

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 375**

21 Número de solicitud: 201790002

51 Int. Cl.:

C12N 1/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

31.07.2015

30 Prioridad:

31.07.2014 ES P201431158

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.10.2017

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070600

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)
HOSPITAL REAL. AVDA. DEL HOSPICIO S/N
18071 GRANADA ES**

72 Inventor/es:

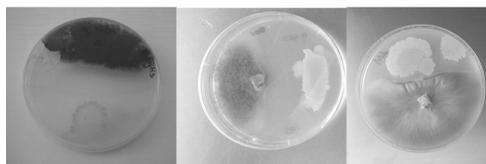
**BÉJAR LUQUE, María Victoria;
LLAMAS COMPANY, Inmaculada;
RUÍZ GARCÍA, Cristina y
QUESADA ARROQUIA, Emilia**

54 Título: **Cepa CECT8662 de Bacillus methylotrophicus como estimulante del crecimiento vegetal y medio de control biológico**

57 Resumen:

Uso de la cepa CECT8662 de Bacillus methylotrophicus como estimulante del crecimiento vegetal y medio de control biológico.

La presente invención se refiere al uso de microorganismos como estimulantes del crecimiento vegetal y para el control biológico de bacterias, insectos, hongos y nematodos fitopatógenos. Más concretamente, la presente invención se refiere al uso de microorganismos del género Bacillus, concretamente de la cepa CECT8662 de Bacillus methylotrophicus, a sus cultivos, a composiciones que comprenden estas bacterias, a diferentes métodos de cultivo y a los productos que los comprenden, como estimulantes del crecimiento vegetal y para el control biológico de bacterias, insectos, hongos y nematodos fitopatógenos.



Botrytis y XT1

Botrytis y XT2

Fusarium y XT1

Figura 1

DESCRIPCIÓN**CEPA CECT8662 DE *BACILLUS METHYLOTROPHICUS* COMO ESTIMULANTE DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y MEDIO DE CONTROL BIOLÓGICO****5 CAMPO TÉCNICO DE LA PRESENTE INVENCION**

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

10

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**1. Los organismos fitopatógenos**

15 Los organismos fitopatógenos son una causa importante de las enfermedades de las plantas; determinan cambios en su forma, función o integridad y pueden conducir a su muerte. Entre ellos se encuentran los nematodos, bacterias, insectos, hongos y virus. Uno de los grupos más importantes son los **hongos fitopatógenos** que incluyen, entre otros, especies de los géneros *Botrytis*, *Pythium*, *Alternaria*, *Fusarium*,
20 *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Colleotrichium*, *Eutypa*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Sclerotinia* y *Verticillium*. Ocasionalmente dañan locales, como machas foliares, hipertrofia de tejidos o tizón, o bien daños generalizados, cuando afectan a la raíz o al sistema vascular, ocasionando el marchitamiento y la muerte de la planta. Hay más de 8000 especies que atacan a las plantas, algunas son muy específicas, y otras tienen un amplio rango
25 de hospedadores. El impacto económico que estos organismos ocasionan es muy importante. A modo de ejemplo, cuando *Botrytis cinerea* afecta a las viñas se producen miles de toneladas de pérdidas en la industria vinícola.

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

menor frecuencia en tallo y que tiene un amplio espectro de huéspedes, abarcando más de 700 especies; y *Xanthomonas campestris*, responsable de manchas y quemados en plantas, entre otras.

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

15 Las plagas de **insectos** también son un importante problema en las plantas. En algunos casos son vectores de infecciones bacterianas y/o víricas. En otros, pueden debilitar la planta e incluso frenar su crecimiento y desarrollo, y su control o eliminación resulta tremendamente complejo. Es el caso de los escarabajos barrenadores, que perforan la corteza y se introducen bajo ella para construir sus galerías y que las hembras depositen los huevos. O el arañuelo del olivo, que chupa la savia de la planta picando en yemas, hojas, flores, frutos y brotes jóvenes a la vez que inyecta toxinas a la planta, deteniendo el crecimiento y deformando los órganos afectados. Otro ejemplo es la mosca blanca, que absorbe la savia hasta que las hojas empiezan a manifestar manchas moteadas amarillos y finalmente se secan. Además las secreciones producidas por este insecto favorecen la proliferación de hongos. Pulgones, hormigas podadoras, cochinillas, avispas serradoras, mariposas del geranio, escarabajos de las flores, etc son otros ejemplos de los principales insectos que causan daño en las plantas.

30

2. Control de los fitopatógenos

Para controlar los patógenos de plantas antes mencionados e incrementar los rendimientos de las cosechas se utilizan generalmente productos químicos, en algunos casos, con elevada toxicidad asociada, lo cual afecta negativamente al medioambiente. Tanto el agua como la tierra se están contaminando; se están destruyendo seres vivos fundamentales en la agricultura, como los insectos

polinizadores, y se está afectando la salud de animales y de humanos. La Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de dichos compuestos y señala ámbitos prioritarios para la puesta en marcha de acciones innovadoras ecológicamente sostenibles y que aumenten la productividad agrícola y la eficacia de los recursos.

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

2.1. Rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR)

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

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

1997; Loeppler 1997); la alteración de los exudados de las raíces, haciéndolas menos atractivas a los nematodos (Oostendorp, y Sikora, 1990); la producción de sideróforos y la producción por parte de algunas PGPR de compuestos volátiles como la acetoina y el 2,3 butanodiol que producen un aumento de la resistencia de las plantas a las infecciones (llamada también resistencia sistémica inducida o ISR) (Choudhary y Johri 2009) y la producción de H₂S que impide el desarrollo de nematodos (Mena 2004 y 2005).

A través de todos los mecanismos descritos, las PGPR, a determinadas concentraciones en el suelo (al menos se requieren 10⁶ microorganismos/mL) actúan, además de cómo estimulantes del crecimiento vegetal (fitofortificantes o fitofertilizantes), como agentes de control biológico, evitando el desarrollo de bacterias, hongos y nematodos fitopatógenos.

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

2.1.1. Bacterias del género *Bacillus*

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

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

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

Producto	Empresa	Composición	Control
Serenade®	AgraQuest	<i>B. subtilis</i> QST713	Hongos y bacterias en frutos
Ecoguard®	Novozyme	<i>B. licheniformis</i> SB3086	<i>Sclerotinia homoeocarpa</i>
Kodiak®	Gustafson	<i>B. subtilis</i> GB03	Hongos en algodón, soja y legumbres
Yield Shield®	Gustafson	<i>B. pumilus</i> GB34	Hongos de la soja
BioYield®	Gustafson	<i>B. amyloliquefaciens</i> GB99+ <i>B. subtilis</i> GB122	Hongos

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

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

- Cepa de *B. velezensis* como biofungicida (US 2010/0179060 A1)
- 5 • Cepa de *B. pumilus* como nematocida (WO 2013/067275) .
- Cepa de *B. pumilus* como insecticida (WO2010146204).
- Cepa de *B. thuringiensis* como nematocida (WO 2010/078708 A1, US 6077506)
- Cepa de *B. thuringiensis*, sus genes y toxinas como nematocida (EP 0853671).
- Tres cepas de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* y *Sporobolomyces roseus*
10 para el control de fitopatógenos (WO 2004/024865 A2).
- Varias cepas de *Bacillus spp.* y *Brevibacillus parabrevis* con efecto fungicida y bactericida (WO 2010/142055).

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

- 15 • Cepa de *Serratia* para el control de patógenos (CA2822178 A1).
- Tres cepas de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mojaviensis* y *Azospirillum brasilense* como estimulantes del crecimiento de la planta y bionematicidas (WO2011121408 A1).
- Una preparación conteniendo distintas cepas de *Pseudomonas* como
20 estimulante del crecimiento de plantas y como agente de control biológico (US6048713 A).
- Un cultivo de *Delftia acidovorans* que oxida los sulfuros y estimula el crecimiento (US20080242543 A1).
- Cepas de *Rhizobium* para incrementar el crecimiento de las plantas
25 (WO2003089640 A2).

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

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

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

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

15 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

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

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

comprenden para el control biológico de bacterias fitopatógenas, nematodos fitopatógenos, insectos fitopatógenos y hongos fitopatógenos con excepción de los hongos pertenecientes a la especie *Magnaporthe oryzae*.

5

Preferiblemente, la presente invención se refiere al uso de microorganismos de la especie ***Bacillus methylotrophicus***, a diferentes métodos de cultivo y a los productos que los comprenden para el control biológico de **bacterias** como por ejemplo aquellas pertenecientes a la especie *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium atrosepticum*,
10 *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas campestris*, **hongos** como por ejemplo oidio, *Botrytis* o aquellos pertenecientes a las especies *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cynerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cactorum* *Phytophthora cinnamomi*, *Rhizopus oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Thanatephorus cucumeris* y *Verticillium dahliae*, **insectos** como por ejemplo la mosca blanca y el pulgón y/o
15 **nematodos** como por ejemplo las especies pertenecientes a los géneros *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema*, *Trichodorus*, y en general todos los nematodos parásitos de plantas.

Es también objeto de la presente invención microorganismos pertenecientes a *Bacillus*
20 *methylotrophicus* cepa XT1 (número de depósito CECT8661) depositada el 23 de abril de 2014 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) por la Universidad de Granada y/o microorganismos con un alto grado de homología con la cepa XT1 cuya secuencia de ADN del gen 16S rRNA sea idéntica en al menos el 99.6%, 99.7%, 99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN del gen 16S rRNA de la cepa XT1,
25 basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN; y/o microorganismos pertenecientes a *Bacillus methylotrophicus* cepa XT2 (número de depósito CECT8662) depositada el 23 de abril de 2014 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) por la Universidad de Granada y/o microorganismos con un alto grado de homología con la cepa XT2 cuya secuencia de
30 ADN del gen 16S rRNA sea idéntica en al menos el 99.6%,99.7%, 99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN del gen 16S rRNA de la cepa XT2, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN.

Es también objeto de la presente invención un cultivo de bacterias que comprende o
35 consiste en microorganismos pertenecientes a *Bacillus methylotrophicus* cepa XT1 y/o microorganismos con un alto grado de homología con la cepa XT1 cuya secuencia de

ADN del gen 16S rRNA sea idéntica en al menos el 99.6%, 99.7%, 99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN del gen 16S rRNA de la cepa XT1, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN; y/o
5 microorganismos pertenecientes a *Bacillus methylotrophicus* cepa XT2 y/o microorganismos con un alto grado de homología con la cepa XT2 cuya secuencia de ADN del gen 16S rRNA sea idéntica en al menos el 99.6%,99.7%, 99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN del gen 16S rRNA de la cepa XT2, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN.

10

La presente invención tiene además por objeto una composición que comprende microorganismos pertenecientes a *Bacillus methylotrophicus* cepa XT1 y/o microorganismos con un alto grado de homología con la cepa XT1 cuya secuencia de ADN del gen 16S rRNA sea idéntica en al menos el 99.6%, 99.7%, 99.8% o el 99.9%
15 con la secuencia de ADN del gen 16S rRNA de la cepa XT1, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN; y/o microorganismos pertenecientes a *Bacillus methylotrophicus* cepa XT2 y/o microorganismos con un alto grado de homología con la cepa XT2 cuya secuencia de ADN del gen 16S rRNA sea idéntica en al menos el 99.6%,99.7%, 99.8% o el 99.9%
20 con la secuencia de ADN del gen 16S rRNA de la cepa XT2, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN.

20

La presente invención tiene por objeto también el uso de las bacterias, cultivos y/o composiciones anteriormente descritas en un procedimiento para estimular el crecimiento vegetal y/o en un procedimiento de control biológico de organismos fitopatógenos.
25

25

En particular, es objeto de la presente invención el uso de las bacterias pertenecientes a las cepas XT1 o XT2 (o aquellos microorganismos que presenten un alto grado de homología con estas cepas, tal y como se ha descrito anteriormente), sus cultivos o
30 composiciones que las comprenden, así como de los productos que comprenden alguna de ellas o de los productos obtenibles de ellas o de su cultivo como estimulantes del crecimiento vegetal y/o para el control biológico de patógenos de plantas, como bacterias, insectos, hongos y/o nematodos.

35

En particular, es objeto de la presente invención el uso de las bacterias pertenecientes a las cepas XT1 o XT2 (o aquellos microorganismos que presenten un alto grado de homología con estas cepas, tal y como se ha descrito anteriormente), sus cultivos o composiciones que las comprenden, así como de los productos que comprenden alguna de ellas o de los productos obtenibles de ellas o de su cultivo como estimulantes del crecimiento vegetal y/o para el control biológico de patógenos de plantas, como hongos (con excepción de hongos pertenecientes a la especie *Magnaporthe oryzae*) y/o nematodos.

5

Preferiblemente, las bacterias pertenecientes a las cepas XT1 o XT2 (o aquellos microorganismos que presenten un alto grado de homología con estas cepas), sus cultivos o composiciones que las comprenden, así como los productos que comprenden alguna de ellas o los productos obtenibles de ellas o de su cultivo se usan como estimulantes del crecimiento vegetal y/o para el control biológico de patógenos de plantas, seleccionados de la lista que comprende o consiste en:

10

Bacterias pertenecientes a las especies *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas campestris*, hongos pertenecientes a las especies *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cynerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cactorum* *Phytophthora cinnamomi*, *Rhizopus oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Thanatephorus cucumeris* y *Verticillium dahliae*, insectos pertenecientes a la familia *Aphididae*, así como insectos pertenecientes a las especies denominadas comúnmente mosca blanca y/o nematodos, como por ejemplo los pertenecientes a los géneros *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema* y/o *Trichodorus*.

20

25

Preferiblemente, las bacterias pertenecientes a las cepas XT1 o XT2 (o aquellos microorganismos que presenten un alto grado de homología con estas cepas, tal y como se ha descrito anteriormente), sus cultivos o composiciones que las comprenden, así como los productos que comprenden alguna de ellas o los productos obtenibles de ellas o de su cultivo se usan como estimulantes del crecimiento vegetal y/o para el control biológico de nematodos, preferiblemente nematodos pertenecientes una de los siguientes géneros: *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema* y/o *Trichodorus*.

30

35

Preferiblemente, las bacterias pertenecientes a las cepas XT1 o XT2 (o aquellos microorganismos que presenten un alto grado de homología con estas cepas, tal y como se ha descrito anteriormente), sus cultivos o composiciones que las comprenden, así como los productos que comprenden alguna de ellas o los productos obtenibles de ellas o de su cultivo se usan como estimulantes del crecimiento vegetal y/o para el control biológico de *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas campestris*.

10 Preferiblemente, las bacterias pertenecientes a las cepas XT1 o XT2 (o aquellos microorganismos que presenten un alto grado de homología con estas cepas, tal y como se ha descrito anteriormente), sus cultivos o composiciones que las comprenden, así como los productos que comprenden alguna de ellas o los productos obtenibles de ellas o de su cultivo se usan como estimulantes del crecimiento vegetal y/o para el control biológico de hongos pertenecientes a las especies *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cynerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Rhizopus oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Thanatephorus cucumeris* y *Verticillium dahliae*, aún más preferente para el control biológico de *Botrytis cinnerea*.

20 Preferiblemente, las bacterias pertenecientes a las cepas XT1 o XT2 (o aquellos microorganismos que presenten un alto grado de homología con estas cepas, tal y como se ha descrito anteriormente), sus cultivos o composiciones que las comprenden, así como los productos que comprenden alguna de ellas o los productos obtenibles de ellas o de su cultivo se usan como estimulantes del crecimiento vegetal y/o para el control biológico de insectos pertenecientes a la familia *Aphididae*, así como insectos pertenecientes a las especies denominadas comúnmente “*mosca blanca*”, en particular, la especie *Trialeurodes vaporariorum*, predominante en invernaderos.

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

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

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

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

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

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

La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de control biológico de hongos fitopatógenos pertenecientes a las especies *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cynerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cactorum* *Phytophthora*

20 *cinnamomi*, *Rhizopus oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Thanatephorus cucumeris* y *Verticillium dahliae*, preferiblemente pertenecientes a la especie *Botrytis cinnerea*, que comprende las etapas de:

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

La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de control biológico de bacterias fitopatógenas pertenecientes a la especie *Agrobacterium tumefaciens*,

30 *Pectobacterium atrosepticum*, *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas campestris* que comprende las etapas de:

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

La presente invención tiene por objeto un procedimiento de control biológico de nematodos fitopatógenos (como por ejemplo especies de *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema* y/o *Trichodorus*)

5 que comprende las etapas de:

a. Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones según lo descrito anteriormente; y

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

10

La presente invención también tiene por objeto un procedimiento de control biológico de insectos fitopatógenos pertenecientes a la familia *Aphididae*, así como insectos pertenecientes a las especies denominadas comúnmente mosca blanca que comprende las etapas de:

15 a. Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones según lo descrito anteriormente; y

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

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

35 En una realización preferente, los procedimientos mencionados anteriormente emplean bacterias, cultivos de bacterias o composiciones que comprenden *Bacillus methylotrophicus*, cepas XT1 y/o XT2, depositadas ante la Colección Española de

Cultivos Tipo (CECT) con número de depósito CECT8661 y CECT8662, respectivamente.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

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

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

15 **Figura 3.** Factor de multiplicación de *M. javanica* en planas de tomate tratadas con las cepas XT1, XT2 y cepa tipo.

Figura 4. Número medio de nematodos encontrados por planta tratada con las cepas XT1, XT2 y cepa tipo.

20 **Figura 5.-** Número medio de de nematodos por g de raíz encontrados plantas tratadas con las cepas XT1, XT2 y cepa tipo.

Figura 6. Nectarino afectado por una plaga de pulgones antes del tratamiento con la cepa XT1.

25 **Figura 7.** Crecimiento de plantas de calabaza tras 50 días de cultivo en maceta a temperatura ambiente. Las macetas B1 y B2 se han inoculado con la cepa XT1 mientras que las B3 y B4 no se han inoculado para utilizarlas de control.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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

al uso de microorganismos de la especie ***Bacillus methylotrophicus***, a sus cultivos, a composiciones que comprenden estas bacterias, a diferentes métodos de cultivo y a los productos que los comprenden para el control biológico de bacterias, insectos, nematodos fitopatógenos y hongos.

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

Preferiblemente, la presente invención se refiere al uso de microorganismos de la de la especie ***Bacillus methylotrophicus***, a sus cultivos, a composiciones que comprenden estas bacterias, a diferentes métodos de cultivo y a los productos que los comprenden para el control biológico de bacterias pertenecientes a las especies *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas campestris*; de hongos pertenecientes a las especies *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cynerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cactorum* *Phytophthora cinnamomi*, *Rhizopus oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Thanatephorus cucumeris* y *Verticillium dahliae*; de insectos pertenecientes a la familia *Aphididae*, así como insectos pertenecientes a las especies denominadas comúnmente mosca blanca y/o de nematodos como por ejemplo especies de *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema*, *Trichodorus*, y en general todos los nematodos parásitos de plantas.

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

En una realización particular, la invención se refiere a bacterias que pertenecen a la cepa con número de depósito CECT8661, depositada el 23 de abril de 2014 por la Universidad de Granada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). A lo largo de la presente memoria se podrá hacer referencia a esta cepa con el término "cepa XT1".

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

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

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

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

25

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

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

tanto en las raíces como en las hojas y tallo protege a la planta frente al ataque de otros seres vivos.

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

Las cepas XT1 y XT2 originan esporas elipsoidales no deformantes. En el medio 2xSG, estas bacterias producen entre tres y cinco días más de 5×10^8 esporas/mL.

- 10 Son halotolerantes, crecen óptimamente en un amplio rango de concentraciones de sal [entre el 0 y el 12% (p/v)]. Crecen óptimamente entre 20-45°C y a pH de entre 5-10. Sus requerimientos nutricionales son escasos: pueden crecer con una gran variedad de compuestos orgánicos como única fuente de carbono, como citrato o sacarosa. Son capaces de crecer con nitrato amónico como única fuente de nitrógeno,
15 sin necesidad de la presencia de extracto de levadura o de una fuente de nitrógeno compleja.

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

- Las cepas XT1 y XT2 son anaerobias facultativas. Respiran aerobiamente en presencia de oxígeno y, en ausencia de éste, por ejemplo en las raíces y en las
25 cercanías de éstas, realizan fermentación butanodiólica, produciendo 2,3 butanodiol y acetoína. Utilizan numerosos azúcares como fuente de carbono y energía, produciendo ácidos a partir de ellos. Entre los azúcares que estas cepas utilizan se encuentran el glicerol, la glucosa, la fructosa, el manitol, el sorbitol, la celobiosa, la lactosa y la sacarosa. También pueden realizar la fijación de nitrógeno, es decir en
30 ausencia de una fuente nitrogenada captan el nitrógeno gaseoso y lo transforman en amonio que es la fuente de nitrógeno utilizable por las plantas. Producen dihidroxiacetona y H₂S.

- Las cepas XT1 y XT2 son capaces de sintetizar compuestos quelantes, como los
35 compuestos sideróforos, que captan el Fe³⁺ y lo transforman en Fe²⁺. El ion hierro Fe³⁺ tiene muy poca solubilidad a pH neutro y por ende no puede ser utilizado por los

organismos. Los sideróforos disuelven estos iones a complejos de Fe^{2+} , que pueden ser asimilados por mecanismos de transporte activo.

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

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

20

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

25

En particular, se ha comprobado que las cepas XT1 y/o XT2 objeto de la presente invención tienen una actividad enzimática superior a la cepa del preparado Botrybel; producen mayores halos de hidrólisis frente al almidón (actividad amilasa, véase la Figura 3), gelatina y caseína (actividad proteasa), tween 80 y lecitina (actividad lipasa),
30 y mayor actividad ACC desaminasa y fosfatasa, determinada utilizando fosfato de fenolftaleína y fosfato cálcico. Los halos de hidrólisis se observan como la aparición de una zona transparente en el caso de la hidrólisis del almidón, caseína y lecitina; para la gelatina se observa la licuación de la misma, es decir el paso a estado sólido a líquido; en el caso del tween 80 aparece una zona más opaca de precipitación; para la
35 actividad ACC desaminasa se estudia el crecimiento en medios con amino ciclo propano carboxílico como única fuente de nitrógeno y finalmente la actividad fosfatasa

se observa con la aparición de un color rosa al adicionar amoniaco en la placa con fosfato de fenoltaleína y la solubilización de fosfato cálcico se analiza viendo la zona transparente que se origina alrededor de la masa bacteriana crecida en un medio con este compuesto. Las actividades se han analizado utilizando como control la cepa de *Bacillus velezensis* del preparado Botrybel.

En cuanto a sus actividades como agentes de control biológico frente a hongos, se han determinado los valores de inhibición que presentan las cepas XT1 y XT2 y la cepa tipo de *B. methylothrophicus* frente a *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cynerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cactorum* *Phytophthora cinnamomi*, *Rhizopus oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Thanatephorus cucumeris* y *Verticillium dahliae*. Los valores de inhibición de crecimiento son muy significativos en el caso de *Botrytis cinnerea*. La actividad fue inferior frente a *Fusarium oxysporum*. En general la cepa de *Bacillus* de Botrybel presenta una actividad inferior (y en algunos casos semejante) a las cepas XT1 y XT2 y cepa tipo (véase la tabla 1 en el Ejemplo 2, más adelante).

Las cepa XT1 y la cepa tipo de *B. methylothrophicus* presentan también actividad frente a bacterias fitopatógenas como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas campestris* mientras que la cepa XT2 presenta actividad frente a *P. atrosepticum* y *X. campestris* (véase tabla 2 en el ejemplo 3, más adelante).

Las cepas XT1, XT2 y la cepa tipo de *B. methylothrophicus* presentan actividad frente a *Rhopalosiphum padi* (véase tabla 3) y la cepa XT1 frente a mosca blanca (véase ejemplo 6, b1, más adelante).

Las cepas XT1, XT2 y la cepa tipo de *B. methylothrophicus* disminuyen considerablemente el factor de multiplicación de *Meloidogyne javanica* y el numero de nematodos por planta de tomate y el número de nematodos por g de raíz (véase las figuras 3, 4 y 5) igualmente el tratamiento con la cepa XT1 recuperó plantas de pepino holandés cultivadas en invernadero y altamente infectadas por nematodos, (véase ejemplo 4b, más adelante)

35

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

10

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

20

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

25

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

30

Tras la extracción de los lipopéptidos, siguiendo el método de Cooper *et al.* 1981, se obtuvo para las cepas XT1 y XT2 un rendimiento de 0,12 g/L y 0,10 g/L de cultivo respectivamente. La cepa tipo produjo 0,6 g/L. En el caso de la cepa de *Bacillus* del preparado comercial Botrybel no se ha descrito la producción de lipopéptidos. En

35

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

5 El peso seco celular (PSC) de las cepas XT1, XT2 y de la cepa tipo es de 2,7 g/L, 2.5 g/L y 2,9 g/L respectivamente. En el caso de la cepa XT1, la concentración micelar crítica (CMC) es de 0.0025% (0.025 mg/mL); con este valor se obtuvo una tensión superficial de 29.7mN/m. En el caso de la surfactina producida por *B. subtilis* y comercializada por Sigma® se obtuvieron valores de 26,7 mN/m a la misma CMC. Es
10 decir, la cepa XT1 produce lipopéptidos surfactantes muy activos y con actividad análoga a la surfactina disponible comercialmente.

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

En particular, los lipopéptidos producidos por la cepa XT1 son una mezcla de ácidos grasos de 13, 14 y 15 átomos de carbono, que se unen a un péptido cíclico por leucina
20 o isoleucina. La proporción relativa de estos ácidos grasos es 1, 6,5 y 5,7 respectivamente.

La producción de enzimas (glucanasas, proteasas, lipasas, fosfatasas y ureasa) junto con los distintos lipopéptidos, y la liberación de SH₂ son, de acuerdo con la bibliografía
25 (véase estado de la técnica), responsables de la acción de dichas cepas en el control biológico de hongos, bacterias, insectos y nematodos.

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

- 30 a. Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones de acuerdo con la presente invención; y
b. Poner en contacto una planta con las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones obtenidos en la etapa a).

35 También es objeto de la presente invención un procedimiento para estimular el crecimiento vegetal y/o para el control biológico de nematodos fitopatógenos (como

por ejemplo las especies de los géneros *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema*, *Trichodorus*, y en general todos los nematodos parásitos de plantas) que comprende las etapas de:

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

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

- a. Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones de acuerdo con la presente invención; y
- 15 b. Poner en contacto una planta preferiblemente no afectada por un fitopatógeno con las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones obtenidos en la etapa a.

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

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

25

La presente invención tiene por objeto un procedimiento de control biológico de insectos fitopatógenos pertenecientes a la familia *Aphididae*, así como insectos pertenecientes a las especies denominadas comúnmente mosca blanca que comprende las etapas de:

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

35 En los procedimientos de la presente invención, las bacterias, cultivos y/o composición de la presente invención se pueden poner en contacto con la planta (afectada) por vía

foliar, como por ejemplo mediante pulverización y/o goteo, o por riego tradicional, o por inundación, etc.

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

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

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

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

30

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

35

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

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

De acuerdo con la presente invención, prevención es la disposición que se hace de forma anticipada para minimizar un riesgo. El objetivo de prevenir de acuerdo con la presente invención es lograr que un perjuicio eventual (infección de organismos

15 fitopatógenos) no ocurra.

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

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

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

30 Por lo tanto, también es objeto de la presente invención un procedimiento para el control biológico de organismos fitopatógenos, preferiblemente hongos (excepto los pertenecientes a la especie *Magnaporthe oryzae*), bacterias (preferiblemente *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Ralstonia solanacearum* y

35 *Xanthomonas campestris*, insectos (preferiblemente insectos fitopatógenos pertenecientes a la familia *Aphididae*, así como insectos pertenecientes a las especies

denominadas comúnmente mosca blanca), y/o nematodos (como por ejemplo las especies pertenecientes a los géneros *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema*, *Trichodorus*, y en general todos los nematodos parásitos de plantas), que comprende las etapas de:

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

También es objeto de la presente invención un procedimiento para el control biológico de organismos fitopatógenos, preferiblemente de hongos pertenecientes a las
15 especies *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cynerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cactorum* *Phytophthora cinnamomi*, *Rhizopus oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Thanatephorus cucumeris* y *Verticillium dahliae*, bacterias, preferiblemente pertenecientes a la especie *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas campestris*
20 y/o nematodos, como por ejemplo las especies de los géneros *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema*, *Trichodorus*, y en general todos los nematodos parásitos de plantas, que comprende las etapas de:

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

30

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

35 Además, en el procedimiento de la presente invención, las bacterias, cultivos y/o composiciones de la presente invención se pueden poner en contacto con la planta

afectada al menos una vez, preferiblemente al menos dos veces, preferiblemente al menos tres veces, preferiblemente al menos cuatro veces, preferiblemente al menos cinco veces, preferiblemente al menos seis veces, o más.

5

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

10

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

15

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

20

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

25 composición de la presente invención presentan una concentración de microorganismos de 1,5% (v/v) de un preparado que contenga 5×10^8 UFC/mL.

30

Por lo tanto, es objeto de la presente invención un procedimiento para el control biológico de organismos fitopatógenos, preferiblemente de hongos pertenecientes a las especies *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cynerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cactorum* *Phytophthora cinnamomi*, *Rhizopus oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Thanatephorus cucumeris* y *Verticillium dahliae*; bacterias, preferiblemente pertenecientes a la especie *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas campestris* y/o

35 nematodos, como por ejemplo las especies de los géneros *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema*, *Trichodorus*, insectos pertenecientes a la familia *Aphididae*, así como insectos pertenecientes a las

especies denominadas comúnmente mosca blanca y en general todos los nematodos parásitos de plantas e insectos, preferiblemente la mosca blanca, el pulgón, que comprende las etapas de:

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

Por lo tanto, es objeto de la presente invención un procedimiento para el control biológico de organismos fitopatógenos, preferiblemente de hongos pertenecientes a las especies *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cynerea*, *Fusarium*

25 *oxysporum*, *Phytophthora cactorum* *Phytophthora cinnamomi*, *Rhizopus oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Thanatephorus cucumeris* y *Verticillium dahliae* que comprende las etapas de:

- a. Obtener las bacterias, cultivos de bacterias o composiciones de acuerdo con la presente invención; y
- 30 b. Poner en contacto mediante por ejemplo sistemas de distribución, y/o goteros, y/o sistemas de riego localizado, y/o aspersores, al menos una vez, preferiblemente al menos dos veces, preferiblemente al menos tres veces, preferiblemente al menos cuatro veces, preferiblemente al menos cinco veces, preferiblemente al menos seis veces, o más, a una
- 35 planta afectada por un fitopatógeno utilizando para ello un sistema de distribución de las bacterias, cultivos o composiciones de la presente

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

10 Por lo tanto, es objeto de la presente invención un procedimiento para el control biológico de organismos fitopatógenos, preferiblemente de bacterias, preferiblemente pertenecientes a la especie *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas campestris* que comprende las etapas de:

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

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

35 los nematodos parásitos de plantas, que comprende las etapas de:

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

20

Por lo tanto, es objeto de la presente invención un procedimiento para el control biológico de organismos fitopatógenos, preferiblemente de insectos, como por ejemplo las especies pertenecientes a la familia *Aphididae*, así como insectos pertenecientes a las especies denominadas comúnmente mosca blanca, que comprende las etapas de:

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

preferiblemente una vez cada 10 días, durante 60 días, o una vez cada día durante 8-12 días.

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

25 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. El término “comprende” engloba también al término “consiste en”. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los

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

EJEMPLOS

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

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

Ejemplo 2. Uso de las cepas XT1, XT2 y cepa tipo como antifúngicos

La actividad frente a los hongos (tabla 1) fue realizada sembrando las cepas XT1, XT2 la cepa tipo y la de Botrybel en una pequeña extensión en medio PDA (patata dextrosa agar). A continuación se colocó en el extremo opuesto un trozo de agar de aproximadamente 1 cm² con micelio del hongo a testar, y a los 20 días y tras incubación a 25°C se procedió a medir el radio máximo y mínimo del micelio del hongo para calcular el porcentaje de reducción de crecimiento del hongo

Hongos	Actividad antifúngica			
	XT1	XT2	Cepa tipo	Botrybel
<i>Alternaria alternata</i>	27 y 14 (49)	24 y 19 (21)	25 y 8 (68)	24 y 20 (17)
<i>Aspergillus niger</i>	30 y 22 (27)	25 y 10 (60)	ND	0
<i>Botrytis cynerea</i>	45 y 8 (83)	45 y 2 (96)	40 y 20 (50)	46 y 16 (56)
<i>Fusarium oxysporum</i>	30 y 28 (7)	0	32/29 (10)	0
<i>Phytophthora cactorum</i>	8 y 3 (63)	8 y 3 (63)	ND	8 y 6 (21)
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	22 y 16 (28)	22 y 15 (32)	16 y 12 (21)	20 y 14 (30)
<i>Rhizopus oryzae</i>	45 y 8 (82)	50 y 12 (76)	ND	40 y 7 (82)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	16 y 7 (56)	16 y 12 (25)	16 y 10 (37)	ND
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	12 y 7 (42)	16 y 10 (37)	16 y 7 (56)	ND
<i>Verticillium dahliae</i>	25 y 12 (52)	24 y 12 (50)	25 y 14 (44)	23 y 13 (44)

Tabla 1.- Valores de inhibición máximos y mínimos frente a distintos hongos expresados en mm, entre paréntesis porcentaje de reducción del micelio. ND: No determinado

5 Entre los hongos ensayados, la mayor inhibición se logró frente a *Botrytis* (cepas XT1 y XT2) y la menor frente a *Fusarium* (Figura 1).

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

Ejemplo 3. Uso de las cepas XT1, XT2 y cepa tipo como agentes antibacterianos

La actividad antibacteriana se determinó incorporando, en una placa Petri con agar tripticasa soja (TSA), una sobrecapa con 6 ml de TSA estéril a 45°C y 1 ml de un cultivo de la cepa fitopatógena a analizar en fase exponencial de crecimiento en una concentración equivalente a la escala 1 de Mac Farland. A continuación una vez solidificado el medio se inoculó en un pocillo 100 µL de sobrenadante de los cultivos. Tras 24 horas de incubación se realizó la medida de la zona de inhibición (Tabla 2. Figura 2).

	<i>X. campestris</i>	<i>P. atrosepticum</i>	<i>R. solanacearum</i>	<i>A. tumefaciens</i>
XT1	6	3	1	4
XT2	5	2	R	R
Cepa tipo	8	5	3	5

Tabla 2.- Actividad antibacteriana. Resultados expresados en mm de inhibición de crecimiento.

R: Resistente

25

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

a) Ensayos en plantas de tomate inoculadas con *Meloidogyne javanica* (Fig. 3, 4, y 5)

30

Se utilizaron 5 lotes de 10 plantas de tomate cada uno (*Solanum lycopersicum*). Tres lotes se inocularon con las cepas seleccionadas (2×10^8 UFC) y posteriormente con

M. javanica J2 (1500). Finalmente dos lotes, con y sin nemátodos, se utilizaron de control. A los 50 días se determinó el número de nematodos en el suelo de cada planta, en las raíces y se calculó el factor de multiplicación (Talavera y col. 2012). Los resultados obtenidos pueden verse en las figura 3, 4 y 5.

Se observa que todas las cepas disminuyen el el factor de multiplicación de los nemátodos, el número de nematodos por planta y el número de nematodos por g de raíz, siendo los descensos más acusados en caso de las cepas XT1 y XT2.

b) Ensayo en invernadero con la cepa XT1 en un cultivo de pepino holandés con problemas recurrentes cada año por exceso de humedad en suelo, dificultad para el enraizamiento y alta incidencia de pudrición en la raíz, así como infección por nematodos.

Se utilizó un sector de 2000 m² para inyectar en el riego por goteo y otro sector similar como control. Se aplicaron 7.5 L de cultivo en 6 aplicaciones separadas por un periodo de 10 días (1, 250 l de un cultivo con al menos 10⁸ UFC/mL en cada aplicación). Tanto en el sector control como tratamiento se mantuvieron los tratamientos habituales tanto fertilizantes como fitosanitarios. El número de plantas perdidas durante este tratamiento en el sector control fue de 36 mientras que el tratado con la cepa XT1 fue de 6. Las diferencias en la producción fueron también significativas obteniéndose un 30% más de producción en el sector tratado.

Ejemplo 5. Uso de la cepa XT1, XT2 y cepa tipo como agentes para control biológico de insectos

a) Se hicieron experimentos en el laboratorio con el pulgón de la cebada (*Rhopalosiphum padi*) y *Anthocoris nemoralis* con el fin de determinar el porcentaje de mortalidad, que originan los cultivos bacterianos de las tres cepas de *B. methylotrophicus* y sus surfactantes, sobre estos insectos. Dado que el primero es un insecto chupador los ensayos se hacen únicamente por vía tópica mientras que en el segundo caso se hacen tanto por vía tópica como por ingestión.

Se analizó la actividad de los cultivos bacterianos de las cepas XT1 y XT2 con 5 x 10⁸ UFC/ml, así como de sus surfactantes a una concentración 1/1000 en agua destilada,

en ambos tipos de insectos, por uso tópico. Para cada tratamiento se utilizaron 10 individuos. En el caso de *Anthocoris* se aplicaron 5 µl con una pipeta sobre el cuerpo de los mismos y en los pulgones se les impregnó la misma cantidad con un pincel.

5 Como control se utilizó el medio de cultivo bacteriano SG. Los resultados obtenidos expresados en porcentaje de mortalidad tras 48 h son los siguientes:

Insecto	XT1	Surfactante XT1	XT2	Surfactante XT2	Control (Medio de cultivo)
<i>Anthocoris</i>	70	100	20	ND	70
Pulgones	30	60	80	60	10-30

Tabla 3. Mortalidad por uso tópico en el pulgón de la cebada *Rhopalosiphum padi* y *Anthocoris nemoralis*. Resultados expresados en porcentaje de individuos

10

Igualmente se analizó la actividad de los cultivos bacterianos de las cepas XT1, XT2 y la cepa tipo de *B. methylotrophicus* con 5×10^8 UFC/ml, así como de los tres surfactantes correspondientes, a una concentración 1/1000 en agua destilada por ingestión sobre *Anthocoris nemoralis*. Como control se utilizó agua y Tween 80 (dilución 1/1000). Los distintos productos se aplicaron sobre una esponja humedecida con agua (1 ml) y por pulverización (0.25 ml) sobre la comida (huevos de *Ephestia kuhniella*) procurando que estuviera bien cubierta. Para cada tratamiento se realizaron 4 repeticiones de cinco individuos observándose diariamente durante 6 días. Los resultados obtenidos, expresados en porcentaje de mortalidad, se indican en la siguiente tabla:

20

Cepa Tipo	Surfactante Cepa Tipo	XT1	Surfactante XT1	XT2	Surfactante XT2	Control (Agua)	Tween 80
5	25	15	20	15	20	10	5

Tabla 4. Mortalidad por ingestión en *Anthocoris nemoralis*. Resultados expresados en porcentaje de individuos

25

b) Además, se llevó a cabo el tratamiento de un nectarino *Prunus persica* var. *nectarina* altamente afectado por una plaga de pulgones, verdes y negros (véase Fig. 6). Con un cultivo de XT1 con 5×10^8 UFC/ml. Concretamente se administró por vía foliar 50 ml de una dilución al 5% de dicho cultivo cada 10 días. Tras la segunda aplicación la población prácticamente desapareció aunque quedaron pequeñas zonas con pulgones en el extremo de algunas hojas que permanecían enrolladas y se eliminaron manualmente. Trascurrido un mes la plaga quedó controlada.

30

c) Igualmente se observó la desaparición de mosca blanca en cultivo de tomates de invernaderos tratados con la cepa XT1 (véase ejemplo 6 b1)

5

Ejemplo 6. Uso de las cepas XT1, XT2 y cepa tipo como agentes fitofortificantes

a) Ensayo en maceta con plantas de pimiento (género *Capsicum*) y calabaza (género *Cucurbita*) con las cepas XT1, XT2 y cepa tipo

10

Se utilizaron dieciséis plántulas de 5 cm de altura de cada una de las plantas anteriores que se trasplantaron a macetas de 10 cm de diámetro y 15 cm de altura y se dejaron al aire libre a temperatura ambiente (rango de temperatura 20-38°C) durante 35 días. Las macetas se regaron cada 48 h con la misma cantidad de agua (aproximadamente 50 mL). Se hicieron 4 lotes de 4 macetas de cada tipo de planta. Cada siete días se adicionó a tres lotes de cada tipo de planta, y después de regar, 5 mL de una dilución 1/100 de un cultivo de *Bacillus* cepa XT1, cepa XT2 y cepa tipo con 5×10^8 UFC/mL. Un lote de cuatro macetas de cada tipo se utilizó como control y por tanto no se inoculó con cultivos bacterianos. A los 35 días se cortó la parte aérea y se pesó. Los resultados obtenidos se observan en la tabla adjunta.

20

	Calabaza		Pimiento	
	Peso (g)	Incremento con respecto control (%)	Peso (g)	Incremento con respecto control (%)
Cepa tipo	6,7±1,4	45,6	5,6±1,5	64,7
XT1	8,15±1,8	77,1	5,2±1,2	52,9
XT2	5,4±0,4	17,4	5,2±1,3	52,9
Control	4,6±0,5	0	3,4±1,4	0

Tabla 5. Efecto fitofortificante de las cepas XT1, XT2 y cepa tipo

25

Nota: En el cultivo del pepino hubo una pérdida, por las condiciones climatológicas y plagas, del 50% de plantas, en caso del control y en las regadas con la cepa tipo, y del 25% en las regadas con la cepa XT2; sin embargo todas las plantas regadas con XT1 se mantuvieron en condiciones óptimas.

b) Además con la cepa XT1 se hicieron:

b.1. Ensayo en cultivos de tomate de pera de invernaderos.

5

Se realizaron tratamientos por vía foliar a tres dosis distintas del caldo de cultivo conteniendo al menos 10^8 UFC/mL (0.5, 1 y 1.5% v/v) mediante pulverización y con dos repeticiones (a tiempo cero y a los 30 días). En cada tratamiento se trataron 6 plantas. Se utilizó un control, sin tratar. Durante el período del estudio, en el invernadero, y por tanto en el control, hubo varias plagas: mosca blanca, pulgón, oidio y *Botrytis*. El número de plantas que se perdieron en las zonas tratadas con el cultivo de la cepa XT1 fue inferior a las pérdidas en la zona control, siendo la dosis más adecuada la del 1.5% (v/v). Por otra parte el peso de los tomates recolectados de las plantas tratadas fue superior a la de la planta control (véase Tabla 6).

15

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

Tabla 6. Plantas de tomates perdidas y peso de los tomates recolectados en dos zonas de cultivo de tomate de pera de invernadero tras tratamiento con XT1

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

25

b.2. Ensayo en maceta con la cepa XT1 a mayor plazo de tiempo con cultivo de plantas de tomates (*Solanum lycopersicum*), pimientos (género *Capsicum*), calabaza (género *Cucurbita*) y pepino (*Cucumis sativus*) sanas y ya desarrolladas.

30

Se utilizaron cuatro plántulas de 10 cm de altura de cada una de las especies anteriores (tomates (*Solanum lycopersicum*), pimientos (género *Capsicum*), calabaza (género *Cucurbita*) y pepino (*Cucumis sativus*). Se trasplantaron a macetas de 10 cm de diámetro y 15 cm de altura y se dejaron al aire libre a temperatura ambiente (rango de temperatura 15-32°C). Las macetas se regaron cada 48 h con la misma cantidad de

agua (aproximadamente 100 mL). Cada siete días se adicionó a la mitad de las macetas y después de regar 5 mL de una dilución 1/100 de un cultivo de *Bacillus* XT1 con 5×10^8 UFC/mL La otra mitad se utilizó como control y por tanto no se inoculó. A los 50 días se cortó la parte aérea y se pesó. Igualmente se anotó el número de hojas, flores y frutos así como la altura de las mismas. Los resultados obtenidos (valores medios) se observan en la tabla adjunta. Se obtiene un incremento del peso de la vegetación aérea del 86%, un aumento del número de hojas del 57,6% y un incremento del número de frutos y flores del 112,5 y 137,5% respectivamente (véase Tabla 7). Además el tamaño de la planta tratada se incrementó un 38,3%. En la Fig. 7 pueden observarse los resultados en el cultivo de calabaza.

	Tratamiento	Nº de hojas	Peso parte aérea (g)	Altura (cm)	Nº frutos	Nº flores
Pimiento	Ninguno	12	7,7	38	0	0
Pimiento	XT1	14	12,6	46,5	1	1
% de incremento		16,7	62	22,4	100	100
Pepino	Ninguno	7	12,1	30,5	0	3,5
Pepino	XT1	14	24,3	33	0,5	8,5
% de incremento		100	101,2	8,2	50	142,9
Calabaza	Ninguno	8	8,9	30,5	0	3,5
Calabaza	XT1	12,5	20,4	33,5	2	5,5
% de incremento		56,2	128,5	9,8	200	57,1
Tomate	Ninguno	ND	13,2	46	0	0
Tomate	XT1	ND	20,1	52	1	2,5
% de incremento			52,7	113	100	250
Incremento global medio		57,6	86	38,3	112,5	137,5

Tabla 7. Efecto del riego con XT1 en plantas de pimiento, pepino, tomate y calabaza. Se indica la media

REIVINDICACIONES

1. Microorganismo perteneciente a *Bacillus methylotrophicus* cepa XT2 (número de depósito CECT8662) depositada el 23 de abril de 2014 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) por la Universidad de Granada y/o microorganismos con un alto grado de homología con la cepa XT2 cuya secuencia de ADN del gen 16S rRNA sea idéntica en al menos el 99.6%,99.7%, 99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN de la cepa XT2, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN.
2. Cultivo de microorganismos que comprende bacterias de *Bacillus methylotrophicus* XT2 (número de depósito CECT8662) depositada el 23 de abril de 2014 por la Universidad de Granada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y/o cultivo de microorganismos que comprende bacterias con un alto grado de homología con la cepa XT2 cuya secuencia de ADN sea idéntica en al menos el 99.6%, 99.7%, 99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN de la cepa XT2, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN.
3. Cultivo de microorganismos de acuerdo con la reivindicación 2 que consiste en bacterias pertenecientes a la especie *Bacillus methylotrophicus*, cepa XT2 (número de depósito CECT8662) depositada 23 de abril de 2014 por la Universidad de Granada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y/o cultivo de microorganismos de acuerdo con la reivindicación 2 que consiste en bacterias con un alto grado de homología con la cepa XT2 cuya secuencia de ADN sea idéntica en al menos el 99.6%, 99.7%, 99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN de la cepa XT2, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN.
4. Composición que comprende bacterias pertenecientes a la especie *Bacillus methylotrophicus*, cepa XT2 (número de depósito CECT8662) depositada 23 de abril de 2014 por la Universidad de Granada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y/o bacterias pertenecientes a la especie *Bacillus methylotrophicus* y/o composición que comprende bacterias con un alto grado de homología con la cepa XT2 cuya secuencia de ADN sea idéntica en al menos el 99.6%, 99.7%, 99.8% o el 99.9% con la secuencia de ADN de la cepa XT2, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dichas secuencias de ADN.

5. Uso de los microorganismos de acuerdo con la reivindicación 1 y/o del cultivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3 y/o de la composición de acuerdo con la reivindicación 4 en un procedimiento para estimular el crecimiento vegetal.
6. Uso de los microorganismos de acuerdo con la reivindicación 1 y/o del cultivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3 y/o de la composición de acuerdo con la reivindicación 4 en un procedimiento de control biológico de organismos fitopatógenos.
- 10 7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que los organismos fitopatógenos son bacterias y/o insectos y/o hongos y/o nematodos.
8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque los organismos fitopatógenos son insectos
9. Uso de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizado por que el insecto pertenece a la familia *Aphididae* o a cualquiera de las especies denominadas comúnmente "mosca blanca"
- 15 10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado por que el insecto es un pulgón.
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que los organismos fitopatógenos son nematodos.
- 20 12. Uso de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizado por que el nematodo pertenece a una de los siguientes géneros: *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema* o *Trichodorus*.
13. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que los organismos fitopatógenos son hongos.
- 25 14. Uso de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizado por que los hongos pertenecen a una o más especies seleccionadas de la lista que consiste en: *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cynerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Rhizopus oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Thanatephorus cucumeris* y *Verticillium dahliae*
- 30

15. Uso de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizado por que los hongos pertenecen a la especie *Botrytis cinerea*.
16. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que los organismos
5 fitopatógenos son bacterias.
17. Uso de acuerdo con la reivindicación anterior caracterizado, caracterizado por que las bacterias pertenecen a la especie *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas campestris*.
18. Procedimiento para estimular el crecimiento vegetal que comprende las etapas
10 de:
a. Obtener un microorganismo y/o un cultivo de bacterias y/o una composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4; y
b. Poner en contacto una planta con el microorganismo y/o cultivo de bacterias y/o composición obtenidas en la etapa a.
- 15 19. Procedimiento de control biológico de organismos fitopatógenos que comprende las etapas de:
a. Obtener un microorganismo y/o un cultivo de bacterias y/o una composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4; y
b. Poner en contacto una planta afectada por un fitopatógeno con el
20 microorganismo y/o cultivo de bacterias y/o composición obtenidas en la etapa a.
20. Procedimiento según la reivindicación 19, caracterizado por que el organismo fitopatógeno es un nematodo.
21. Procedimiento según la reivindicación 20, caracterizado por que el nematodo pertenece a una de los siguientes géneros: *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*,
25 *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Ratylenchus*, *Xiphinema* o *Trichodorus*.
22. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-21, caracterizado por que los microorganismos, el cultivo de bacterias y/o composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4 se ponen en contacto con la planta afectada por vía foliar.
- 30 23. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizado por que los microorganismos, el cultivo de bacterias y/o composición de acuerdo con una o

más de las reivindicaciones 1 a 4 se ponen en contacto con la planta afectada mediante pulverización y/o goteo.

5 24. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-21, caracterizado por que los microorganismos, el cultivo de bacterias y/o composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4 se ponen en contacto con la planta afectada mediante el uso de sistemas de riego localizado.

25. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizado por que el sistema de riego localizado es un microaspersor.

10 26. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-23, caracterizado por que los microorganismos, el cultivo de bacterias y/o composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4 se ponen en contacto con la planta afectada mediante el uso de aspersores.

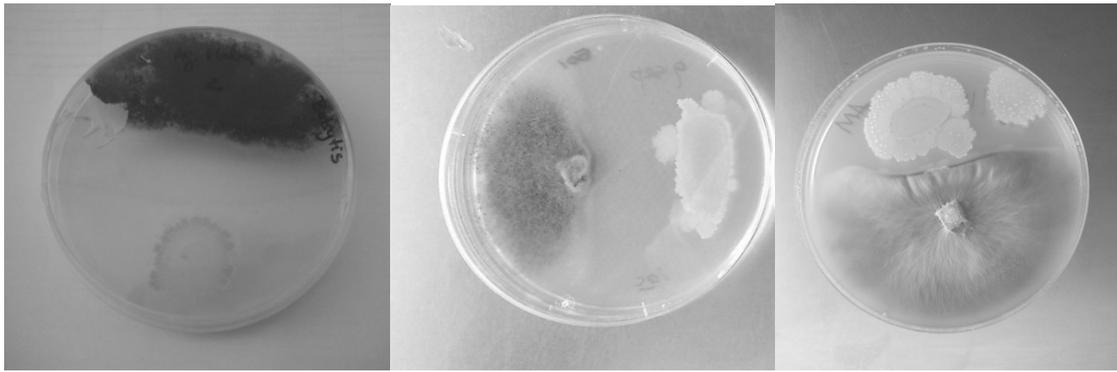
15 27. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-26, caracterizado por que los microorganismos, el cultivo de bacterias y/o composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4 se ponen en contacto con la planta afectada mediante el uso de goteros.

20 28. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-27, caracterizado por que los microorganismos, el cultivo de bacterias y/o composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 8 se ponen en contacto con la planta afectada al menos dos veces, una a $t=0$ y otra al menos tras 30 días.

25 29. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-28, caracterizado por que los microorganismos, el cultivo de bacterias y/o composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4 presentan una concentración de microorganismos de al menos 5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml utilizados a una dilución entre 0,5-5%(v/v).

30 30. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior, caracterizado por que los microorganismos, el cultivo de bacterias o composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4 presentan una concentración de microorganismos de 1,5% (v/v).

- 5 31. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-30 caracterizado en que los microorganismos, el cultivo de bacterias y/o composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4 se ponen en contacto con la planta afectada al menos 6 veces durante 6 días.
32. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-30 caracterizado en que los microorganismos, el cultivo de bacterias y/o composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4 se ponen en contacto con la planta afectada al menos 2 veces durante 30 días.
- 10 33. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-30 caracterizado en que los microorganismos, el cultivo de bacterias y/o composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4 se ponen en contacto con la planta afectada al menos 2 veces durante 30 días, una vez a tiempo $t=0$ días y otra vez a tiempo $t=30$ días.



Botrytis y XT1

Botrytis y XT2

Fusarium y XT1

Figura 1

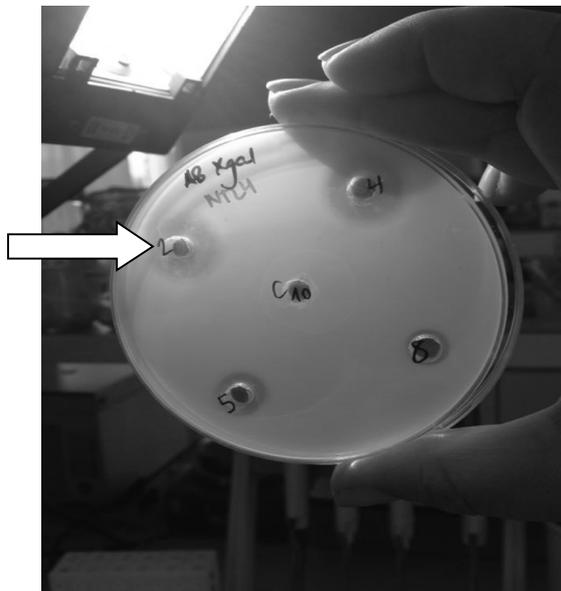


Figura 2

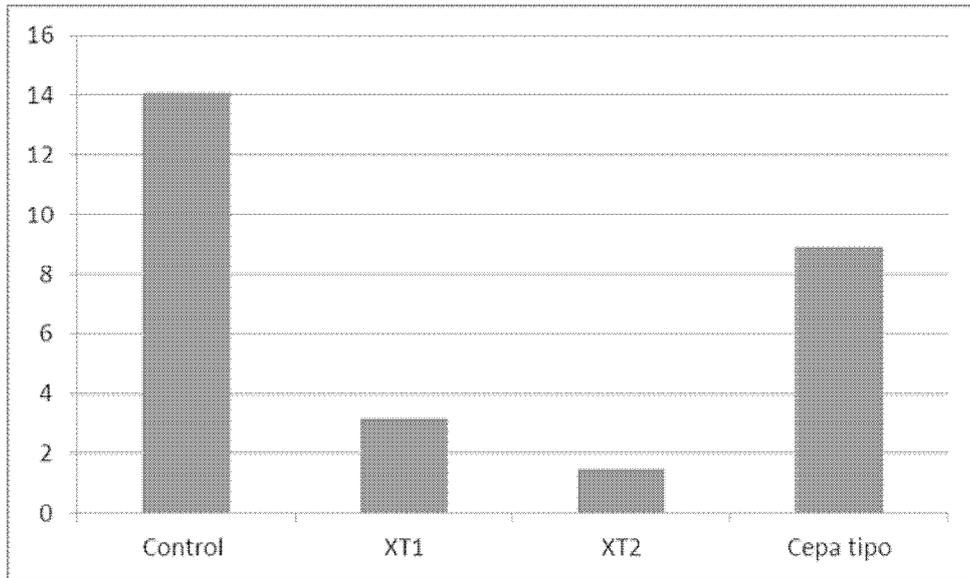


Figura 3

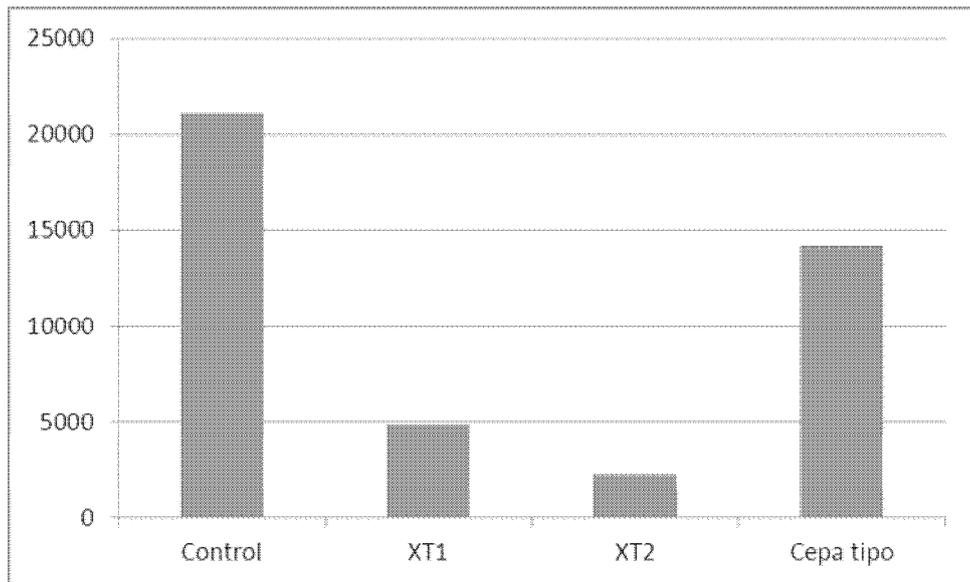


Figura 4

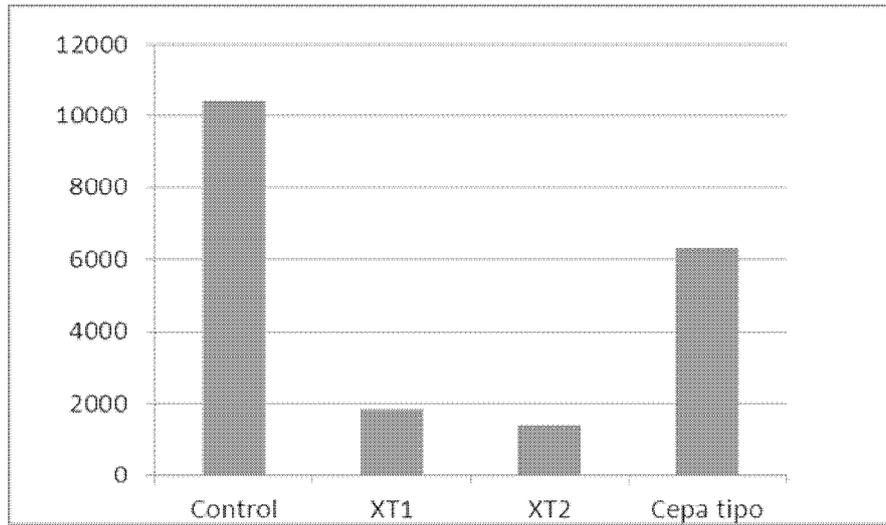


Figura 5



Figura 6



Figura 7