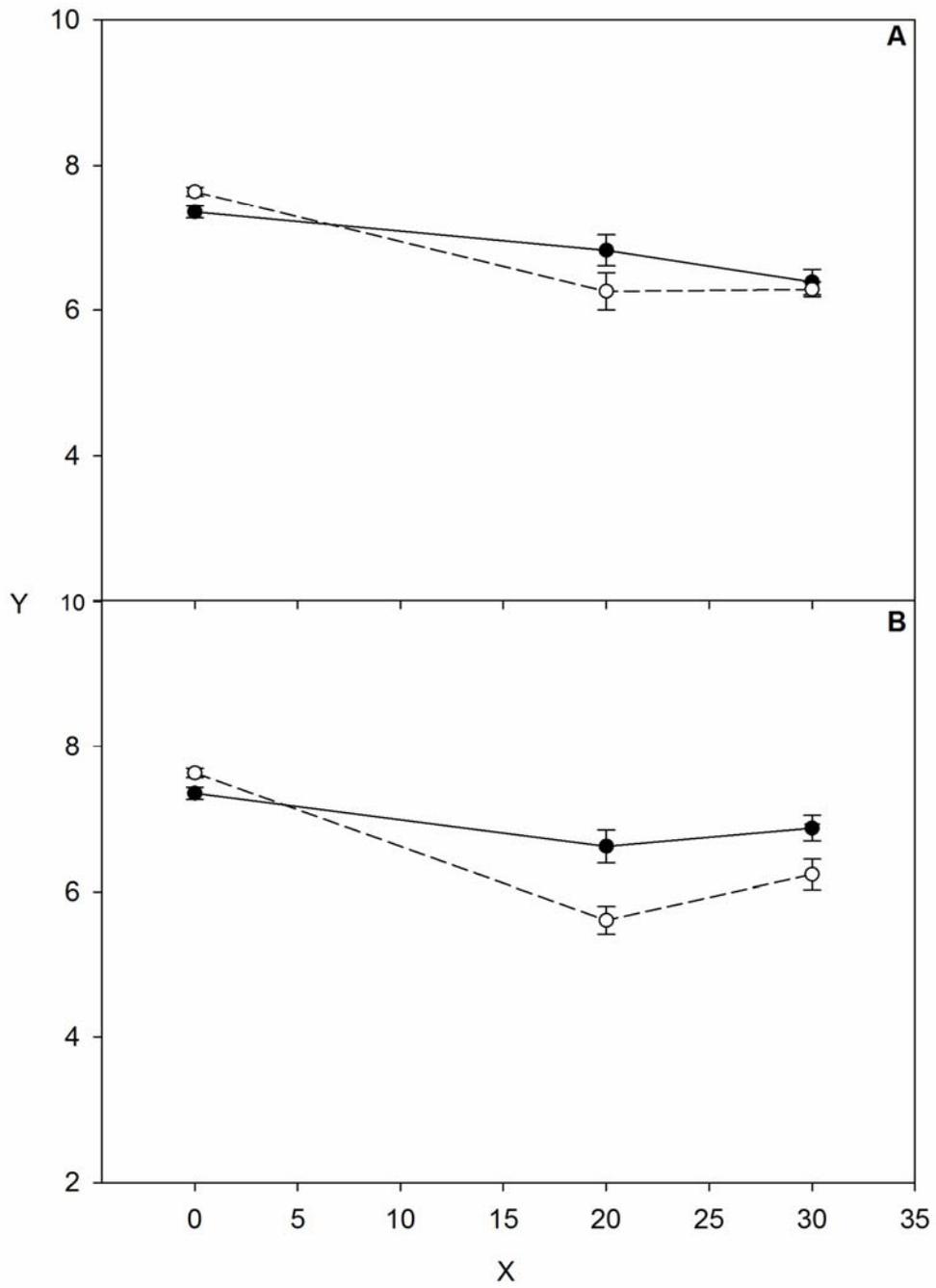
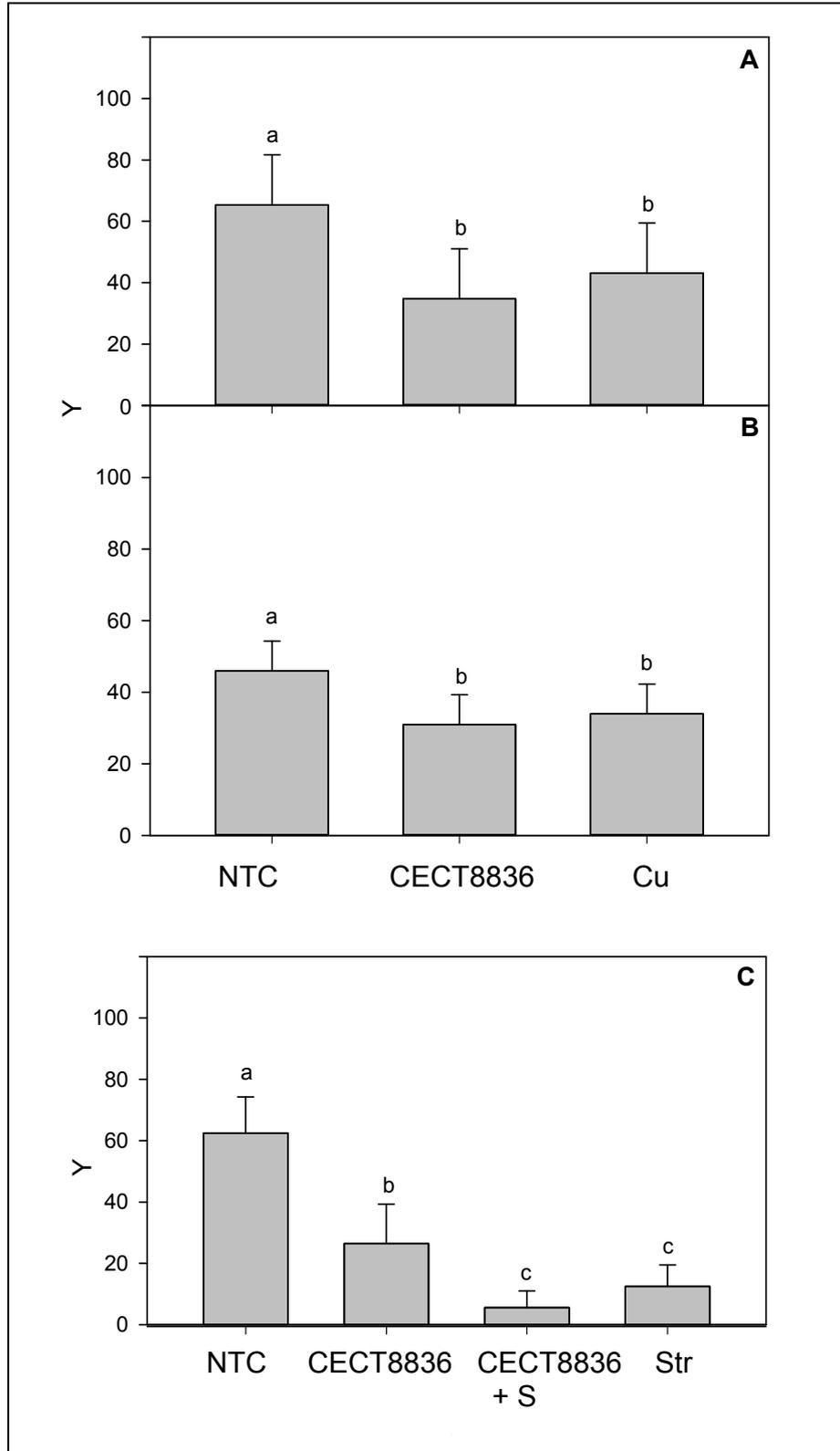


FIG. 11



LISTA DE SECUENCIAS

<110> Industrias Quimicas del Valles S.A.

<120> Cepa de Bacillus amyloliquefaciens como plaguicida de plantas

<130> P3168ES00

<160> 26

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 1

tcgggacagg aagacatcat 20

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 2

ccactcaaac ggataatcct ga 22

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CEBADOR

<400> 3

gaatcccggt gttctcaaaa 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CEBADOR

<400> 4

gcgggtattg aatgcttggt 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CEBADOR

<400> 5

ggctgctgca gatgctttat 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CEBADOR

<400> 6

tgcgagataa tgcgagtgag

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CEBADOR

<400> 7

ggcccgttct ctaaatccat

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CEBADOR

<400> 8

gtcatgctga cgagagcaaa 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CEBADOR

<400> 9

ggtttgttg atggagctgt 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CEBADOR

<400> 10

gcaaggagtc agagcaaggt 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CEBADOR

<400> 11  
cagctcatgg gaatgcttt 20

<210> 12  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> CEBADOR

<400> 12  
ctcggtcctg aaggacaag 20

<210> 13  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> CEBADOR

<400> 13  
gcggcgtgcc taatacat 18

<210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> CEBADOR

<400> 14

taaggttctt cgcgttgctt

20

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CEBADOR

<400> 15

tcaactagtt cagtatggac gaca

24

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CEBADOR

<400> 16

atgacagtcg cggtaaacc

20

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CEBADOR

<400> 17

ctacggcaag gcgcagctga cg

22

<210> 18

<211> 10

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CEBADOR

<400> 18

ctgagacgga

10

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CEBADOR

<400> 19

cgcaaaagct cttcgaccgc cgtc

24

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CEBADOR

<400> 20

ctctcgtgcc gtcggaatat ccgc

24

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CEBADOR

<400> 21

cggagtgaaa ccgtgccggg ataaaga

27

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CEBADOR

<400> 22

gaccattcag agcggaaagc tcc

23

<210> 23

<211> 27

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CEBADOR

<400> 23

ggaagaaaaa cagtcgaggc gatgctg 27

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CEBADOR

<400> 24

gagaagctcc gccgtcacca gtg 23

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CEBADOR

<400> 25

cgcttaaagt agcgccgcca tcaacgc 27

<210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CEBADOR

<400> 26

ccgcgatgga gcgggattat ccg

23



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201530415

②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.03.2015

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 2008102062 A1 (KIM KAB-SIG et al.) 01.05.2008, todo el documento.	1-14
A	US 2011230345 A1 (SNYDER AMY et al.) 22.09.2011, todo el documento.	1-14
A	WO 2013034940 A2 (SZEGEDI TUDOMANYEGYETEM et al.) 14.03.2013, todo el documento.	1-14

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 n.º:

Fecha de realización del informe  
29.04.2016

Examinador  
M. Á. García Coca

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N1/20** (2006.01)

**A01P1/00** (2006.01)

**A01P3/00** (2006.01)

**C12R1/07** (2006.01)

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

C12N, C12R, A01P

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, XPESP, MEDLINE/NLM, EMBASE/ELSEVIER

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.04.2016

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-14	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-14	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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	US 2008102062 A1 (KIM KAB-SIG et al.)	01.05.2008
D02	US 2011230345 A1 (SNYDER AMY et al.)	22.09.2011
D03	WO 2013034940 A2 (SZEGEDI TUDOMANYEGYETEM et al.)	14.03.2013

**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**

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-14, es la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de acceso CECT8836 y su uso como plaguicida en plantas (reiv. 1-3). Es también objeto de la invención el procedimiento de obtención de una suspensión de células viables derivadas de la cepa de la invención (reiv. 4), el extracto libre de células derivado de la cepa de la invención (reiv. 5), el extracto de la cepa de la invención (reiv. 6), una composición que comprende la cepa de la invención o un extracto de la misma y su uso como plaguicida en plantas (reiv. 7-13) y un método para el control de una infección en plantas administrando la cepa de la invención, su extracto o la composición que la contiene (reiv. 14).

**Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).**

El documento D01 divulga la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* KTGB0202, con actividad antagonista frente a patógenos fúngicos en plantas. Entre estos patógenos se encuentran *Phytophthora* sp., *Botrytis cinerea*, y *Fusarium* sp. En este documento también se divulga un compuesto antifúngico obtenido de dicha cepa y el uso tanto de la cepa como del compuesto obtenido de la misma para biocontrol de patógenos en plantas. Además, en este documento se indica un procedimiento para la obtención de un cultivo de dicha cepa, un procedimiento de la extracción del compuesto antifúngico y un método para el control (prevención o tratamiento) de infecciones causadas por patógenos fúngicos en plantas. Esta cepa es capaz de colonizar o sobrevivir en una parte aérea de una planta.

El documento D02 divulga un cultivo biológicamente puro de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-50349 y su uso como biofungicida y biobactericida. Este documento también divulga una composición que contiene la cepa de la invención (o esporas de la misma) junto con otros compuestos aceptables a nivel agrícola, para mejorar el crecimiento de la planta y para protegerla frente a patógenos tanto fúngicos como bacterianos. Entre estos patógenos se encuentran distintas especies de *Penicillium*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Xantomonas vesicatoria* y *Ralstonia solanacearum*. La composición puede aplicarse tanto en brotes, raíces, semillas, propágulos vegetativos o en el suelo.

El documento D03 divulga una composición plaguicida que contiene la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* B83 y la cepa *Peredibacter starrii* X13, que presentan un efecto sinérgico en el control frente a patógenos de plantas, tales como *Xantomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae*, *Clavibacter michigamensis* o *Fusarium oxysporum* entre otros.

Aunque en los documentos citados se divulgan distintas cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*, en el estado de la técnica no se ha encontrado divulgada la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de acceso CECT8836. Tampoco se ha encontrado divulgada una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* que presente todas las características de la cepa de la invención.

Por lo tanto, la invención contenida en las reivindicaciones 1-14 es con referencia a los documentos D01-D03 nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).