

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 702**

21 Número de solicitud: 201731407

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A01P 7/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

14.12.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

14.06.2019

71 Solicitantes:

RGA BIO-INVESTIGACION, S.L. (100.0%)
Av. Portugal, 41
24009 LEON (León) ES

72 Inventor/es:

DIEZ GALAN, Alba;
COBOS ROMAN, Rebeca;
ALVAREZ PEREZ, Jose Manuel;
GONZALEZ GARCIA, Sandra;
MEDINA TURIENZO, Jesus Esteban;
SANCHEZ GARCIA, Mario;
OLEGO MORAN, Miguel Angel;
GARZON JIMENO, Jose Enrique;
IBAÑEZ SANCHEZ, Ana Maria y
RUBIO COQUE, Juan Jose

74 Agente/Representante:

TORO GORDILLO, Francisco Javier

54 Título: **Producto y procedimiento para el control de la procesionaria del pino (*Thaumetopoea pityocampa*) para su aplicación para la degradación de la seda de sus nidos o bolsones**

57 Resumen:

Producto y procedimiento para el control de la procesionaria del pino (*Thaumetopoea pityocampa*) para su aplicación para la degradación de la seda de sus nidos o bolsones. El producto consiste en cepas bacterianas aisladas y seleccionadas, con la particularidad de degradar la seda de los nidos o bolsones de la procesionaria, acelerando su biodegradación y desorganización notablemente.

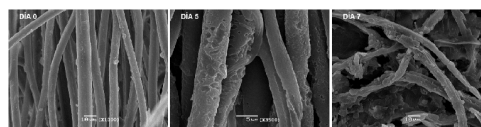


FIGURA 2

DESCRIPCIÓN

Producto y procedimiento para el control de la procesionaria del pino (*Thaumetopoea pityocampa*) para su aplicación para la degradación de la seda de sus nidos o bolsones

5 Producto para el control de la plaga de procesionaria del pino y procedimiento para su aplicación en masas forestales. El producto consiste en tres cepas bacterianas denominadas *Pseudomonas aeruginosa* RGA1, *Stenotrophomonas sp.* RGA2 y *Bacillus licheniformis* RGA3.

10 Las tres cepas se han aislado de seda de procesionaria del pino obtenida de nidos recogidos en bosques de pino.

Estas cepas se seleccionaron en base a su capacidad para biodegradar seda de procesionaria en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

15

OBJETO DE LA INVENCION

20 La presente invención se refiere al aislamiento de cepas bacterianas aisladas de muestras de suelo, compost o seda de procesionaria del pino y su selección por su capacidad para biodegradar seda de procesionaria.

25 El objeto de la invención es implementar una tecnología económica, de fácil aplicación y que pueda ser aplicada sobre nidos de procesionaria colonizando masas forestales de coníferas con el fin de favorecer la degradación y desorganización de los nidos de procesionaria, haciendo a la plaga de ser más susceptible de ser eliminada, bien por las propias condiciones ambientales, o por la aplicación de insecticidas o bioinsecticidas.

30 El método de la invención encuentra especial aplicación en masas forestales de coníferas o coníferas presentes en zonas recreativas (parques y jardines) para combatir la plaga de procesionaria.

35 Las bacterias aisladas son capaces de degradar totalmente seda de procesionaria (0.25-0.5 mg/ml) en suspensión acuosa. De acuerdo con el método se ha comprobado que la aplicación por pulverización de suspensiones bacterianas sobre nidos de procesionaria aceleran de 2 a 7 veces su velocidad de degradación, cuando se compara con la velocidad normal de degradación de nidos en condiciones ambientales normales y dependiendo la velocidad de degradación de las condiciones ambientales reinantes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

45 La procesionaria del pino (*Thaumetopoea pityocampa*) es una especie de lepidóptero de la familia *Thaumetopoeidae*. Se trata de una especie muy abundante en los bosques de pinos de Europa del Sur y central, donde es una plaga muy extendida. Además de los pinos, habita en otras coníferas como cedros y abetos. Las orugas (fase de larva) se alimentan de acículas (hojas) provocando graves daños al árbol, que puede incluso llegar a secarse. Además, las orugas están cubiertas de pelos urticantes que se desprenden y flotan en el aire, por lo que pueden provocar irritación en oídos, nariz y garganta en los seres humanos y otros animales, así como intensas reacciones alérgicas. La sustancia que le confiere esta capacidad urticante es una toxina termolábil denominada Thaumetopina.

50

Por todo ello la procesionaria del pino se considera una plaga que tiene un gran impacto económico en explotaciones forestales de coníferas, además de producir graves daños de salud en personas y animales.

5 La distribución de esta especie está estrechamente relacionada con las restricciones climáticas, especialmente con las temperaturas de invierno y de verano y con la duración de luz solar
 10 diaria. (Huchon & Demolin, 1970, *Revue Forestière Française*, (S), 220.). El rango de distribución era relativamente estable hasta que en los años 90 se detectó una drástica expansión hacia el Suroeste de Europa claramente asociado al cambio climático (Battisti et al., 2005, *Ecol. Appl.* 15: 2084-2096), así como una tendencia a colonizar alturas cada vez mayores en las cadenas montañosas (Battisti et al., 2006, *Global Change Bio.*, 12: 662-671). Actualmente la procesionaria del pino está presente en regiones con clima Atlántico y Mediterráneo en Europa (Albania, Bosnia y Herzegovina, Bulgaria, Croacia, Francia, Grecia, Italia, Macedonia, Montenegro, Portugal, Serbia, Eslovenia, España and Suiza), en una parte de Turquía y en el Norte
 15 de África (Argelia, Marruecos, Túnez y Libia) (Pimentel et al., 2010, *Biological Journal of the Linnean Society*, 100: 224–236)

La procesionaria del pino está presente en la mayor parte de España, solo limitando su distribución aquellas zonas en las que el área de pinos es escasa. La expansión en España es un
 20 hecho real. Estudios recientes demuestran sus movimientos en zonas en las que la altitud es más elevada. Esto es debido a que se ha registrado un incremento en la temperatura media de la Península Ibérica entre los años 1971 y 2000, pasando de 14,63 °C a 15,09 °C.

Como consecuencia se han registrado focos de la procesionaria del pino en condiciones de
 25 altitud inusuales para estas especies hace 20 años (2,250 m en Sierra Nevada, 2,200 m en Sierra de Baza, 1,800 m en Sierra de Gúdar y a 2,000 m en laderas Sur en los Pirineos). Actualmente el único lugar al que no ha llegado la plaga en España es a las Islas Canarias y los últimos lugares en los que se ha detectado su presencia son Ceuta y Melilla.

30 El ciclo de vida de la procesionaria del pino tiene generalmente un año de duración, pero debido a la diapausa que pueden tener las crisálidas de esta especie se puede alargar hasta cuatro años y de esta manera prolongar una parte de la población su ciclo biológico.

35 En este ciclo biológico podemos distinguir dos grandes etapas que se desarrollan en dos estratos diferenciados del ecosistema forestal:

- Una fase que llamamos aérea o “epigea” sobre el pino (fases de imago, huevo y larva). Es en esta fase de larva donde la procesionaria es más dañina, ya que desarrolla un apetito voraz, consumiendo grandes cantidades de material vegetal y cuando tiene lugar la formación
 40 de los bolsones o nidos de invierno y, por tanto, el emplazamiento definitivo de la colonia. Además, después de la muda la larva adquiere su aspecto típico definitivo, que varía en función de las condiciones climáticas de cada zona. También en esta fase se forman los dardos urticantes, que pueden causar serias alergias en humanos y urticarias.

- Otra fase subterránea o “hipogea” (fase de crisálida o pupa) (Demolin, 1987, *Etudes vauclausienne* 3:157–173). El paso de una etapa a otra se caracteriza por una migración primaveral y colectiva de las orugas que, ya maduras, abandonan el nido para ir a enterrarse a algunos centímetros bajo tierra, y después en verano por la emergencia de los imagos que aseguran el retorno sobre el hospedador vegetal.

50 En la actualidad existen diferentes tratamientos para el control de la procesionaria, aunque son ineficientes y en algunos casos difíciles de aplicar o caros. Entre dichos medios podemos citar:

1.- Control químico. La lucha química consiste en la fumigación con insecticidas autorizados (piretroides e inhibidores de quitina, avermectina, etc). Deben aplicarse sobre las fases larvianas en los primeros estadios de desarrollo, antes que desarrollen los pelos urticantes de tercer estadio. Pueden aplicarse utilizando medios terrestres. Hasta el 15 de septiembre de 2012 se utilizaban los medios aéreos, pero estos han sido prohibidos en la U.E., y en España desde esa fecha, tras la publicación del Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre, por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios. Ello supone una imposibilidad práctica de combatir con eficacia el control de procesionaria en masas forestales utilizando métodos químicos.

2.- Control con medios manuales. Los medios físicos pasan por la eliminación de los bolsones, cuando las orugas están dentro. Éstos se cortan, apilan e incineran destruyendo las poblaciones larvales. En el pasado se disparaba contra los bolsones de abajo hacia arriba colocando la escopeta en dirección paralela al tronco para no dañar a la guía utilizando cartuchos de perdigones muy pequeños. Actualmente existen ecotrampas que se colocan alrededor del tronco del árbol y que capturan una parte de las orugas que descienden de las copas de los árboles. Este método tiene el inconveniente que es caro especialmente por el coste de mano de obra que supone, por lo que en la práctica su uso en masas forestales es inviable.

3.- Control biológico. Se basa en el empleo de depredadores naturales, fundamentalmente murciélagos y paseriformes como el carbonero común o el cuco común. No obstante, se trata de un método de control que apenas es utilizado por la dificultad de asentar los depredadores introducidos en las masas forestales. Otro tipo de control biológico se basa en el empleo de *Bacillus thuringiensis* (Battisti et al., 1998, Journal Pest Science 71: 72–76).

Por tanto y a modo de resumen podemos decir que la plaga de la procesionaria se encuentra en franca expansión debido a la ausencia de métodos de control efectivos o a la prohibición de métodos de aplicación, como por ejemplo el empleo de fumigaciones utilizando medios aéreos.

La seda de procesionaria es un material altamente desconocido en cuanto a sus propiedades. Se trata de una β -proteína del grupo de las fibroína que típicamente presenta una gran resistencia a la biodegradación (Shaw y Smith, 1961, Biochimica et Biophysica Acta 46: 302-310), cuando se la compara con la seda de otros insectos, especialmente la producida industrialmente por el gusano de seda *Bombyx mori*. Los nidos construidos con esta seda son altamente resistentes (de hecho no se ha encontrado en la bibliografía ninguna referencia relativa a la degradación de seda de procesionaria) y ofrecen cobijo a la larvas, protegiéndolas de las condiciones ambientales (fundamentalmente las bajas temperaturas) y suponiendo un impedimento físico a la entrada de insecticidas. Es por ello que cualquier estrategia de desorganización de los nidos supone un posible mecanismo de control de esta plaga.

40

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION.

La tecnología que se preconiza está concebida para colaborar a resolver un punto concreto de la problemática anteriormente expuesta, concretamente favorecer la degradación y desorganización de los nidos de procesionaria mediante la aplicación de bacterias seleccionadas con capacidad para degradar seda de procesionaria.

A).- Cepas *Pseudomonas aeruginosa* RGA1, *Stenotrophomonas sp.* RGA2: descripción y *Bacillus licheniformis* RGA3.

En un aspecto la invención se relaciona con tres cepas bacterianas pertenecientes a las especies *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas sp.* y *Bacillus licheniformis* seleccionadas a partir de muestras de seda de procesionaria. Estas cepas muestran una elevada capacidad de degradación de seda de procesionaria.

Los cultivos respectivos de las cepas *Pseudomonas aeruginosa* RGA1, *Stenotrophomonas. sp.* RGA2 y *Bacillus licheniformis* RGA3 están conservadas y depositadas de forma permanente en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), ubicada en la Universidad de Valencia; Edificio de Investigación; Campus de Burjassot; 46100-Burjassot (Valencia), con los números de acceso respectivos CECT 9473, CECT 9474 y CECT 9493.

Las cepas *P. aeruginosa* RGA1, *Stenotrophomonas sp.* RGA2 y *Bacillus licheniformis* RGA3 presentan, entre otras, las siguientes características que se indican a continuación:

I).- Cepa RGA1. La cepa RGA1 es un bacilo aerobio y Gram-negativo, móvil. Presenta un buen crecimiento en el rango 30-37°C en varios medios de cultivo incluyendo YPD, TSA o agar nutritivo. En agar nutritivo crece formando colonias rugosas con el centro elevado y hundido y estriado en los bordes (en forma de huevo frito), pigmentadas de color azul-verdoso y viran el color del medio de un color amarillento a un tono marrón claro. Las colonias tienen un tamaño de aproximadamente 2 mm de diámetro tras 24 horas de incubación a 37 °C. La secuenciación parcial de su ADN ribosomal 16S mostró una homología del 100% con varias cepas de la especie *Pseudomonas aeruginosa*. La secuenciación de su genoma mostró que los genomas más parecidos corresponden a varias cepas de esa misma especie. Por ello la cepa RGA1 se identificó como perteneciente a la especie *Pseudomonas aeruginosa*.

II).- Cepa RGA2. La cepa RGA2 es un bacilo aerobio y Gram-negativo, móvil. Presenta un buen crecimiento en el rango 30-37°C en varios medios de cultivo incluyendo YPD, TSA o agar nutritivo. En medio agar nutritivo crece formando colonias circulares pequeñas de color amarillento con el centro elevado. El aspecto de las colonias es gelatinoso y su tamaño aproximado es de 1 mm tras 48 de incubación a 37 °C. La secuenciación parcial de su ADN ribosomal 16S mostró una homología del 100% con varias cepas de la especie *Stenotrophomonas sp.* La secuenciación de su genoma mostró que los genomas más parecidos corresponden a varias cepas de esa misma especie aisladas de muestras ambientales. Por ello la cepa RGA2 se identificó como perteneciente al género *Stenotrophomonas sp.*, sin poder ser asignada a una especie concreta, dado el escaso conocimiento de este género.

III).- Cepa RGA3. La cepa RGA3 es un bacilo aerobio, esporulado y Gram-positivo, móvil. Presenta un buen crecimiento en el rango 30-37°C en varios medios de cultivo incluyendo YPD, TSA o agar nutritivo. En medio agar nutritivo crece formando colonias planas de 2-4 mm de diámetro tras 48 horas de incubación a 37°C. Las colonias presentan contornos irregulares, tonalidades marfil o blanquecinas y aspecto áspero y rugoso en la parte más central y húmedo y mucoso en los bordes. La secuenciación parcial de su ADN ribosomal 16S mostró una homología del 99% con varias especies del género *Bacillus*, mientras que la secuenciación de su genoma demostró su enorme parecido con la especie *Bacillus licheniformis*, por lo que esta cepa se identificó como *Bacillus licheniformis* RGA3.

B).- Aislamiento de las cepas *Pseudomonas aeruginosa* RGA1, *Stenotrophomonas sp.* RGA2 y *Bacillus licheniformis* RGA3

Las mencionadas cepas han sido aisladas y seleccionadas de entre la población natural de bacterias colonizadoras de nidos de seda de procesionaria. Dichas cepas se aislaron a partir de muestras de seda obtenida de nidos de procesionaria viejos (más de 3 meses desde su aparición en el árbol). La seda se aisló de los nidos en condiciones asépticas mediante eliminación manual del material vegetal y residuos de orugas (principalmente material fecal) mediante su cardado con un peine metálico de púas finas. A continuación se preparó una suspensión de seda en recipientes estériles que contenía seda (4 mg/ml), extracto de levadura 0.2 % y mezcla de oligoelementos (ZnCl₂: 0.08 mg/l; FeCl₃.6H₂O: 0.4 mg/l; CuCl₂.2H₂O: 0.02 mg/l;

MnCl₂·4H₂O: 0.02 mg/l; Na₂B₄O₇·10H₂O: 0.02 mg/l y (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O: 0.02 mg/l). Las preparaciones se incubaron a 25°C, 30°C y 37°C. Una vez comenzó a observarse de forma visual una evidente degradación de seda, a la vez que turbidez debida al crecimiento de microorganismos en algunos tubos se procedió a realizar diluciones seriadas de los cultivos en solución salina estéril (NaCl 0.9%). Las diluciones se plaquearon en placas de medio agar nutritivo que se incubaron a 25°C, 30°C y 37°C para el aislamiento de todas las bacterias presentes. Las diferentes bacterias aisladas se seleccionaron en base a datos morfológicos fácilmente observables de las colonias (tamaño, color, forma, tipo de borde, etc), así como en base a su observación microscópica (forma de la célula y movilidad aparente). Todas las bacterias macro y microscópicamente diferentes se aislaron en cultivo puro que se conservaron en placas de agar nutritivo a 4°C para su posterior análisis.

C).- Selección de las cepas *Pseudomonas aeruginosa* RGA1, *Stenotrophomonas sp.* RGA2 y *Bacillus licheniformis* RGA3.

Las mencionadas cepas se aislaron y seleccionaron de entre un total de 22 cepas aisladas de cultivos de seda, comprobándose mediante la realización de cultivos puros que tenían la capacidad de degradar seda.

Las cepas RGA1, RGA2 y RGA3 pueden ser empleadas, de manera individual o conjunta, en diferentes combinaciones, para su aplicación a nidos de procesionaria en masas forestales para favorecer su degradación. Ello contribuiría al control de la plaga de procesionaria en masas forestales.

Además, pueden ser utilizadas para la degradación *in vitro*, en soluciones acuosas, de seda de procesionaria con el fin de obtener aminoácidos o péptidos procedentes de su degradación.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que seguidamente se va a realizar y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica del mismo, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujo en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

La **Figura 1.-** Muestra una gráfica correspondiente a la evolución del nivel de degradación de seda de procesionaria en el tiempo llevada a cabo por las bacterias RGA1, RGA2 y RGA3, en comparación con la ausencia de degradación observada en dos controles negativos (Control negativo 1 –CN1- o seda incubada en ausencia de microorganismos y Control negativo 2 – CN2- o seda incubada en presencia de un microorganismo no degradador de seda). El nivel de degradación de seda se estimó en función de la cantidad de aminoácido leucina liberado. Los cultivos se incubaron a 37°C.

La **Figura 2.-** Muestra la evolución de la degradación de seda de procesionaria por la acción bacteriana comprobada por observación con microscopio electrónico de barrido. La figura muestra el aspecto de seda antes de la aplicación del tratamiento con la bacteria RGA2 (Día 0) y tras 5 días y 7 días después de la aplicación de la bacteria. Podemos observar como la seda no tratada tiene un aspecto homogéneo, que se va deteriorando tras 5 días de la aplicación bacteriana (los filamentos aparecen deteriorados y con síntomas evidentes de degradación: contornos irregulares, huecos y zonas de degradación). A los 7 días tras la aplicación de la bacteria el aspecto de las fibras de seda es totalmente amorfo, presentando un aspecto totalmente irregular y desestructurado. La aplicación de las bacterias RGA1 y RGA3 tiene efecto parecido sobre la seda, aunque la cinética de degradación es diferente para cada cepa, como

se puede deducir fácilmente de la observación de la Figura 1.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE 5 DE LA INVENCION

5 Los ejemplos siguientes ilustran la invención, aunque no deber ser considerados limitativos del alcance de la misma.

* Ejemplo 1. Obtención y caracterización de las cepas RGA1, RGA2 y RGA3.

10 Un total de 22 cepas bacterianas fueron aisladas a partir de cultivos de seda y diferenciadas en función de rasgos morfológicos macro (tamaño, color, forma, aspecto y tipo de borde de la colonia) y microscópicos (forma de la célula y movilidad aparente) fácilmente apreciables, así como en base a otras características como la producción de pigmentos difusibles. Todas estas cepas fueron ensayadas para su capacidad para degradar seda de procesionaria. Para ello se
 15 utilizaron cultivos en medio líquido que incorporaban una cantidad conocida de seda. Todas las cepas se incubaron en estas condiciones a 25, 30 y 37°C sin agitación por un periodo de tiempo de 45 días, determinándose visualmente su capacidad de degradación de seda en base a la desaparición y/o solubilización de seda en el cultivo. Del total de bacterias ensayadas se seleccionaron 3 por su capacidad para hacer desaparecer (degradar) la seda del cultivo. Inicialmente las cepas, denominadas RGA1, RGA2 y RGA3 se identificaron mediante la secuenciación de su ARN ribosomal 16S y posterior secuenciación de su genoma.
 20

* Ejemplo 2. Producción de biomasa de las cepas RGA1, RGA2 y RGA3.

25 Se utilizaron dos metodologías diferentes a fin de probar la versatilidad de cada cepa a la hora de producir biomasa.

2.1).- Producción de biomasa por crecimiento en matraces en condiciones aeróbicas.

30 Para ello se utilizaron matraces de 1L que contenían 0.2 L de medio caldo nutritivo. Cada matraz se inóculo con 5 ml de un cultivo desarrollado en el mismo medio de D.O. 1 estimada espectrofotométricamente a 600 nm. Los matraces se incubaron a 30°C con agitación constante de 220 r.p.m en un incubador orbital. El crecimiento se determinó cada 24 horas. Durante el proceso se comprobó la homogeneidad del cultivo mediante observación directa al microscopio
 35 óptico. Una vez finalizada la incubación la viabilidad celular se chequeó mediante recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml). Ambas cepas crecieron con gran rapidez en estas condiciones obteniéndose una gran cantidad de biomasa y una viabilidad igual o superior a la de la especie *Escherichia coli* utilizada como control.

40 2.2).- Producción de biomasa en fermentador.

El estudio se realizó en un fermentador de laboratorio Biostat-A de 2.5 L, controlando los distintos parámetros que afectan a las cepas tales como O₂ disuelto, pH, espuma, acidez y temperatura. Para el desarrollo de los cultivos se empleó 1.5 L de medio caldo nutritivo que fue inoculado con un precultivo de cada bacteria hasta obtener una suspensión celular de D.O. = 0.1
 45 (determinada a 600 nm). El pH del cultivo se mantuvo constante en un valor de 7.0 y la temperatura de incubación fue de 30°C. Finalmente, la concentración de oxígeno disuelto se mantuvo constante en el 35%. El crecimiento y la viabilidad celular se monitorizaron como se indica en el apartado anterior. En estas condiciones todas las cepas mostraron una producción de biomasa rápida y homogénea con una elevada viabilidad celular, del mismo orden de magnitud que la
 50 cepa de *Escherichia coli* usada como testigo.

* Ejemplo 3.- Ensayos *in vitro*: degradación de seda de procesionaria en cultivos en medio lí-

guido.

La degradación de seda en cultivos en medio líquido se realizó en tubos conteniendo una suspensión de seda (2.5 mg/ml) en una solución que contenía K_2HPO_4 , 40mM M; KH_2PO_4 , 22 mM; $MgSO_4$, 0.8 mM; citrato sódico, 1.6 mM; KNO_3 , 7.9 mM; succinato sódico, 19mM y mezcla de oligoelementos ($ZnCl_2$: 0.08 mg/l; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$: 0.4 mg/l; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$: 0.02 mg/l; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$: 0.02 mg/l; $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$: 0.02 mg/l y $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$: 0.02 mg/l). Los cultivos se incubaron a 30° y 37°C y la degradación de seda se monitorizó visualmente y mediante la medida de liberación de aminoácidos al medio de cultivo en reacción con ninhidrina. Los resultados, obtenidos a la temperatura de 37°C, se pueden observar en la Figura 1. Podemos observar como existe una evidente degradación de la seda, deducida de la liberación de aminoácidos al medio de cultivo, así como de la observación visual, siendo la cinética de degradación diferente para cada una de las bacterias aisladas.

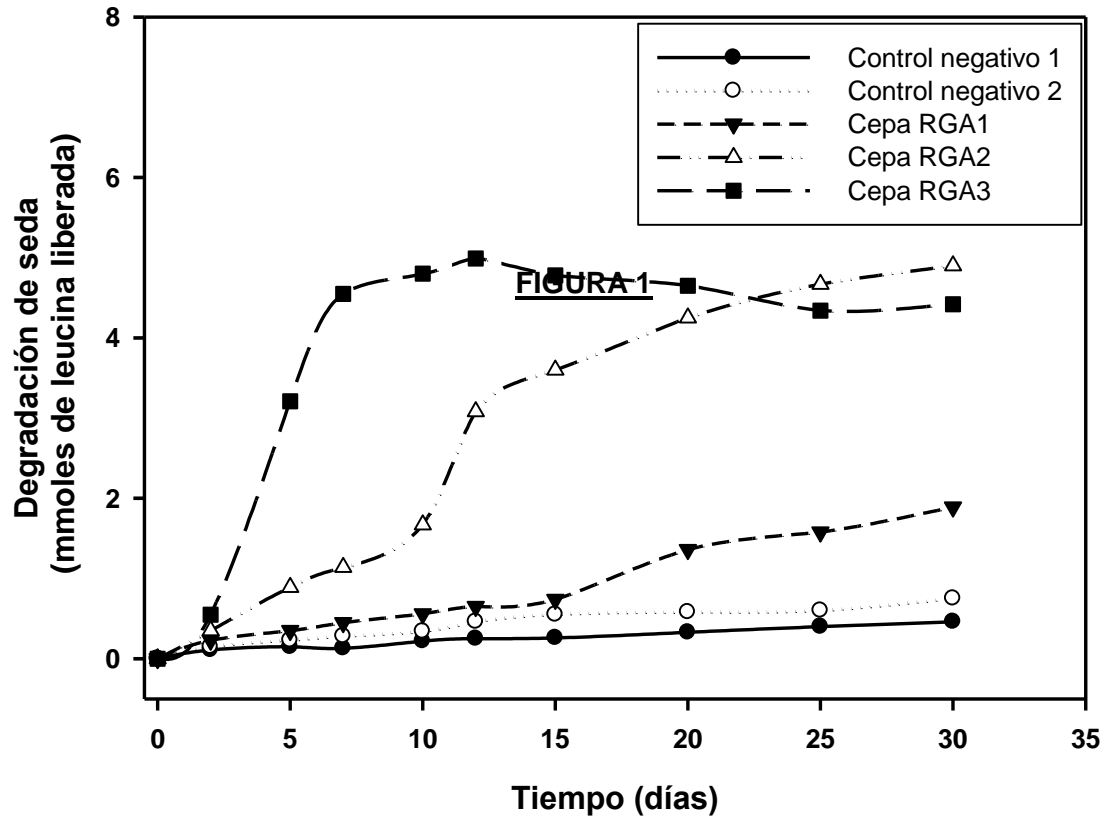
15 * Ejemplo 4.- Ensayos *in vivo*: degradación de nidos de procesionaria.

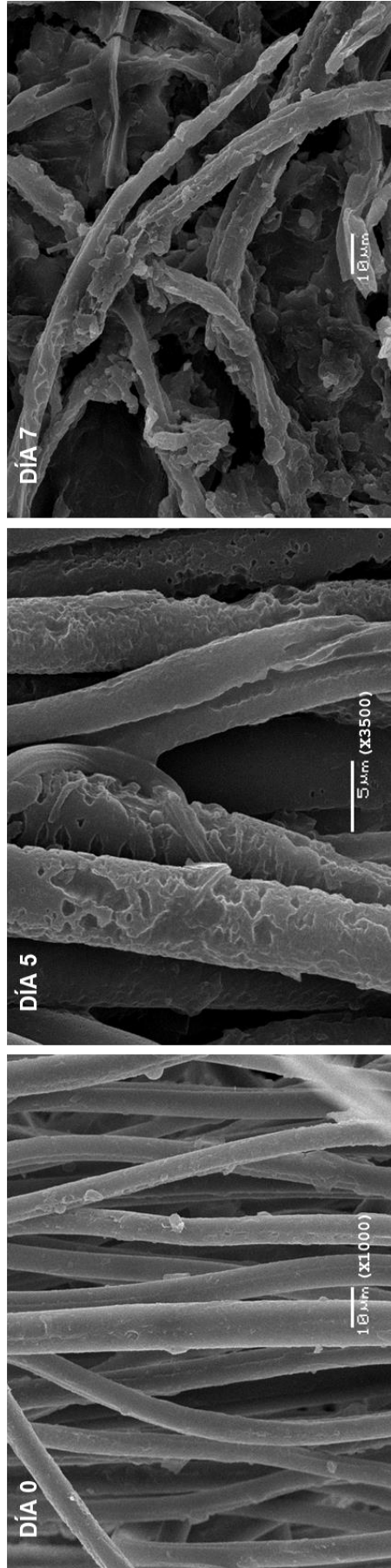
Nidos de procesionaria se recogieron y se rociaron con una suspensión de las bacterias RGA1, RGA2 y RGA3 conteniendo 10^7 células por ml en caldo nutritivo. Los nidos se colocaron dentro de una bandeja de plástico y se mantuvieron en una terraza abierta, sometidos a las variaciones de temperaturas ambientales. El tratamiento se repitió 48 horas más tarde. La degradación de los nidos se siguió de forma visual, pudiéndose comprobar la aparente degradación de la seda de forma visual en todos los casos. Los primeros síntomas se observaron alrededor del día 6 con la bacteria RGA3, mientras que síntomas evidentes de degradación comenzaron a observarse a partir del día 9 en el caso de la bacteria RGA2 y 11 en el caso de la bacteria RGA1. La existencia de una evidente degradación de la seda se confirmó por microscopía electrónica como puede observarse en la Figura 2. No obstante la cinética observada de degradación de la seda es variable dependiendo de las condiciones ambientales, como por ejemplo temperaturas diurna y nocturna y humedad ambiental. En general temperaturas suaves y elevada humedad ambiental aceleran el proceso.

30

REIVINDICACIONES

1. **Producto** para el control de la procesionaria del pino (*Thaumetopoea pityocampa*) para su aplicación para la degradación de la seda de sus nidos o bolsones, **caracterizado** porque son bacterias aisladas y seleccionadas con capacidad para degradar la seda de la procesionaria.
- 5 2. **Producto** para el control de la procesionaria del pino (*Thaumetopoea pityocampa*) para su aplicación para la degradación de la seda de sus nidos o bolsones, **caracterizado** según la reivindicación anterior, porque se materializa en la cepa *Pseudomonas aeruginosa* RGA1 y depositada en la CECT con el número de acceso CECT 9473.
- 10 3. **Producto** para el control de la procesionaria del pino (*Thaumetopoea pityocampa*) para su aplicación para la degradación de la seda de sus nidos o bolsones, **caracterizado** según la primera reivindicación, porque se materializa en la cepa *Stenotrophomonas sp.* RGA2 y depositada en la CECT con el número de acceso CECT 9474.
- 15 4. **Producto** para el control de la procesionaria del pino (*Thaumetopoea pityocampa*) para su aplicación para la degradación de la seda de sus nidos o bolsones, **caracterizado** según la primera reivindicación, porque se materializa en la cepa *Bacillus licheniformis* RGA3 y depositada en la CECT con el número de acceso CECT 9493.
- 20 5. **Procedimiento** para el control de la procesionaria del pino (*Thaumetopoea pityocampa*) y la degradación de la seda de sus nidos o bolsones, **caracterizado** de acuerdo con los productos de las reivindicaciones 2 a 4, porque consiste en la aplicación de forma individual, o en cualquier combinación de dichos productos, a nidos de procesionaria para lograr su desorganización y/o degradación, mediante pulverización o cualquier otra técnica alternativa, favoreciendo la eficacia de otros métodos de control potencialmente aplicados.
- 25 6. **Procedimiento** para el control de la procesionaria del pino (*Thaumetopoea pityocampa*) y la degradación de la seda de sus nidos o bolsones, **caracterizado** de acuerdo con los productos de las reivindicaciones 2 a 4, porque consiste en la aplicación de forma individual, o en cualquier combinación de dichos productos a suspensiones líquidas conteniendo seda de procesionaria para conseguir su degradación y la obtención de mezclas de aminoácidos o péptidos de interés procedentes de la misma.





FÍGURA 2



- ②¹ N.º solicitud: 201731407
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 14.12.2017
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **A01N63/00** (2006.01)
A01P7/04 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	IKBAL AGAH INCE et al. Isolation and identification of bacteria from <i>Thaumetopoea pityocampa</i> Den. and Schiff. (Lep., Thaumetopoeidae) and determination of their biocontrol potential. <i>World Journal of Microbiology and Biotechnology</i> . 13/09/2008, Vol. 24, N° 12, Páginas 3005 - 3015, ISSN 1573-0972, <DOI: doi:10.1007/s11274-008-9845-9>, resumen	1-6
A	CEBECI H HUSEYIN et al. Control of pine processionary moth, <i>Thaumetopoea pityocampa</i> with <i>Bacillus thuringiensis</i> in Antalya, Turkey. <i>Journal of Environmental Biology</i> .30/04/2010, Vol. 31, N° 3, Páginas 357-361, ISSN 0254-8704, resumen	1-6
A	BATTISTI A et al. Results and perspectives in the use of <i>Bacillus thuringiensis</i> Berl. var. <i>kurstaki</i> and other pathogens against <i>Thaumetopoea pityocampa</i> (Den. et Schiff.) in Italy (Lep., Thaumetopoeidae). <i>Journal Pest Science</i> .31/05/1998, Vol. 71, N° 4, Páginas 72-76, ISSN 0340-7330, resumen	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 15.02.2018</p>	<p>Examinador I. Rueda Molíns</p>	<p>Página 1/2</p>
---	--	------------------------------

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

A01N, A01P

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, XPESP, INTERNET