

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 923 101**

21 Número de solicitud: 202130218

51 Int. Cl.:

A01N 63/30 (2010.01)

A01N 63/38 (2010.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

12.03.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.09.2022

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

17.11.2023

Fecha de concesión:

18.03.2024

45 Fecha de publicación de la concesión:

25.03.2024

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

C/ Serrano, nº 117

28006 Madrid (Madrid) ES y

TIMAC AGRO ESPAÑA, S.A. (50.0%)

72 Inventor/es:

POZUETA ROMERO, Francisco Javier;

BAROJA FERNÁNDEZ, Miren Edurne y

MUÑOZ PÉREZ, Francisco José

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Composiciones obtenidas de hongos y sus usos**

57 Resumen:

Composiciones obtenidas de hongos y sus usos.

La presente invención se refiere a composiciones obtenidas a partir del cultivo de hongos y la posterior eliminación de dichos cultivos de hongos del medio de cultivo, y al uso de dichas composiciones para la modificación de la microbiota de sustratos.

ES 2 923 101 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Composiciones obtenidas de hongos y sus usos

- 5 La presente invención se refiere a composiciones obtenidas de microorganismos y su uso para la modificación de la microbiota de sustratos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Los microorganismos del suelo son un componente clave tanto de los ecosistemas naturales como de los gestionados. El conjunto completo de microorganismos que pueden vivir en el ecosistema del suelo se denomina microbiota o microbioma, que incluye virus, bacterias, hongos y arqueas. La microbiota del suelo abarca una variedad de organismos beneficiosos y perjudiciales que existen en un sistema dinámico de
- 15 interacciones en red entre los organismos constituyentes, en un ciclo perpetuo de adaptación a los cambios externos e internos de los diferentes entornos del suelo, ya sea en la rizosfera, en los diferentes horizontes del suelo o en el suelo que se encuentra junto a flujos de agua (Fierer, Nat Rev Microbiology, 15, 579–590 (2017)).
- 20 Las redes de la microbiota están coordinadas en su mayoría por sustancias difusibles emitidas por los microorganismos, denominadas compuestos orgánicos volátiles (VOCs del inglés *volatile organic compounds*), que desempeñan un papel fundamental en varios procesos, como la comunicación entre organismos, las alteraciones de los ciclos de nutrientes microbianos y la tasa de crecimiento de los microorganismos que
- 25 colonizan el ecosistema (Abis *et al.*, Scientific Reports 2020, vol 10, 6104). Estos procesos, a su vez, afectan a procesos del suelo como el consumo de gases traza atmosféricos (como el hidrógeno, el dióxido de carbono, el óxido nítrico, el óxido nitroso, el metano y otros), la acidez del suelo, el ciclo de nutrientes del suelo, la conductividad hidráulica y la hidrofobicidad del suelo, la fijación del nitrógeno, la degradación de
- 30 compuestos xenobióticos, la quelación y la desintoxicación de metales, la germinación de las semillas de las plantas, la protección de las plantas contra el estrés abiótico y la supresión de patógenos de las plantas (Fierer, Nature Reviews Microbiology, 21 Aug 2017). Todos estos procesos pueden tener un profundo impacto en la recuperación y renovación de suelos contaminados, en la estabilización y nutrificación de suelos
- 35 desérticos, en la mejora del rendimiento y la calidad de la agricultura, en la

humidificación y aireación de los suelos, en la renovación de suelos de uso agrícola intensivo y en el cambio climático (Jansson, J.K., Hofmockel, K.S. Nat Rev Microbiol 18, 35–46 (2020)).

5 Estudios anteriores han descrito como la microbiota del suelo se puede modificar *in vitro* en respuesta a VOCs de bacterias (Yuan et al., Environ Sci Pollut Res, 12 August 2017). Además, US20140086878 divulga el uso de compuestos obtenidos a partir de cultivos de hongos para el control de patógenos y el documento WO2021007280 divulga el uso de compuestos obtenidos de nematodos para el control de la microbiota del suelo.

10

Por lo tanto, es primordial encontrar enfoques nuevos y ecológicamente eficientes para modificar la microbiota del suelo con el fin de mejorar los procesos mencionados, y al mismo tiempo reducir el uso de productos químicos o agroquímicos.

15 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores de la presente invención han descubierto que composiciones obtenidas a partir del cultivo de hongos, donde los hongos son posteriormente eliminados, tienen la capacidad de alterar la microbiota del sustrato al cual son aplicadas. Dichas alteraciones pueden resultar en efectos importantes en el microsistema y las propiedades del suelo, así como de los organismos que forman parte o interactúan con el sustrato.

20

Composición

25 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición libre de hongos vivos, de ahora en adelante la composición de la invención, obtenida por un método que comprende las siguientes etapas:

- a) Cultivar al menos un hongo en un medio de cultivo apropiado; y
- b) Eliminar o inactivar el hongo del medio de cultivo del paso a) una vez que el crecimiento del hongo ha iniciado la fase de crecimiento logarítmico, para obtener la composición libre de microorganismos vivos.

30

La presente descripción se refiere a composiciones producidas por cultivos celulares de hongos en los que el microorganismo ha crecido. Cuando el microorganismo se elimina del medio de cultivo en el que ha crecido, por ejemplo, mediante centrifugación y/o

35

filtración, se obtiene una composición libre de microorganismos vivos. Así en una realización preferida la composición toma la forma de un filtrado. Cuando, alternativamente, el microorganismo no se elimina, o no se elimina por completo, del medio de cultivo en el que ha crecido, pero se inactiva, por ejemplo, mediante lisis (es decir, el microorganismo inactivado o partes del mismo están presentes en el medio), se obtiene una composición que comprende un microorganismo inactivado. En ambos casos, estas composiciones pueden obtenerse cultivando un microorganismo en medios de crecimiento y condiciones de cultivo específicos, tal como se describe en el presente documento.

En una realización preferida de la composición de la invención el hongo se selecciona de una lista que consiste en: *Alternaria alternata* o un mutante derivado, *Penicillium aurantiogriseum* o un mutante derivado, *Trichoderma harzianum* o un mutante derivado, la cepa CECT 20912 de *A. alternata* o un mutante derivado, la cepa CECT 20226 de *P. aurantiogriseum* o un mutante derivado, la cepa CECT 2413 de *T. harzianum* o un mutante derivado o cualquiera de sus combinaciones. Más preferiblemente, el hongo pertenece a la especie *Alternaria alternata* y/o *Penicillium aurantiogriseum*, aún más preferiblemente el hongo es la cepa CECT 20912 de *A. alternata* y/o CECT 20226 de *P. aurantiogriseum*,

La cepa de *Alternaria alternata* de la invención fue depositada por IDEN Biotechnology S.L., de acuerdo con el Tratado de Budapest, el 11 de junio de 2014, en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), situada en el Parc Científic Universitat de Valencia, calle Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna, Valencia, España. La cepa recibió el número de acceso CECT 20912 después de que la cepa fuera considerada viable y pura. Dicha cepa así depositada se encuentra accesible al público sin restricciones.

Las cepas de *Penicillium aurantiogriseum* y *Trichoderma harzianum*, se encuentran también accesibles al público sin restricciones en la CECT con los números de acceso 20226 y 2413 respectivamente.

El término "mutante" tal como se usa en la presente descripción se refiere a los hongos que se obtienen utilizando como material de partida la especie o cepa seleccionada de la lista anterior, y que se caracterizan por mantener las propiedades de dicha cepa

depositada. El término "mutante" también incluye el término "variante". Los expertos en la técnica entenderán que los mutantes se pueden obtener de forma rutinaria, por ejemplo, mediante mutagénesis espontánea o mutación dirigida, utilizando como material de partida una o más de las especies de hongos mencionadas anteriormente.

5 Se conocen en la técnica métodos para obtener mutantes de una cepa microbiana específica. Se puede encontrar un ejemplo en Sambrook, J. y Russell, D.W. "Clonación molecular: Manual de laboratorio ", capítulo 13,"Mutagénesis", Cold Spring Harbor, tercera edición, 2001.

10 La expresión "composición libre de microorganismos vivos obtenible mediante el proceso descrito", se utiliza en este documento para definir la composición mediante su proceso de preparación y se refiere a los productos que se pueden obtener mediante el proceso de preparación que comprenden los pasos indicados aquí. Para los fines de la invención, las expresiones "obtenible", "obtenido" y expresiones equivalentes se utilizan
15 indistintamente y, en cualquier caso, la expresión "obtenible" engloba la expresión "obtenido".

La expresión "composición libre de microorganismos vivos" tal como se usa en este documento se refiere a una composición producida por un cultivo de células de hongos,
20 que se obtiene después de eliminar el hongo que se ha utilizado en el proceso de la invención, en particular en la etapa a) del proceso, del medio de cultivo. La composición libre de microorganismos carece de células viables, micelios o endosporas. Dicha expresión comprende además una composición producida por cultivos de células de hongos, que se obtiene después de inactivar el microorganismo en el medio de cultivo
25 en el que se ha desarrollado. El término "microorganismo inactivado" se refiere a un microorganismo que ha sido alterado de su estado nativo y ya no es capaz de reproducirse o formar colonias en cultivo.

La expresión "cultivar al menos un hongo en un medio de cultivo apropiado" del paso a)
30 del método para obtener la composición de la invención se refiere al proceso de inocular un hongo en un "medio de cultivo apropiado" o adecuado para su crecimiento. El término "medio de cultivo de hongos" tal como se usa en esta descripción se refiere a un medio de cultivo que puede comprender componentes que incluyen nutrientes, factores de crecimiento, minerales y similares. En una realización preferida del método para obtener
35 la composición de la invención, el medio de cultivo del paso a) es un medio que carece

de aminoácidos y/o proteínas, preferiblemente un medio mínimo.

El término "medio de cultivo mínimo" tal como se usa en la presente descripción, se refiere a un medio que incluye solo los nutrientes que requieren las células para sobrevivir y proliferar en cultivo, generalmente sin la presencia de aminoácidos, y generalmente contiene sales inorgánicas como fuentes de Na, K, Ca, Mg, P, N y S, una fuente de carbono y agua. Opcionalmente, puede contener una o más sustancias adicionales como vitaminas. Ejemplos no limitantes de componentes de los medios de cultivo incluyen $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; FeNaEDTA , H_3BO_3 ; KI ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; CaCl_2 ; KH_2PO_4 ; KNO_3 ; MgSO_4 ; NH_4NO_3 ; Glicina; myo-Inositol; Ácido nicotínico; Piridoxina HCl; Tiamina HCl; Na_2HPO_4 ; KH_2PO_4 ; NaCl NH_4Cl ; CaCl_2 ; MgSO_4 . Ejemplos no limitantes de tales medios mínimos son M9 (Na_2HPO_4 95 mM / KH_2PO_4 44 mM / NaCl 17 mM / NH_4Cl 37 mM / CaCl_2 0,1 mM / MgSO_4 2 mM, agar bacteriológico al 1,5%), MOPS, Murashige & Skoog (MS), y similares.

En otra realización preferida del método para obtener la composición de la invención, el medio de cultivo apropiado comprende además un compuesto orgánico como fuente de carbono. Los ejemplos no limitantes de estos compuestos incluyen sacarosa, glucosa, succinato, almidón, fructosa, maltosa, maltotriosa, lactosa, galactosa o xilosa. En otra realización aún más preferida, el medio de cultivo apropiado comprende además un compuesto como fuente de nitrógeno. Ejemplos no limitantes de estos compuestos incluyen NH_4NO_3 , NH_4Cl , NaNO_3 , KNO_3 .

En otra realización preferida del método para obtener la composición de la invención, el hongo se cultiva sin agitación. En otra realización preferida del método para obtener la composición de la invención, el hongo se cultiva con agitación, en particular de 1 a 300 rpm, más particularmente de 1 a 180 rpm, e incluso más particularmente de 1 a 150 rpm.

En otra realización preferida del método para obtener la composición de la invención, el hongo se cultiva a una temperatura de 3 a 70°C, más particularmente de 15 a 50°C, incluso más particularmente de 20°C hasta 40°C, aún más preferiblemente a 28°C.

El hongo puede inocularse en el medio de cultivo de crecimiento en un entorno aeróbico, microaerófilo o anaeróbico. Los hongos pueden cultivarse a pequeña escala (p. ej.,

utilizando matraces o fermentadores de laboratorio) o a gran escala (p. ej., utilizando fermentadores industriales) o fermentación (incluidos, entre otros, cultivos o fermentaciones continuas, por lotes, o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales. Opcionalmente, el medio de cultivo que contiene los hongos puede
5 homogeneizarse o licuarse, por ejemplo, mediante un mezclador.

En una realización preferida del método para obtener la composición de la invención, el hongo se elimina del medio de cultivo de la etapa a) cuando el crecimiento del microorganismo ha alcanzado al menos un valor igual o superior a 5%, 10%, 20%, 30%,
10 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la fase de crecimiento logarítmico. En particular, el hongo se elimina del medio de cultivo de la etapa a) después del inicio de la fase de crecimiento logarítmico y antes de que comience la fase de muerte. En una realización aún más preferida, el hongo se elimina del medio de cultivo de la etapa a) después del inicio de la fase de crecimiento logarítmico y antes de que comience la fase estacionaria.

15 En otra realización preferida del método para obtener la composición de la invención, el paso b) se lleva a cabo cuando las unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro son iguales o superiores a 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 o 10^7 .

20 La eliminación de los microorganismos del medio de cultivo (paso b) para obtener la composición libre de microorganismos vivos se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Generalmente, este paso se puede realizar mediante filtración (por ejemplo, con un filtro con un tamaño de poro medio de 0,1 a 0,5 μm), centrifugación (por ejemplo, de 1000 a 6000 rpm), sedimentación (por
25 ejemplo, por gravedad), precipitación, floculación, electro-precipitación o extracción. En una realización más preferida, la etapa b) se lleva a cabo mediante centrifugación y / o filtración. Dependiendo de la técnica utilizada, la composición o exudado libre de microorganismos vivos toma la forma de filtrado, sobrenadante o extracto. En una realización preferida de la composición de la invención la composición toma la forma de
30 un filtrado.

Si es necesario o deseado, el proceso para obtener la composición libre de microorganismos vivos de la invención puede incluir pasos adicionales. Por ejemplo, después de obtener la composición, esta se puede liofilizar, concentrar, ultrafiltrar,
35 granular, esterilizar, clarificar, aglomerar, lavar, absorber, adsorber, cristalizar,

precipitar, extraer, secar, destilar, dializar, rectificar. cromatografiado, secado por atomización y despirogenado, entre otras posibilidades. En otra realización preferida de la composición de la invención la composición toma la forma de un destilado.

5 Como se ha descrito previamente, las interacciones entre microorganismos en los microambientes de los sustratos se hacen muchas veces por componentes orgánicos volátiles (VOCs sigla del inglés *volatile organic compound*). Muchos de estos componentes están presentes en la composición de la invención. Así, en una realización preferida de la composición de la invención ésta comprende etanol, 1-propanol, 1-
10 butanol-3-metilo, benzaldehído-2-metilo, 2,4-dimetil-1-hepteno, alcohol 2-feniletílico, benceno-1,3-bis(1,1-dimetiletil), ácido acético, éster etílico del ácido propenoico, butyrolactone, 2-heptanona-4-metilo, 2-heptanona-4,6-dimetilo y 2-nonanona.

La composición de la invención es fácilmente escalable a procesos de producción
15 industriales, por lo que puede ser formulada como composiciones industriales o agrícolas. Así, en una realización preferida de la composición de la invención, esta comprende además un vehículo agroindustrial aceptable y/o un aditivo.

El término "vehículo agroindustrial aceptable" tal como se usa en este documento se
20 refiere a un material que se puede usar para mejorar el suministro, el almacenamiento o la aplicación de la composición a un sustrato, tal como el suelo. El vehículo agroindustrial aceptable debe ser compatible con la composición de la invención en el sentido de que no perjudique la eficacia de la misma y que por sí mismo no tenga un efecto perjudicial significativo sobre el sustrato y organismos y/o seres que interactúan
25 con dicho sustrato. Los ejemplos de vehículo agroindustrial aceptable incluyen, sin limitación, adyuvantes, diluyentes, tensioactivos, agentes acondicionadores, anticongelantes, agentes antiespumantes, espesantes, agentes humectantes, agentes esparcidores, agentes dispersantes, agentes emulsionantes, agentes antimicrobianos y similares. En una realización particular, el aditivo se selecciona de una lista que consiste
30 en: herbicida, pesticida, fungicida, fertilizante y cualquiera de sus combinaciones.

Finalmente, la composición aquí descrita puede adoptar varias formas, dependiendo del uso previsto. Así, la composición de la invención puede estar en forma de partículas sólidas, soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones.

Usos de la composición de la invención

Como se ha referido anteriormente, los inventores de la invención han descubierto que la composición de la invención tiene la capacidad de alterar la microbiota del sustrato al cual es aplicada.

5

Así, otro aspecto de la invención es el uso de la composición de la invención para la modificación de la microbiota en un sustrato, de ahora en adelante el uso de la invención.

El término “microbiota” tal como se usa en la presente descripción hace referencia a un grupo de formas de vida microscópicas que incluye bacterias, arqueas, virus y eucariotas como los hongos. Este grupo de microorganismos, la microbiota, abarca una variedad de organismos beneficiosos y perjudiciales que existen en un sistema dinámico de interacciones, por lo que las interacciones entre las diversas especies del microbioma pueden estar notablemente coordinadas, y alteraciones de dichas interacciones se pueden traducir en alteraciones en el sustrato que comprende dicha microbiota.

15

La expresión “modificación de la microbiota” tal como se usa en la presente invención hace referencia a la alteración del comportamiento, estructura, metabolismo, fisiología y/o crecimiento de los microorganismos presentes en la microbiota, de forma individual o conjunta, donde dicha modificación es impartida directamente por la composición de la invención o indirectamente debido a alteraciones en las interacciones entre microorganismos modificados y no modificados. La modificación de la microbiota de un sustrato se determina en comparación a un sustrato no tratado, es decir, donde la composición de la invención no ha estado en contacto con la microbiota de dicho sustrato.

25

En una realización preferida del uso de la invención, la modificación comprende la modificación del crecimiento de una o más especies bacterianas y/o fúngicas presentes en la microbiota en comparación con un control no tratado con la composición de la invención.

30

El término “crecimiento” tal como se usa en la presente invención hace referencia al aumento en el número o abundancia y/o el tamaño de células de un microorganismo. Dicho aumento es medible y cuantificable. El término “crecimiento” también engloba características fisiológicas y/o metabólicas, así como comportamentales tales como la

35

formación de colonias y/o biopelículas por los microorganismos.

En una realización preferida del uso de la invención, la modificación del crecimiento de especies bacterianas se selecciona de una lista que consiste en: promover la tasa
5 crecimiento, inhibir la tasa de crecimiento, modificar la morfología de colonias, modificar la fisiología, inhibir la formación de biopelículas, promover la formación de biopelículas, y cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida del uso de la invención, la modificación del crecimiento de
10 especies fúngicas se selecciona de una lista que consiste en: promover la tasa de crecimiento, inhibir la tasa de crecimiento, modificar la morfología de la estructura generada por la especie fúngica, modificar la fisiología, y cualquiera de sus combinaciones.

Los términos “comparar” y “comparación”, tal y como se emplea en la descripción, se refieren, pero no se limitan, a la comparación del número o abundancia de especies de microorganismos entre dos muestras de sustratos idénticos donde uno ha sido tratado con la composición de la invención y el otro no. Las muestras pueden ser analizadas simultánea o consecutivamente. La comparación puede ser realizada manualmente o
20 asistida por ordenador.

El término “modificación del crecimiento” tal y como se usa en la presente descripción hace referencia a una desviación significativa, que puede ser una reducción o un aumento, de la cantidad absoluta o relativa del número o abundancia de al menos una
25 especie de bacteria u hongo en comparación con la cantidad absoluta o relativa del número o abundancia de la misma especie de bacteria u hongo en el sustrato no tratado.

La desviación significativa puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante
30 la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p , test de *Student* o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001.

35

La determinación de la modificación de crecimiento de una o más especies de bacterias y/o hongos se puede llevar a cabo por técnicas que son conocidas por el experto en la materia. Ejemplos de dichas técnicas, sin limitación, son secuenciación de amplicones también designado secuenciación dirigida, secuenciación escopeta o secuenciación de alto rendimiento. Dichas técnicas son herramientas típicas de la metagenómica, el estudio del material genético obtenido directamente de muestras ambientales. Ambas técnicas y los protocolos para su realización están ampliamente descritos en el arte (Caporaso *et al.*, 2011 PNAS, 108, 4516-4522; Caporaso *et al.*, 2012 ISME, 6, 1621-1624; Bybee y Heather, 2011 Genome Biology and Evolution, 3, 1312-1323; Tyson *et al.*, 2004 Nature, 428, 37-43; Schuster, 2007 Nature Methods 5(1), 16-18) y son conocidos por el experto en la materia.

La modificación de la microbiota del sustrato obtenida por el uso de la invención dependerá de la composición específica de dicha microbiota en el sustrato. Pese esto, la modificación tendrá un efecto en la tasa de crecimiento de los microorganismos.

Así, en una realización preferida del uso de la invención, la modificación comprende un aumento en abundancia de una o más especies bacterianas y/o fúngicas presentes en la microbiota en comparación con un control no tratado con la composición de la invención.

En otra realización preferida del uso de la invención, la modificación comprende un aumento en abundancia de una o más especies bacterianas de la clase *Betaproteobacteria* y/o *Gammaproteobacteria* presentes en la microbiota en comparación con un control no tratado con la composición segunda de la invención.

El término "*Betaproteobacteria*", también designado por proteobacteria beta, tal como se usa en la presente descripción se refiere a un grupo de proteobacterias de metabolismo variado, formado por varios grupos de bacterias aerobias o facultativas que son muy versátiles en sus capacidades de degradación. Dicho grupo comprende quimiolitótrofos, como el género amoniaco-oxidante *Nitrosomonas*, fotótrofos como *Rhodocyclus* y *Rubrivivax*. Además, las proteobacterias beta funcionan en la fijación de nitrógeno en la rizosfera, donde oxidan amonio para producir nitrito.

El término "*Gammaproteobacteria*" tal como se usa en la presente descripción, se refiere

a un grupo de proteobacteria que contiene bacterias importantes médicamente, ecológicamente y científicamente. Proteobacteria gamma están distribuidas de forma abundante en varios ecosistemas tales como el suelo, lagos de agua dulce, ríos, océanos y lagos salados. En dicho grupo están bacterias fototrópicas como las bacterias púrpuras del azufre que se usan en las estaciones de tratamientos de aguas residuales, bacterias importantes en la biorremediación de petróleo curdo después de derrames, así como bacterias que regulan la fijación de carbono en los sedimentos costales.

En una realización preferida del uso de la invención, la modificación comprende un aumento en abundancia de una o más especies bacterianas que se seleccionan de una lista que consiste en: *Bradyrhizobium lupini*, *Burkholderia arboris*, *Caballeronia udeis*, *Paraburkholderia paradisi*, *Paraburkholderia silvatlantica*, *Duganella ginsengisoli*, *Massilia varians*, *Pseudomonas brassicacearum*, *Pseudomonas knackmussii*, *Pseudomonas mediterranea*, *Rhodanobacter glycinis* y cualquiera de sus combinaciones.

Al igual que el efecto en las bacterias, la composición también afecta el crecimiento de hongos. Así, en otra realización preferida del uso de la invención, la modificación comprende un aumento en abundancia de una o más especies fúngicas de la clase *Saccharomycetes* y *Sordariomycetes* presentes en la microbiota en comparación con un control no tratado con la composición de la invención.

El término “*Saccharomycetes*” tal como se usa en la presente invención se refiere al grupo, también conocido por *Hemiascomycetes*, de las levaduras que se reproducen asexualmente por gemación. La especie más conocida es *Saccharomyces cerevisiae*, un organismo modelo en investigación, pero que se puede encontrar en el medio ambiente en diversos hábitats como el agua, suelo y variadas plantas.

El término “*Sordariomycetes*” tal como se usa en la presente invención se refiere a un grupo de hongos que se caracteriza por producir sus ascas en cuerpos fructíferos periciales. Esta clase presenta hongos de grandes variabilidades morfológicas, formas de crecimiento y hábitats. Entre estos hábitats se pueden destacar el crecimiento en suelos, paredes, árboles, estiércol y como descomponedores de excrementos y materia vegetal muerta, así como también parásitos de hongos, y patógenos de animales y plantas

Dentro de los grupos de hongos mencionados, los inventores han identificado las especies de hongos con el mayor aumento en abundancia en respuesta a la composición de la invención. Asimismo, en otra realización preferida del uso de la invención, la modificación comprende un aumento en abundancia de una o más especies fúngicas que se seleccionan de la lista que consiste en: *Pseudogymnoascus* sp. CCF 5028, *Galactomyces candidum*, *Candida subhashii*, *Nadsonia starkey-henricii*, *Cyberlindnera saturnus*, *Trichoderma harmatum*, *Mariannaea camptospora*, *Pseudocosmospora rogersonii*, *Myxocephala albida* y cualquiera de sus combinaciones.

Al igual que el uso de la composición de la invención resulta en el aumento del crecimiento de bacterias y/o hongos en la microbiota, por su naturaleza de red interconectada, los inventores detectaron también la reducción en especies de bacterias y/o hongos en la microbiota tratada. Por lo tanto, en otra realización preferida del uso de la invención, la modificación comprende una reducción en abundancia de una o más especies bacterianas y/o fúngicas presentes en la microbiota en comparación con un control no tratado con la composición de la invención. En otra realización preferida del uso de la invención, la modificación comprende una reducción en abundancia de una o más especies bacterianas de la clase *Alphaproteobacteria* presentes en la microbiota en comparación con un control no tratado con la composición de la invención.

El término "*Alphaproteobacteria*" tal como se usa en la presente descripción se refiere a un grupo de proteobacterias, también designadas proteobacteria alfa, muy diverso donde se pueden encontrar bacterias fototrópicas como las bacterias púrpuras del azufre, bacterias quimiotrópicas intracelulares que habitan el interior de células eucariotas huéspedes como endosimbiontes o patógenos o bacterias oligotróficas.

En otra realización preferida del uso de la invención, la modificación comprende una reducción en abundancia de una o más especies bacterianas que se seleccionan de la lista que consiste en: *Paludibaculum fermentans*, *Cellulosimicrobium funkei*, *Gaiella occulta*, *Phenylobacterium lituiforme*, *Nitrosospira multiformis*, *Opitutus terrae* y cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida del uso de la invención, la modificación comprende una reducción en abundancia de una o más especies fúngicas que se seleccionan de la lista

que consiste en: *Penicillium aeneum*, *P. wollemiicola*, *Geomyces sp.*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Verticillium nubilum* y cualquiera de sus combinaciones.

5 Tal y como se ha mencionado arriba, presente en la microbiota de un sustrato se pueden encontrar microorganismos benéficos, así como microorganismos perjudiciales para el sustrato, la flora y/o la fauna presente o que interactúa con dicho sustrato. Entre dichos organismos perjudiciales están los organismos patógenos para dicha flora y/o fauna. En otra realización preferida del uso de la invención, la modificación comprende una reducción en abundancia de una o más especies bacterianas y/o fúngicas patógenas.

10

Los términos “patógena” o “patógeno” tal como se usan en la presente invención se refieren a organismos tal como un alga, bacteria, hongo, insecto, nematodo, planta parasítica, un protozoario, o un virus con la capacidad de producir una enfermedad en una planta o animal, especialmente, una planta o animal que integra o interactúa con el sustrato tratado con la composición. En la presente invención el patógeno es una especie de bacteria o una especie de hongo. Los términos “patógena” o “patógeno” también incluye especies patógenas oportunistas, las cuales solo producen una enfermedad en su hospedador en condiciones específicas como en casos de baja inmunidad en plantas. Igualmente, el experto en el arte comprende que ciertas especies de microorganismos solo son patógenas en ciertos hospedadores, mientras que en otros hospedadores pueden ser comensales. Ejemplo de dichas especies es la levadura *S. cerevisiae*, un comensal del microambiente pero en ciertas condiciones patógeno del viñedo. En una realización preferida del uso de la invención las especies patógenas se seleccionan de una lista que consiste en: *S. cerevisiae* y *V. nubilum*. En otra realización preferida del uso de la invención el sustrato se caracteriza por estar infectado por especies bacterianas y/o fúngicas patógenas.

15

20

25

El uso de la invención se hace en un sustrato que comprende una microbiota, la cual se modifica con la aplicación de la composición de la invención. El término “sustrato” tal como se usa en la presente invención se refiere a la base, materia, medio o superficie donde los microorganismos viven, desarrollan y proliferan. Dicho sustrato puede además integrar y/o interactuar con otros organismos que dependen de dicho sustrato para su sobrevivencia tales como plantas y animales. El término “sustrato” engloba tanto sustratos naturales como artificiales, así como sustratos naturales modificados artificialmente. Ejemplos de sustratos, sin limitación, son el suelo, sedimentos

30

35

industriales, sedimentos costales, aguas residuales, aguas industriales, aguas ambientales, excrementos, materia orgánica vegetal o animal en descomposición y material orgánica del suelo. Así, en una realización preferida del uso de la invención, el sustrato se selecciona de una lista que consiste en: suelo, sedimentos industriales, sedimentos costales, aguas residuales, excrementos, materia orgánica, sustrato universal, sustrato profesional, arenas, vermiculita exfoliada, perlita expandida y cualquiera de sus combinaciones.

El término “suelo” tal como se usa en la presente descripción se refiere a un cuerpo natural continuo formado por componentes minerales y orgánicos que incluye fases sólidas, líquidas y gaseosas. Según la Base Referencial Mundial del Recurso Suelo de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (www.fao.org) existen 32 tipos de suelos de referencia (Tabla 1) todos ellos con su microbiota particular.

Tabla 1: Tipos de suelo de acuerdo con la Base Referencial Mundial del Recurso Suelo

Tipos de suelo y sus características	Denominación
1. Suelos con capas orgánicas gruesas	Histosols
2. Suelos con fuerte influencia humana –	
Largo e intensivo uso agrícola:	Anthrosols
Cantidades significativas de artefactos:	Technosols
3. Suelos con enraizamiento limitado –	
Afectados por permafrost:	Cryosols
Delgados o con muchos fragmentos gruesos:	Leptosols
Alto contenido de Na intercambiable:	Solonetz
Condiciones alternas de sequía-humedad, arcilla de expansión retracción:	Vertisols
Alta concentración de sales solubles:	Solonchak
4. Suelos regulados por la química de Fe/Al –	
Afectados por agua freática, subacuáticos y de áreas de mareas:	Gleysols
Alofanos o complejos Al-humus:	Andosols
Acumulación de óxidos y/o humus en el suelo subsuperficial	Podzols
Acumulación y redistribución de Fe:	Plinthosols
Arcillas de baja actividad, fijación de P, muchos óxidos de Fe, estructura fuerte:	Nitisols
Dominancia de caolinita y óxidos:	Ferralsols
Agua estancada, diferencia textural abrupta	Planosols
Agua estancada, diferencia estructural y/o diferencia textural	Stagnosols

Tipos de suelo y sus características	Denominación
moderada:	
5. Acumulación pronunciada de materia orgánica en el suelo mineral superficial –	
Suelo superficial muy oscuro, carbonatos secundarios: Phaeozems PH	Chernozems
Suelo superficial oscuro, carbonatos secundarios:	Kastanozems
Suelo superficial oscuro, sin carbonatos secundarios (a menos que estén muy profundos), alta saturación de bases:	Phaeozems
Suelo superficial oscuro, baja saturación de bases:	Umbrisols
6. Acumulación de sales moderadamente solubles o de sustancias no-salinas	
Acumulación de, y cementación por, sílice secundaria:	Durisols
Acumulación de yeso secundario:	Gypsisols
Acumulación de carbonatos secundarios:	Calcisols
7. Suelos enriquecidos en arcillas en la parte subsuperficial –	
Interdigitaciones de material gruesamente texturado de color claro dentro de una capa de textura más fina de color más fuerte:	Retisols
Arcillas de baja actividad, baja saturación de bases:	Acrisols
Arcillas de baja actividad, alta saturación de bases:	Lixisols
Arcillas de alta actividad, baja saturación de bases:	Alisols
Arcillas de alta actividad, alta saturación de bases:	Luvisols
8. Suelos con poca o ninguna diferenciación del perfil –	
Moderadamente desarrollados:	Cambisols
Arenosos:	Arenosols
Sedimentos estratificados fluviales, marinos y lacustres:	Fluvisols
Ningún desarrollo significativo del perfil:	Regosols

- Así en una realización particular del uso de la invención el sustrato es un tipo de suelo que se selecciona de una lista que consiste en: Histosols, Anthrosols, Technosols, Cryosols, Leptosols, Solonetz, Vertisols, Solonchak, Gleysols, Andosols, Podzols,
- 5 Plinthosols, Nitisols, Ferralsols, Planosols, Stagnosols, Chernozems, Kastanozems, Phaeozems, Umbrisols, Durisols, Gypsisols, Calcisols, Retisols, Acrisols, Lixisols, Alisols, Luvisols, Cambisols, Arenosols, Fluvisols, Regosols y cualquiera de sus combinaciones.
- 10 Otra forma de caracterizar suelos es en relación a su uso, o ausencia de dicho uso, para la producción agrícola o cultivo de colecciones agrícolas importantes. Así, en una realización preferida del uso de la invención el sustrato es un suelo cultivado o un suelo no cultivado. Suelos típicamente usados para agricultura, como Anthrosols, Alisols,

Cambisols, Fluvisols, Luvisols y Nitisols, son suelos de textura franca, ya que son fáciles de cultivar por los agricultores y pueden ser muy productivos para el crecimiento de los cultivos, que se describen comúnmente como de textura media con contribuciones funcionalmente iguales de arena, limo y arcilla. Pese a esto, otros suelos tienen el potencial para el cultivo, pero necesitan mejoras para permitir o aumentar dicho cultivo tales como, sin limitación, retención de humedad, aumento de la porosidad, reducción de la acidez, retención de nutrientes, reducción de sales, reducción del contenido de agua, aumento de la estabilidad del suelo, reducción de la materia orgánica en descomposición. Así, en una realización preferida del uso de la invención el sustrato es un suelo que se caracteriza por al menos una propiedad que se selecciona de la lista que consiste en: baja humedad, alto contenido en sales, alta acidez, bajo contenido de nutrientes, baja porosidad, alto contenido en agua, poca estabilidad, alto contenido de materia orgánica superficial, bajo contenido de humus y cualquiera de sus combinaciones.

Otro microambiente presente en el suelo donde la interacción entre microorganismos y plantas es esencial para el desarrollo de dichas plantas es la rizosfera. Así, en una realización preferida del uso de la invención el sustrato es la rizosfera. El término “rizosfera” tal como se usa en la presente descripción se refiere a la parte del suelo inmediata a las raíces vivas y que está bajo la directa influencia de estas. Las interacciones entre microorganismos y las proteínas y azúcares libertados por las raíces de las plantas da lugar a interacciones más complejas, que influyen en el crecimiento de las plantas y en la competencia por los recursos.

El término “sedimentos industriales” tal como se usa en la presente descripción, se refiere a cieno, lodo sólido o lodo líquido obtenido o producido por procesos industriales. Dichos sedimentos contienen, en general, altos niveles de compuestos químicos perjudiciales a la fauna y flora por lo que necesitan de tratamientos para su rehabilitación. Un tipo de dichos tratamientos se designa como biorremediación donde se utilizan microorganismos para eliminar contaminantes y toxinas de dichos sedimentos, donde las composiciones de la invención pueden encontrar uso. Así, en otra realización preferida del uso de la invención, el sustrato es cieno, lodo sólido o lodo líquido.

El término “aguas residuales” tal como se usa en la presente invención se refiere a

cualquier tipo de agua cuya calidad se vea afectada negativamente por influencia antropogénica. Las aguas residuales incluyen las aguas usadas, domésticas, urbanas y los residuos líquidos industriales o mineros eliminados, o las aguas que se mezclaron con las anteriores (aguas pluviales o naturales). Igual que con los “sedimentos industriales”, las “aguas residuales” también se pueden beneficiar de biorremediación para su rehabilitación.

El término “excrementos” tal como se usa en la presente descripción se refiere a heces o materia fecal, que son el conjunto de los desperdicios sólidos o líquidos que constituyen el producto final del proceso de la digestión. Están formados por los restos de los alimentos que no son absorbidos por el aparato digestivo, tales como fibras u otros componentes que no son útiles para el ser en cuestión. Los excrementos son usados generalmente como fertilizantes debido a que contienen nutrientes como nitrógeno, fósforo, potasio, materia orgánica y azufre. Así, la composición de la invención se puede usar para potenciar la microbiota de los excrementos, o en caso de que dichos excrementos se encontrasen contaminados, la composición de la invención se puede usar en la biorremediación de dicho sustrato.

A efectos de la presente descripción, el término “sedimentos costales” se refiere al material depositado por ríos y/o erosionado de rocas en el área costera. La microbiota de dichos sedimentos es altamente importante en la fijación de carbono, así que el mantenimiento y mejora de la fijación tendría efectos importantes en el combate al calentamiento global. Cambios ambientales pueden causar cambios en la microbiota de dichos sedimentos, por lo que la composición de la invención se puede usar para el mantenimiento y/o restablecimiento de la microbiota. Además, debido a factores externos, principalmente polución proveniente de actividad humana, la microbiota de dichos sedimentos puede verse afectada por sedimentos industriales y/o aguas residuales no tratadas llevando a la deposición de contaminantes y consecuentes cambios en la microbiota, necesitando de tratamientos como la biorremediación.

El término “contaminantes” tal como se usa en la presente descripción, hace referencia a materiales pesados o compuestos de producción humana – xenobióticos – presentes en los sustratos o suelos en concentraciones altas. Ejemplos, sin limitación, son el plomo, mercurio, arsénico, cobre, zinc, níquel, hidrocarburos poliaromáticos, herbicidas e insecticidas. Así, en una realización preferida del uso de la invención, el sustrato se

caracteriza por presentar concentraciones altas de al menos un compuesto que se selecciona de la lista que consiste en: plomo, mercurio, arsénico, cobre, zinc, níquel, hidrocarburos poliaromáticos, herbicidas, insecticidas y cualquiera de sus combinaciones.

5

El término “materia orgánica” tal como se usa en la presente descripción se refiere a material orgánico natural, el cual es materia elaborada de compuestos orgánicos que provienen de los restos de organismos, o partes de organismos, que alguna vez estuvieron vivos, tales como plantas, animales y sus productos de residuo en el ambiente natural. Ejemplos de “materia orgánica” son restos de hojas y ramas que caen al suelo y se descomponen en sus componentes orgánicos. Una vez que dicha descomposición alcanza una fase que se resiste a más descomposición el material se llama humus. La definición de “materia orgánica” de la presente descripción también engloba los términos “humus” y “turba natural”. Así, en una realización preferida del uso de la invención el sustrato es materia orgánica del suelo. En otra realización preferida del uso de la invención, el sustrato es materia orgánica vegetal y/o animal. En otra realización aún más preferida del uso de la invención, el sustrato es humus y/o turba.

Tal como se usa en la presente invención el término “turba natural” se refiere a un material orgánico de color pardo oscuro y rico en carbono, formado por una masa esponjosa y ligera en la que aún se aprecian los componentes vegetales que la originaron. Turba natural se puede encontrar comercialmente (Compo GmbH Co K.G.). La “turba natural” puede ser clasificada en dos grupos: turbas rubias y turbas negras. Turbas rubias, también llamadas esfagno, son caracterizadas por un mayor contenido en materia orgánica y están menos descompuestas. Turbas negras son caracterizadas por un menor contenido de materia orgánica y está más mineralizadas. Así, en una realización preferida del uso de la invención el sustrato es turba natural, preferiblemente turba rubia o turba negra.

Otros de los sustratos al cual hace referencia el uso de la invención son “sustrato universal” y “sustrato profesional”. Los dos términos tal como se usan en la presente invención hacen referencia a tipos de suelo fabricados a partir de materias primas como turba rubia y negra, fibra de coco, perlita y fertilizante, entre otras. El término “sustrato universal” se refiere a un tipo de suelo que permite el crecimiento de un gran número de plantas y/o cultivos, que comprende una mezcla de 2 a 4 materias primas. El término

“sustrato profesional” se refiere a una mezcla compleja de variados componentes de materia prima anteriormente mencionados, con una finalidad específica, es decir, una mezcla dirigida, por ejemplo, y sin limitación, a plantas acidófilas que necesitan de sustratos con mayor capacidad de retención de agua.

5

Además, los sustratos a los cuales se aplica el uso de la invención incluyen también arenas, vermiculita exfoliada y perlita expandida. El término “arenas” tal como se usa en la presente invención hace referencia a un conjunto de fragmentos sueltos de rocas o minerales de tamaño, en general, entre 0,0625 y 2 milímetros. Las arenas se pueden clasificar en función del tamaño de los fragmentos, donde arenas con mayor proporción de fragmentos de tamaño igual o inferior a 1,03 milímetros son denominadas arenas finas, y arenas con una proporción mayor de fragmentos mayores de 1,03 milímetros son denominadas arenas gruesas. Así, en una realización particular del uso de la invención, el sustrato es arena fina y/o arena gruesa.

15

El término “vermiculita exfoliada” hace referencia al material obtenido de un mineral formado por silicatos de hierro o magnesio, donde dicho material se somete a un proceso de tratamiento térmico, conocido como exfoliación, para expandir el mineral, obteniéndose así la “vermiculita exfoliada”. Vermiculita exfoliada está disponible comercialmente con el nombre de Termite®. De modo similar, el término “perlita expandida” se refiere el material que se obtiene a partir del mineral perlita después de someter dicho material a un proceso de lavado, trituración y horneado.

20

El uso de la invención también engloba la combinación de sustratos, ya que como el experto en el arte sabrá, la combinación sustratos es lo más común en la naturaleza. Así, en una realización preferida del uso de la invención el sustrato comprende turba natural, arena fina y vermiculita expandida. En una realización aún más preferida del uso de la invención el sustrato comprende turba natural, arena fina y vermiculita expandida en una proporción de 1 para 1 para 1.

25

30

El uso de la composición de la invención se hace de modo que la composición de la invención contacte la microbiota del sustrato al cual se aplica. Dicho contacto entre la composición y la microbiota del sustrato se puede hacer directamente o dejando que los compuestos de la composición de la invención actúen en el entorno, el medio ambiente o el espacio de almacenamiento del sustrato mediante los métodos de tratamiento

35

habituales, por ejemplo, por inmersión, pulverización, evaporación, nebulización y/o dispersión en el sustrato. Así en otra realización preferida del uso de la invención, la composición se aplica al sustrato por riego, inmersión, pulverización, evaporación, nebulización y/o dispersión.

5

Como el experto en el arte sabrá, la composición de la invención se puede aplicar directamente al sustrato o se puede diluir en agua o un solvente apropiado, antes de su aplicación. Ejemplos de diluciones pueden ser, sin limitaciones, de 1:2, 1:4 y 1:8 en agua. La composición de la invención se aplica al sustrato en una dosis eficaz. Así, en una realización preferida del uso de la invención la composición de la invención se usa en una dosis eficaz.

A efectos de la presente invención, el término "dosis eficaz" se refiere a una cantidad no tóxica de la composición de la invención, tal como se describe en el presente documento, que es suficiente para proporcionar el efecto deseado en los sustratos, esto es, la modificación de la microbiota del sustrato de modo beneficioso. La cantidad precisa y eficaz de la composición de la invención dependerá del tipo de sustrato y microbiota, de la fauna y flora que interactúan y engloban dicho sustrato, de la superficie de dicho sustrato, así como del tipo de administración utilizada. Por lo tanto, es difícil especificar de antemano una cantidad exacta efectiva. Sin embargo, la cantidad efectiva para una situación dada puede determinarse mediante experimentos rutinarios y está dentro del criterio del experto en la materia.

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

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1 - La aplicación en el suelo de la composición de la invención en forma de filtrado (CFs) y en forma de destilado (DE) altera la composición de la microbiota bacteriana del suelo. La figura muestra la abundancia relativa de bacterias en suelos regados con o sin

35

CFs fúngicos y DEs. Las bacterias se ordenaron según su filo y clase. Las especies aquí tratadas aparecen en recuadro. Los nombres de las especies enriquecidas y empobrecidas por la aplicación al suelo de CFs y DEs se incluyen en recuadros blancos y grises, respectivamente.

5

Fig. 2 - La aplicación en el suelo de la composición de la invención en forma de filtrado (CFs) y en forma de destilado (DE) enriquece fuertemente la microbiota bacteriana beneficiosa del suelo. La figura muestra las abundancias relativas de las bacterias del suelo que fueron reguladas por la aplicación de CFs fúngicos y DE.

10

Fig. 3 - La aplicación en el suelo de la composición de la invención en forma de filtrado (CFs) y en forma de destilado (DE) altera la composición de la microbiota fúngica del suelo. La figura muestra las abundancias relativas de hongos en suelos regados con CFs fúngicos y DE. Los hongos se clasificaron según su filo y clase. Las especies aquí tratadas están en recuadro. Los nombres de las especies enriquecidas y empobrecidas por la aplicación al suelo de CFs y DEs se incluyen en los recuadros blancos y grises, respectivamente.

15

Fig. 4 - La aplicación en el suelo de la composición de la invención en forma de filtrado (CFs) y en forma de destilado (DE) enriquece fuertemente la microbiota fúngica beneficiosa del suelo. La figura muestra la abundancia relativa de los hongos del suelo discutidos aquí que fueron regulados por la aplicación de CFs fúngicos y DE.

20

EJEMPLOS

25

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1 – Efecto de la composición de la invención en suelos cultivados

30

Materiales y métodos

Preparación de la composición de la invención

Stocks de glicerol de *T. harzianum* (CECT2413), *A. alternata* (CECT 20912) y *P. aurantiogriseum* (CECT20226) fueron usados para inocular en matraces Erlenmeyer de 500 mL que contenían 200 mL de medio Murashige y Skoog (MS) líquido suplementado

35

con 90 mM de sacarosa. Los cultivos se incubaron a 28 °C con agitación constante a 180 rpm en un agitador rotatorio durante 7 días. A continuación, se vertieron 100 mL de los cultivos en matraces Erlenmeyer de 2 L que contenían 1 L de medio MS-sacarosa y se incubaron a 28 °C con agitación constante a 180 rpm durante 3 días, tras lo cual se eliminó el micelio fúngico utilizando papel de filtro Whatman nº 1. La composición en forma de filtrado (CF) libre de células resultante se esterilizó utilizando un filtro de membrana Millipore de 0,22 µm y se almacenó a 4 °C a la espera de su uso posterior. Las composiciones en forma de destilado (DE) se obtuvieron destilando los CF a 50 °C utilizando un rotavapor R3000 (BUCHI).

Procedimientos analíticos

Los VOCs en la composición de la invención se determinaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) utilizando la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) tal y como describen García-Gómez et al. (2019, Plant Cell and Environment, 42(5), 1729–1746). Brevemente, los VOCs en la composición de la invención en los matraces Erlenmeyer fueron adsorbidos a 25 °C durante 30 min utilizando fibra de microextracción en fase sólida recubierta con DVB/CAR/PDMS. La fibra se inyectó en un cromatógrafo de gases Agilent 7890A con una columna de sílice fundida HP-5MS de 30 m x 0,25 mm. Los análisis espectrales de masas se realizaron con un instrumento Agilent 5975C. Los espectros de masas de los VOC se compararon con los obtenidos en la biblioteca del NIST (NIST/NIH/EPA Mass Spectral Library, Standard Reference Database 1, NIST 11. Standard Reference Data Program, National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg, MD, USA, 2011) y las identificaciones se confirmaron utilizando compuestos estándar disponibles en el mercado.

Preparación de la muestra de suelo, extracción de ADN y secuenciación de alto rendimiento

Los estudios del microbioma del suelo se llevaron a cabo en Lifesequencing S.L. (Paterna, Valencia, España) utilizando el suelo de macetas de 250 mL cultivados durante 4 semanas en cámaras de crecimiento. Tres días después del tercer tratamiento con la composición de la invención, se recogieron tres muestras replicadas, cada una de ellas compuesta por suelo de tres macetas, se mezclaron, se tamizaron hasta un tamaño de partícula < 2 mm, se liofilizaron y se almacenaron a -80 °C. El ADN del suelo se extrajo de 10 gramos de suelo utilizando un kit DNeasyMericon de QIAGEN. La

cantidad y la pureza del ADN se examinaron con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Delaware, EE.UU.). Las bibliotecas de ARNr 16S bacteriano y ITS fúngico se construyeron siguiendo el protocolo de "preparación de bibliotecas de secuenciación metagenómica 16S" dado para el sistema Illumina MiSeq, y utilizando cebadores optimizados dirigidos a las regiones hipervariables V3 y V4 del gen ARNr 16S para el perfil bacteriano (Klindworth et al., 2013, Nucleic Acids Research, 41 (1), e1) y cebadores que cubren ITS1-ITS2 para el perfil fúngico (Op De Beeck et al., 2014, PLOS ONE, 9(6), e97629). Las bibliotecas se secuenciaron en un instrumento Illumina MiSeq. Las lecturas crudas fueron seleccionadas, recortadas y fusionadas en lecturas de fin de par usando PEAR V.0.9.1. Las quimeras se filtraron con el algoritmo UCHIME del paquete USEARCH (Edgar, Haas, Clemente, Quince, & Knight, 2011) y las secuencias de alta calidad se agruparon en unidades taxonómicas operativas (OTU), utilizando UCLUST con un umbral de similitud del 97% (Abarenkov et al., 2010, New Phytologist, 186(2), 281–285). Se obtuvo un total de 5282314 lecturas de secuencias bacterianas de 24 muestras. El número de secuencias de alta calidad por muestra varió de 98030 a 140027 y se agruparon en 6241 OTU. Además, se obtuvo un total de 3283782 lecturas de secuencias de hongos. El número de secuencias de alta calidad por muestra varió de 50007 a 90123, lo que dio lugar a 1567 OTU. Las curvas de rarefacción obtenidas mediante scripts de Perl en QIIME sugirieron que la profundidad de secuenciación era suficiente para cubrir la mayoría de las especies bacterianas y fúngicas detectables, ya que las curvas comenzaron a estabilizarse o alcanzaron su asíntota para todos los tipos de muestras por tratamiento. Los suelos de control para los suelos tratados con la composición de la invención fueron los regados con agua y medio MS diluido suplementado con 1,5 mM de glucosa y fructosa, respectivamente.

25

Análisis de datos

Las diferencias se consideraron significativas si $P < 0,05$. En este estudio, utilizamos los índices de Shannon y Chao 1 para caracterizar la diversidad alpha y riqueza microbiana, respectivamente.

30

Resultados

Análisis de la composición de las CFs libres de células fúngicas

Los análisis de los volátiles orgánicos de la composición de la invención obtenida a partir de los tres hongos mencionados identificaron un total de 80 VOCs (Tabla 2).

Aunque los volátiles eran muy diferentes en cada una de las composiciones de la

invención, 13 compuestos (i.e. etanol, 1-propanol, 1-butanol-3-metilo, benzaldehído-2-metilo, 2,4-dimetil-1-hepteno, alcohol 2-feniletílico, benceno-1,3-bis(1,1-dimetiletilo), ácido acético, éster etílico del ácido propanoico, butirolactona, 2-heptanona-4-metilo, 2-heptanona-4,6-dimetilo y 2-nonanona) pudieron ser identificados en los tres (Tabla 2).

- 5 No se pudo detectar sacarosa en las tres composiciones, pero todos estos extractos contenían 0,5-1,5 mM de glucosa y fructosa cada uno, lo que indica una fuerte actividad sucrolítica fúngica extracelular.

10 Tabla 2: Análisis del espacio de cabeza (SPME/GC-MS) de los VOCs recogidos de las composiciones en forma CF y DE obtenidas de los cultivos líquidos de *P. aurantiogriseum*, *A. alternata* y *T. harzianum*.

Tiempo de Retención (min)	Familia química	Compuesto	<i>A. alternata</i>		<i>P. aurantiogriseum</i>		<i>T. harzianum</i>	
			CF	DE	CF	DE	CF	DE
	Alcohol							
1.47		Etanol	+	+	+	+	+	+
1.82		1-propanol ^a	+	+	+	-	+	+
2.26		1-propanol, 2 metilo	+	+	-	-	+	+
2.59		1-butanol ^a	+	+	-	-	-	-
3.64		1-butanol, 3-metilo ^{a,b}	+	+	+	+	+	+
3.68		1-butanol, 2-metilo ^b	+	+	-	-	+	+
4.22		1-pentanol	+	-	-	-	-	-
5.15		2-butanol, 2-metil, acetato	+	+	+	+	-	-
6.08		3-metil-1-pentanol	-	-	-	-	+	+
6.61		1-propanol, 3-etoxi	-	-	+	-	-	-
6.71		1-hexanol ^{a,b}	+	-	-	-	-	-
6.92		3-hexanol, 4-metilo	+	-	-	-	-	-
6.95		1-butanol, 3-metil-, acetato	-	-	-	-	+	+
7.01		1-butanol, 2-metil-, acetato	-	-	-	-	+	+
7.44		2-hexanol, 2,5-dimetilo	+	+	-	-	-	-
7.61		2-heptanol	-	-	-	-	+	+
11.52		1-hexanol, 2-etilo	+	+	+	+	-	-

Tiempo de Retención (min)	Familia química	Compuesto	<i>A. alternata</i>		<i>P. aurantio-griseum</i>		<i>T. harzianum</i>	
			CF	DE	CF	DE	CF	DE
13.71		2-nonanol	-	-	-	-	+	+
19.43		2-undecanol	-	-	-	-	+	-
	Aldehído							
9.38		benzaldehído ^{a,b}	-	-	+	-	-	-
13.08		benzaldehído, 2-metilo	+	+	+	+	+	+
	Alcano							
2.17		propano, 2-etoxi-2-metilo	+	+	-	-	-	-
2.96		2,3-pentanodiona	+	-	-	-	-	-
4.57		2,3-hexanodiona	+	-	-	-	-	-
5.40		heptano, 2,4-dimetilo	+	+	-	-	-	-
	Alqueno							
1.95		1-penteno, 2-metilo	+	+	-	-	-	-
5.91		2,4-dimetil-1-hepteno	+	+	+	+	+	+
	Compuesto aromático							
4.15		tolueno	-	-	+	+	+	+
6.7		p-xileno	+	+	+	+	-	-
7.28		estireno ^a	+	+	+	-	-	-
11.95		bencenoacetaldehido	-	-	+	+	-	-
14.21		Alcohol feniletílico ^b	+	+	+	+	+	+
15.63		fenol, 4-etilo	-	-	-	-	+	+
17.90		Ácido bencenoacético, etil ester	-	-	+	-	-	-
18.04		2-acetil-3-metiltiofeno	-	-	-	-	+	+
18.16		Benceno, 1,3-bis(1,1-dimetiletilo)	+	+	+	+	+	+
23.76		2,5-di-tert-butil-1,4-benzoquinona	+	+	-	-	+	+
	Ácido Carboxílico							
1.92		Acetato de etilo ^a	-	-	-	-	+	-

Tiempo de Retención (min)	Familia química	Compuesto	<i>A. alternata</i>		<i>P. aurantio-griseum</i>		<i>T. harzianum</i>	
			CF	DE	CF	DE	CF	DE
3.11		Ácido acético ^{a,b}	+	+	+	+	+	+
3.20		Ácido propanoico, etil ester	+	-	+	-	+	+
4.04		Ácido propanoico, 2-metil, etil ester	-	-	+	-	+	-
4.35		Acetato de isobutilo	+	+	-	-	+	+
4.70		Ácido propanoico, 2-metilo	-	-	+	-	-	-
4.95		Ácido butanoico, etil ester	-	-	-	-	+	-
5.07		Ácido propanoico ^a	-	-	+	-	-	-
5.16		Ácido propanoico, propil ester	-	-	-	-	+	-
6.19		Ácido butanoico, 2-metil- etil ester	-	-	-	-	+	-
6.57		Ácido butanoico, 3-metilo	-	-	+	-	-	-
	Cetona							
2.84		2-pentanona	-	-	-	-	+	-
4.42		acetoína ^{a,b}	+	+	-	-	-	-
6.19		2,3-butanodiol ^{a,b}	-	-	+	-	-	-
7.32		2-heptanona ^b	-	-	-	-	+	-
8.29		butirolactona	+	-	+	+	+	+
8.75		2-heptanona, 4-metilo	+	+	+	+	+	+
10.34		2-heptanona, 4,6-dimetilo	+	+	+	+	+	+
12.31		2-nonanona ^{a,b}	+	+	+	+	+	+
12.64		acetofenona ^b	-	-	+	+	-	-
	Monoterpeno							
9.89		2-metilenebornano	-	-	+	-	-	-
15.82		(+)-isomentol	-	-	-	-	+	+
15.84		2-metilisoborneol ^a	-	-	+	-	-	-
17.41		citronelol	-	-	-	-	+	+
18.62		citral	-	-	-	-	+	-

Tiempo de Retención (min)	Familia química	Compuesto	<i>A. alternata</i>		<i>P. aurantiogriseum</i>		<i>T. harzianum</i>	
			CF	DE	CF	DE	CF	DE
	Sesquiterpene							
22.16		β -cedreno	-	-	+	+	-	-
22.51		γ -elemeno	-	-	+	-	-	-
22.91		cis-thujopseno ^{a,b}	+	+	+	+	-	-
23.16		unknown sesq.	-	-	-	-	+	+
23.25		α -longipineno ^{a,b}	+	+	-	-	-	-
23.28		α -cadineno	+	+	-	-	-	-
23.51		cupareno ^a	+	+	-	-	-	-
23.48		cis- β -farneseno	-	-	-	-	+	-
24.08		β -chamigreno	+	-	-	-	-	-
24.17		α -himachaleno	+	+	+	-	-	-
24.63		cedreno-V6	+	+	-	-	-	-
24.71		α -chamigreno ^a	+	+	+	-	-	-
25.15		β -humuleno	-	-	-	-	+	-
26.02		α -bisabolol	-	-	-	-	+	+
26.99		widdrol	+	+	-	-	-	-
27.33		β -selineno	-	-	-	-	+	+
27.51		α -gurjuneno	+	+	-	-	+	-
27.67		α -cedreno ^a	-	-	-	-	+	-

Impacto de la aplicación al suelo de la composición de la invención en forma de CF y DE en la abundancia, diversidad y composición microbiana del suelo indígena

- 5 La secuenciación de amplicones del gen 16S rRNA bacteriano y el análisis en la plataforma Illumina MiSeq identificaron un total de 9 fila, 24 clases, 53 órdenes, 97 familias, 252 géneros y 510 especies en todas las muestras de suelo. La abundancia de bacterias en los suelos tratados con la composición de la invención en forma de CFs y DE de tres hongos distintos fue similar a la de los suelos de control. A nivel de clase, la
- 10 mayoría de las variantes de secuencia de amplicón se asignaron a *Acidobacteria*,

Actinobacteria, *Chitinophagia*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*, representando aproximadamente el 50% de todas las secuencias asignadas (Figura 1). La aplicación de la composición de la invención alteró significativamente la composición de la comunidad bacteriana del suelo (Figura 1). Los cambios más evidentes causados por los tratamientos fueron la reducción de la abundancia relativa de *Alphaproteobacteria* y el aumento de la abundancia relativa de *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* (Figura 1). A nivel de especies, la aplicación al suelo de la composición de la invención redujo la diversidad bacteriana, medida por el índice de Shannon, y no afectó a la riqueza bacteriana, medida por el índice Chao 1 (Tabla 3). En general, los diferentes tratamientos con la composición de la invención enriquecieron fuertemente las poblaciones de *Bradyrhizobium lupini*, *Burkholderia arboris*, *Caballeronia udeis*, *Paraburkholderia paradisi*, *Paraburkholderia silvatlantica*, *Duganella ginsengisoli*, *Massilia varians*, *Pseudomonas brassicacearum* *Pseudomonas knackmussii*, *Pseudomonas mediterranea* y *Rhodanobacter glycinis* (Figura 2), y empobrecieron ligeramente las de *Paludibaculum fermentans*, *Cellulosimicrobium funkei*, *Gaiella occulta*, *Phenylobacterium lituiforme*, *Nitrosospira multiformis* y *Opitutus terrae*.

Table 3. Diversidad bacteriana (índice de Shannon) y riqueza (índice de Chao 1) a nivel de especies en los suelos tratados con CF y DE y en los no tratados. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos de CF y DE frente a los controles según una prueba t de *Student* ($P < 0,05$).

	Shannon Index	Chao 1 Index
CF control	2.08 ± 0.02	1896 ± 97
+ <i>A. alternata</i> CF	1.87 ± 0.03*	2092 ± 104
+ <i>P. aurantioqriseum</i>	1.96 ± 0.03*	1988 ± 93
+ <i>T. harzianum</i> CF	1.83 ± 0.01*	1999 ± 58
DE control	2.28 ± 0.04	2067 ± 127
+ <i>A. alternata</i> DE	2.15 ± 0.04*	1990 ± 203
+ <i>P. aurantioqriseum</i>	2.20 ± 0.005	2227 ± 136
+ <i>T. harzianum</i> DE	1.91 ± 0.03*	2391 ± 253

25

El análisis de la secuenciación de amplicones del gen ITS1-ITS2 de los hongos identificó un total de 8 filos, 18 clases, 25 órdenes, 34 familias, 44 géneros y 70 especies de hongos en todas las muestras de suelo. La abundancia de hongos en los suelos tratados

con la composición de la invención fue similar a la de los suelos de control. A nivel de clase, los taxones dominantes fueron *Saccharomycetes*, *Sordariomycetes* y *Tremellomycetes*, representando el 30-70% de todas las secuencias asignadas (Figura 3). La aplicación de la composición de la invención alteró significativamente la

5 composición de la comunidad fúngica del suelo (Figura 3). Los mayores cambios causados por los tratamientos con la composición de la invención en la microbiota fúngica fueron los incrementos de las abundancias relativas de *Saccharomycetes* y *Sordariomycetes* (Figura 3). A nivel de especies, los tratamientos redujeron la diversidad fúngica y no afectaron a la riqueza fúngica (Tabla 4). Los tratamientos enriquecieron

10 fuertemente las poblaciones de *Pseudogymnoascus* sp. CCF 5028, *Galactomyces candidum*, *Candida subhashii*, *Nadsonia starkey-henricii*, *Cyberlindnera saturnus*, *Trichoderma harzianum*, *Mariannaea camptospora*, *Pseudocosmospora rogersonii* y *Myxocephala albida*, (Figura 4), y redujeron las de *Penicillium aeneum*, *P. wollemiicola*, *Geomyces* sp. Nankai_19mb, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae*,

15 *Verticillium nubilum* y *Sordariales* sp. (Figura 4).

Tabla 4. Diversidad de hongos (índice de Shannon) y riqueza (índice de Chao 1) a nivel de especies en los suelos tratados con CF y DE y en los no tratados. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos de CF y DE frente

20 a los controles según una prueba t de Student ($P < 0,05$).

	Shannon Index	Chao 1 Index
CF control	2.07 ± 0.10	418 ± 36
+ <i>A. alternata</i> CF	1.57 ± 0.09*	478 ± 33
+ <i>P. aurantioariseum</i> CF	1.55 ± 0.02*	429 ± 20
+ <i>T. harzianum</i> CF	1.02 ± 0.08*	355 ± 21
DE control	2.94 ± 0.20	428 ± 34
+ <i>A. alternata</i> DE	2.42 ± 0.10*	444 ± 31
+ <i>P. aurantioariseum</i> DE	2.14 ± 0.06*	409 ± 14
+ <i>T. harzianum</i> DE	1.53 ± 0.07*	427 ± 17

REIVINDICACIONES

1. El uso de una composición libre de hongos vivos para la modificación de la microbiota en un sustrato, donde dicha composición se obtiene por un método que
5 consiste en las siguientes etapas:
 - a) Cultivar al menos un hongo en un medio de cultivo apropiado; y
 - b) Eliminar o inactivar el hongo del medio de cultivo del paso a) una vez que el crecimiento del hongo ha iniciado la fase de crecimiento logarítmico, para obtener la composición libre de hongos vivos,
10 donde la eliminación del paso b) se realiza mediante un filtrado y, opcionalmente, un destilado posterior, del cultivo del paso a), donde el hongo pertenece a la especie *Trichoderma harzianum* y es la cepa *T. harzianum* CECT 2413, donde la modificación de la microbiota comprende un aumento en abundancia de una o más especies bacterianas y/o fúngicas presentes en la microbiota en
15 comparación con un control no tratado con la composición; donde las especies bacterianas se seleccionan de la clase *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* y/o las especies fúngicas se seleccionan de la clase *Saccharomycetes* y *Sordariomycetes* y donde la composición obtenida está en forma de filtrado o destilado.
20
2. El uso según la reivindicación 1, donde la composición además comprende al menos un vehículo agroindustrial aceptable y/o un aditivo.
3. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde la composición
25 comprende etanol, 1-propanol, 1-butanol-3-metilo, benzaldehído-2-metilo, 2,4-dimetil-1-hepteno, alcohol 2-feniletílico, benceno-1,3-bis(1,1-dimetiletil), ácido acético, éster etílico del ácido propanoico, butirolactona, 2-heptanona-4-metilo, 2-heptanona-4,6-dimetilo y 2-nonanona.
- 30 4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde las especies bacterianas se seleccionan de la lista que consiste en: *Bradyrhizobium lupini*, *Burkholderia arboris*, *Caballeronia udeis*, *Paraburkholderia paradisi*, *Paraburkholderia silvatlantica*, *Duganella ginsengisoli*, *Massilia varians*, *Pseudomonas brassicacearum*, *Pseudomonas knackmussii*, *Pseudomonas mediterranea*,
35 *Rhodanobacter glycinis* y cualquiera de sus combinaciones.

5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde las especies fúngicas se seleccionan de la lista que consiste en: *Pseudogymnoascus* sp. CCF 5028,
5 *Galactomyces candidum*, *Candida subhashii*, *Nadsonia starkey-henricii*,
Cyberlindnera saturnus, *Trichoderma harmarum*, *Mariannaea camptospora*,
Pseudocosmospora rogersonii, *Myxocephala albida* y cualquiera de sus combinaciones.
- 10 6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde el sustrato se selecciona de la lista que consiste en: suelo, sedimentos industriales, sedimentos costales, aguas residuales, excrementos, materia orgánica, sustrato universal, sustrato profesional, arenas, vermiculita exfoliada, perlita expandida y cualquiera de sus combinaciones.
15
7. El uso según la reivindicación 6 donde el sustrato es un suelo que se selecciona de la lista que consiste en: Histosols, Anthrosols, Technosols, Cryosols, Leptosols, Solonetz, Vertisols, Solonchak, Gleysols, Andosols, Podzols, Plinthosols, Nitisols, Ferralsols, Planosols, Stagnosols, Chernozems, Kastanozems, Phaeozems,
20 Umbrisols, Durisols, Gypsisols, Calcisols, Retisols, Acrisols, Lixisols, Alisols, Luvisols, Cambisols, Arenosols, Fluvisols, Regosols y cualquiera de sus combinaciones.
8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde el sustrato es un suelo
25 cultivado o un suelo no cultivado.
9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde el sustrato es la rizosfera del suelo.
- 30 10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde el sustrato es un suelo que se caracteriza por presentar al menos una propiedad que se selecciona de la lista que consiste en: baja humedad, alto contenido en sales, alta acidez, bajo contenido de nutrientes, baja porosidad, alto contenido en agua, poca estabilidad, alto contenido de materia orgánica superficial, bajo contenido de humus y cualquiera
35 de sus combinaciones.

11. El uso según la reivindicación 6 donde el sustrato es cieno, lodo sólido o lodo líquido.
- 5 12. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde el sustrato se caracteriza por presentar concentraciones altas de al menos un compuesto que se selecciona de la lista que consiste en: plomo, mercurio, arsénico, cobre, zinc, níquel, hidrocarburos poliaromáticos, herbicidas, insecticidas y cualquiera de sus combinaciones
- 10 13. El uso según la reivindicación 6 donde el sustrato es materia orgánica del suelo.
14. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 donde el sustrato se caracteriza por estar infectado por especies bacterianas y/o fúngicas patógenas.
- 15 15. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 donde la composición se aplica al sustrato por riego, inmersión, pulverización, evaporación, nebulización y/o dispersión.
- 20 16. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 donde la composición se usa en una dosis eficaz.

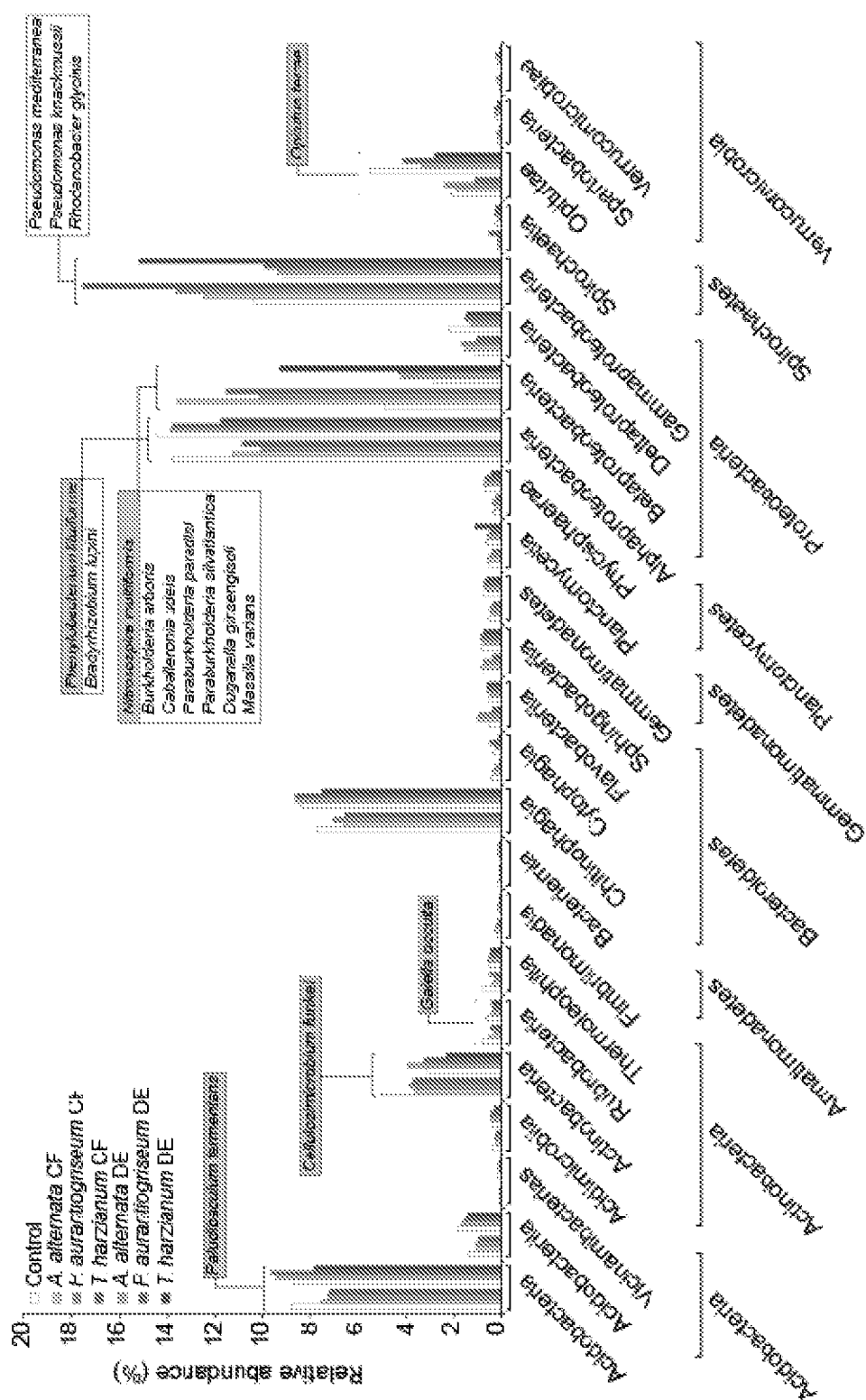


Fig. 1

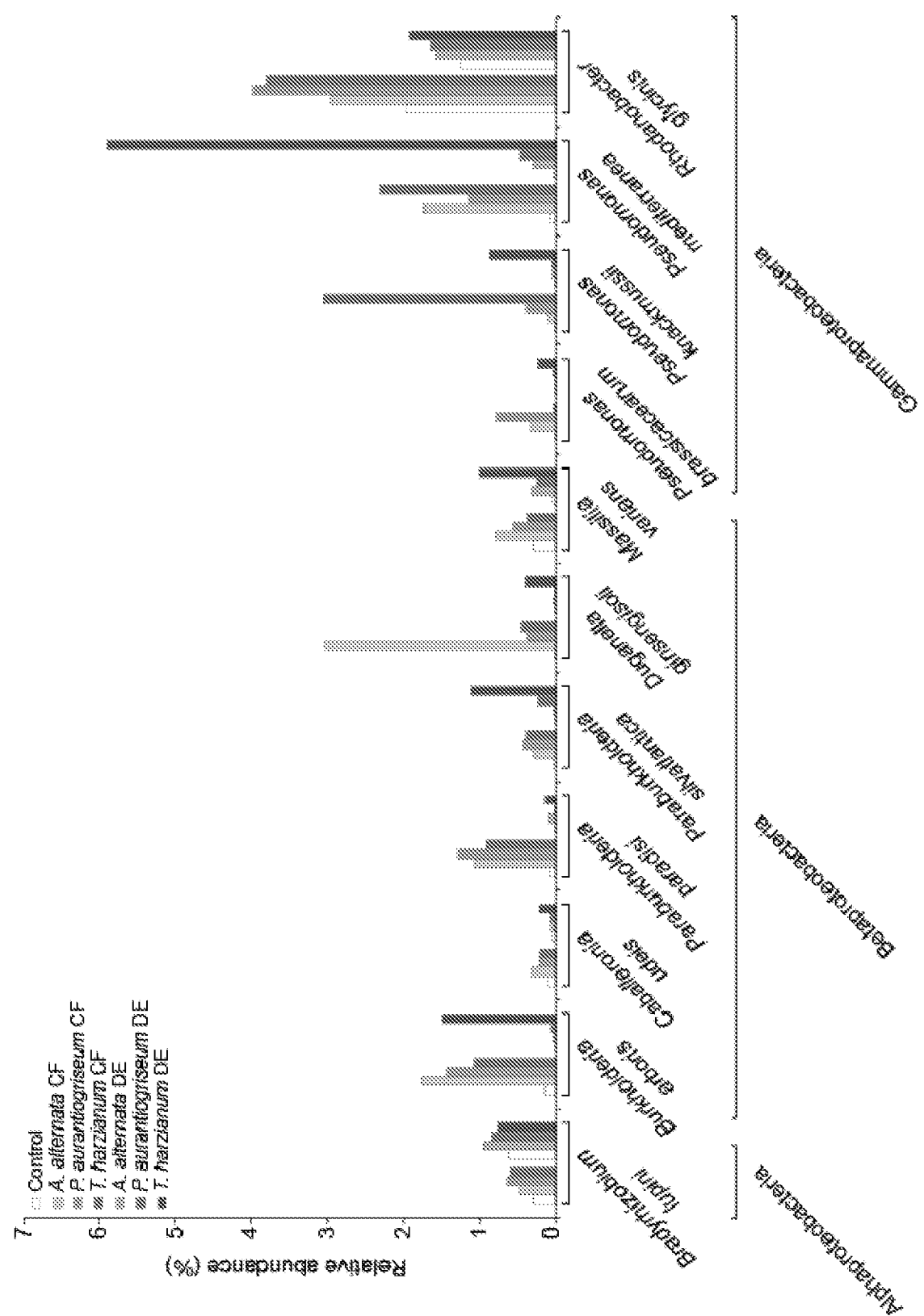


Fig. 2

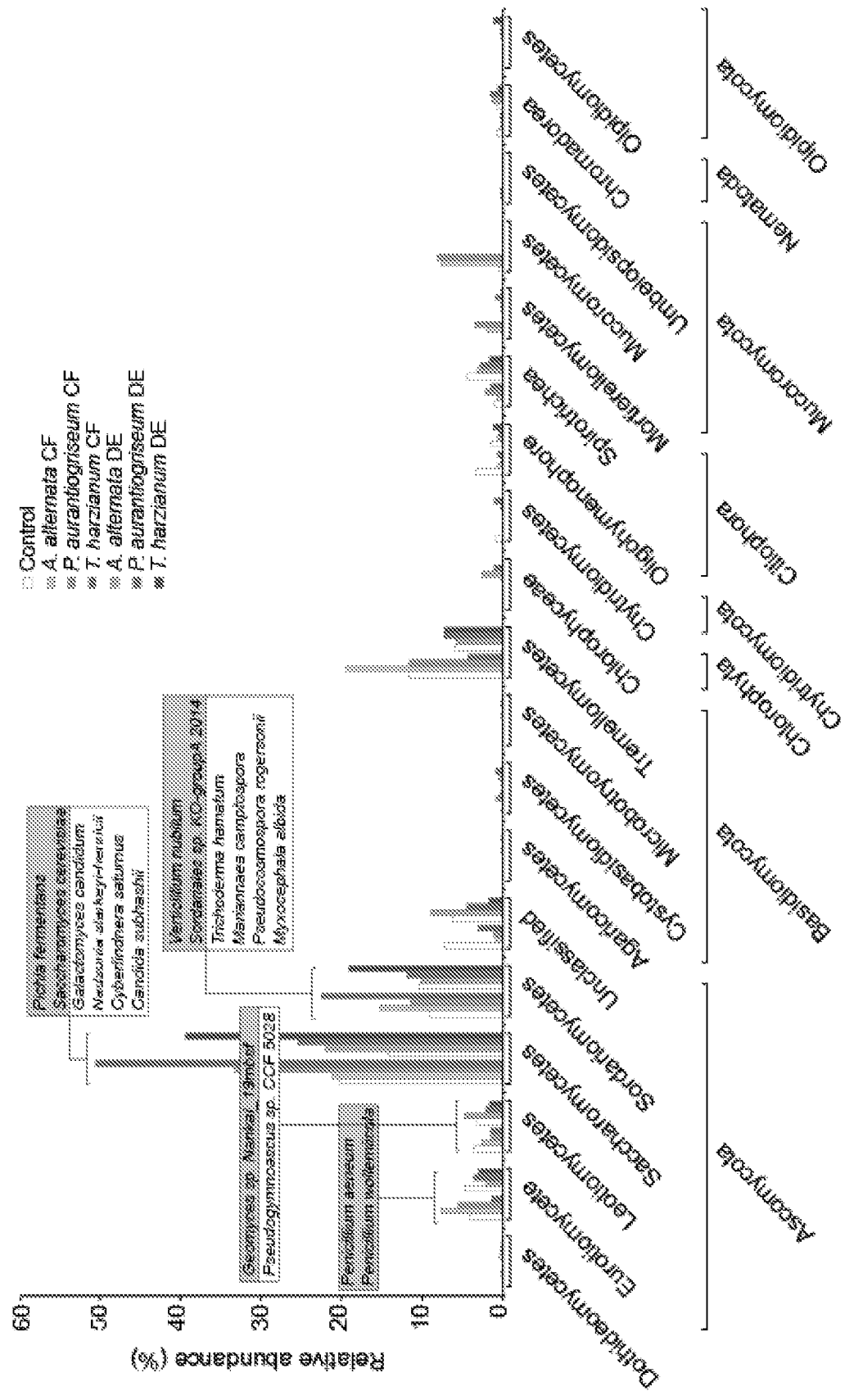


Fig. 3
36

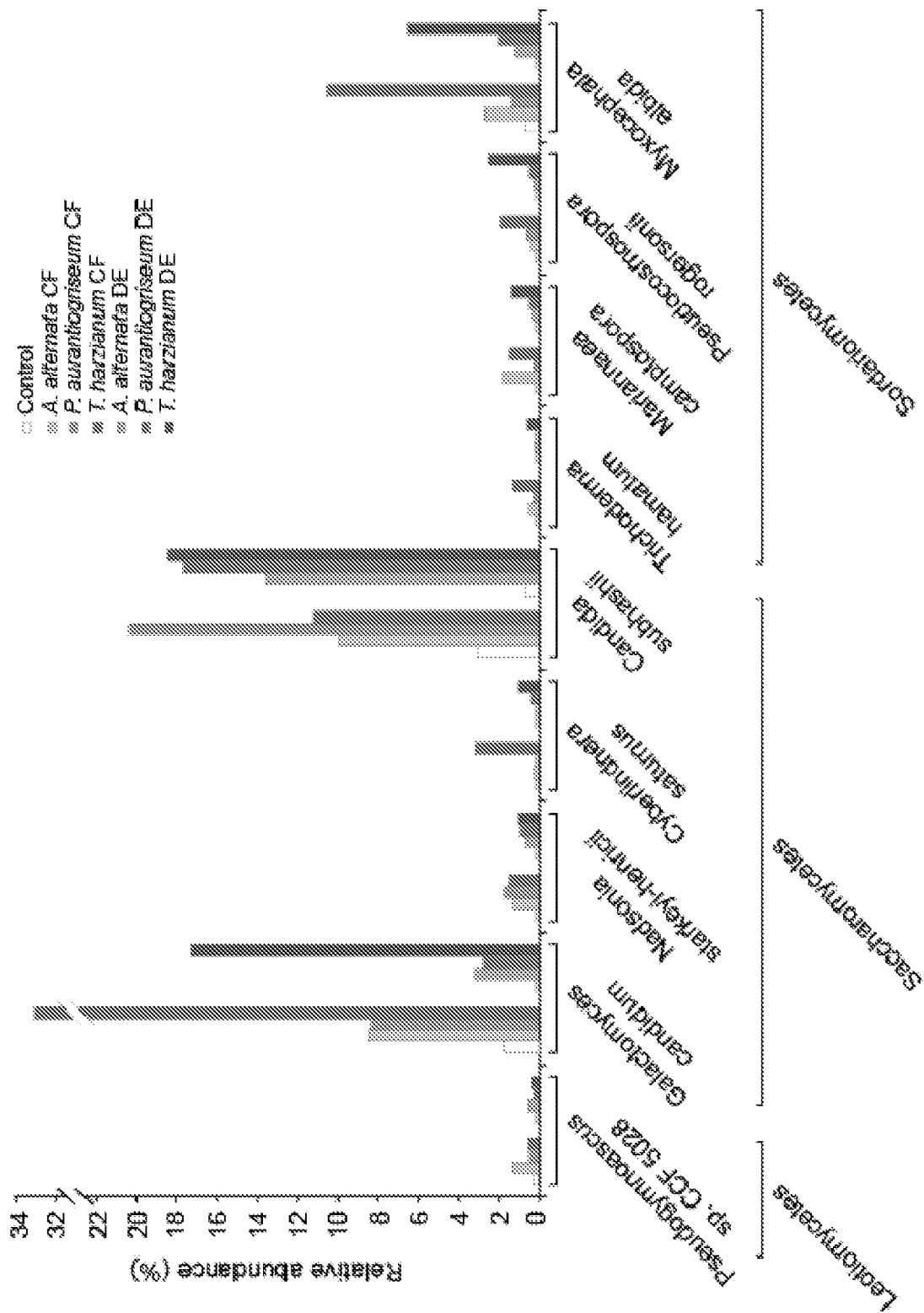


Fig. 4