

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 991 410**

51 Int. Cl.:

A01N 63/22 (2010.01)

C12N 5/00 (2006.01)

A01P 7/04 (2006.01)

A01P 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2020** **PCT/EP2020/055801**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.09.2020** **WO20178368**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2020** **E 20708098 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2024** **EP 3934428**

54 Título: **Cepa de Bacillus halosaccharovorans, composición que comprende la misma y usos de la misma**

30 Prioridad:

05.03.2019 EP 19382164

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.12.2024

73 Titular/es:

FUTURECO BIOSCIENCE, S.A. (100.0%)
Avenida del Cadí, nave 19-23, Polígono Industrial
Sant Pere Molanta
08799 Olèrdola - Barcelona, ES

72 Inventor/es:

LARA SÁNCHEZ, JOSÉ MANUEL y
FERNÁNDEZ CASTILLO, CAROLINA

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 991 410 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cepa de *Bacillus halosaccharovorans*, composición que comprende la misma y usos de la misma

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente europea EP19382164.2 presentada el 05 de marzo, de 2019.

Campo técnico

- 10 La presente invención se refiere al campo de los productos fitosanitarios. Proporciona una nueva cepa aislada del microorganismo *Bacillus halosaccharovorans*, composiciones que la comprenden y su uso en el control biológico de enfermedades provocadas por nematodos parásitos y pulgones en plantas.

Antecedentes de la técnica

- 15 Los nematodos e insectos fitoparásitos provocan daños económicamente significativos en cultivos y cultivos hortícolas y reducen significativamente los rendimientos agrícolas y disminuyen las cosechas en caso de que no sean erradicados.
- 20 Los nematodos fitoparásitos infectan el sistema radicular de las plantas cultivadas, tales como cultivos de patata, de remolacha azucarera y de tomate. Los nematodos parásitos incluyen nematodos del nudo de la raíz, por ejemplo, el género *Meloidogyne*; nematodos del quiste, por ejemplo, el género *Globodera*; y nematodos lesionadores de la raíz, por ejemplo, el género *Pratylenchus*.
- 25 Los pulgones, que son insectos perforadores y chupadores, ingieren la savia de la planta introduciendo su aparato bucal en ella (en el tallo, la hoja o las raíces). Atacan a casi todas las especies de plantas. El daño puede observarse en forma de decoloraciones moteadas de color amarillento que normalmente aparecen en la parte inferior de las hojas que posteriormente se secan y mueren. Algunas especies de pulgones forman agallas o hacen que las hojas se enrollen o se deformen. Los pulgones establecidos en otras partes de la planta, tales como tallos o ramas, pueden retrasar el crecimiento, provocar una rápida pérdida de hojas o muerte de ramas. Los pulgones también son portadores de numerosas enfermedades víricas.
- 30

- La estrategia de tratamiento de nematodos y pulgones más comúnmente usada es el control químico pero, aunque es efectiva, puede provocar problemas de contaminación del suelo, afectando a la biodiversidad y teniendo un impacto
- 35 negativo en la salud humana.

- En las últimas décadas, los investigadores han intentado desarrollar enfoques no químicos y respetuosos con el medio ambiente. Relacionado con el control de nematodos vegetales, se ha informado la actividad nematicida de determinadas cepas bacterianas contra *Meloidogyne incognita*, (por ejemplo, Xiang N *et al.* "Biological control of
- 40 *Meloidogyne incognita* by Spore-forming Plant Growth-promoting Rhizobacteria on Cotton" Plant Disease 2017(101):774-784). Se han desarrollado productos comerciales para el control de nematodos vegetales que comprenden bacterias del género *Bacillus*, por ejemplo: BioNem-WP/BioSafe (*B. firmus*), BioYield (*B. velezensis* y *B. subtilis*); Nemix (*Bacillus* spp.), VOTIVO® (*B. firmus*) y Pathway Consortia® (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces* spp. y *Trichoderma* spp.). Desafortunadamente, el efecto
- 45 nematicida informado en la técnica anterior, usando cepas bacterianas, se limita a determinadas plantas de cultivo y a determinados nematodos parásitos.

- Determinadas bacterias también se han usado contra miembros de la familia *Aphididae*, por ejemplo, usando toxinas
- 50 aficidas de *Bacillus thuringiensis* o plantas transgénicas que comprenden dichas toxinas (documento WO9404684).

- Otros informes han desvelado el uso de bacilos como biofertilizantes. Por ejemplo, los documentos CN106187614 y CN106495827 desvelan un fertilizante hidrosoluble que contiene *Bacillus halosaccharovorans* que puede mejorar la
- calidad de los cultivos y reducir el efecto de las enfermedades.

- 55 Es importante señalar que las condiciones ambientales y del hospedador afectan a la actividad biológica de las cepas de bacterias, haciendo que su efectividad sea generalmente variable y significativamente más baja que la de los productos químicos de referencia.

- A pesar de los esfuerzos realizados, por lo tanto, existe una necesidad de cepas bacterianas con un amplio espectro
- 60 de acción contra nematodos y pulgones.

Resumen de la invención

- Los inventores han descubierto sorprendentemente una cepa de la especie *Bacillus halosaccharovorans* (en lo
- 65 sucesivo en el presente documento también denominada "cepa bacteriana B410") que es un plaguicida con actividad

contra los nematodos fitoparásitos, tales como los nematodos del nudo de la raíz y los nematodos del quiste, pero también contra los insectos pulgones.

Como se muestra a continuación, la cepa de la invención se ha probado en ensayos en cámara de crecimiento e invernadero y ha demostrado ser eficiente, en términos de control de nematodos, contra los nematodos del nudo de la raíz (RKN, por sus siglas en inglés) *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne javanicus* en plantas de tomate y contra los nematodos del quiste de la patata (PCN, por sus siglas en inglés) *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida*. Es destacable que la eficacia *in vitro* de la cepa de la invención contra los nematodos probados, en términos de inhibición de la eclosión de huevos de RKN, fue mejor que la lograda usando el químico nematocida de referencia Oxamilo (Fig. 2) o similar al logrado con otro químico nematocida de referencia, Fenamifos (Fig. 1). En juveniles de RKN, la eficacia *in vitro* en términos de supervivencia fue similar a la eficacia presentada por Fenamifos (Fig. 3).

Este efecto antinematodos también se detectó *in vivo*, en términos de control de nematodos midiendo la población final de huevos por planta y la reproducción de RKN. Esto se logró usando las bacterias de la invención en varias formas: como sedimento (ejemplo 5.1), como Principio Activo de Calidad Técnica (TGAI, por sus siglas en inglés) (ejemplo 5.2) y como prototipo formulado (dispersión de aceite) (ejemplo 5.3).

En relación con los nematodos del quiste de la patata, la cepa bacteriana de la invención también mostró un porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos cercano al 100 % al final del tratamiento (fig. 4 y 5).

Además del efecto antinematodos, la cepa de la invención también ha demostrado ser efectiva como insecticida contra el pulgón *Aphis gossypii*. Como se muestra a continuación, la cepa B410 logró una importante mortalidad del pulgón *Aphis gossypii* actuando como TGAI (Fig. 6 y 7).

A partir de estos datos experimentales podría concluirse que la cepa bacteriana de la presente invención tiene un doble efecto controlando nematodos y pulgones. Esta es la primera vez que se informa una cepa de *B. halosaccharovorans* con tan particular doble efecto. Adicionalmente, es sorprendente que tenga un mejor efecto en comparación con un producto químico de referencia *in vitro*.

Además, a tan notable perfil de actividad, también se descubrió que la cepa de la presente invención no presentó toxicidad oral aguda *in vivo* en ratones. Los resultados mostraron que los animales no tuvieron efectos clínicos adversos visibles y no se encontró infectividad o patogenicidad.

Los inventores han descubierto además que la cepa identificada era mesófila, neutrófila, halotolerante y fuerte productora de biopelículas. Los microorganismos halotolerantes son de considerable interés agrícola porque pueden ser aplicables a áreas tales como las zonas agrícolas de zonas áridas y podrían aumentar la productividad agrícola de tierras afectadas por la salinización del suelo o donde solo hay agua salina disponible. Además, muchos factores estresantes ambientales implican o inducen cambios osmóticos; por lo tanto, la halotolerancia es una característica ventajosa. B410 es un fuerte productor de biopelículas, una característica importante durante la colonización microbiana y la supervivencia en ambientes desfavorables.

Por lo tanto, la cepa de la presente invención beneficia el crecimiento de la planta bacterizada.

El uso de la cepa de la presente invención para controlar una infección por nematodos y/o insectos es respetuoso con el medio ambiente.

En conjunto la cepa de la presente invención supone un gran avance en el campo de los bioplaguicidas.

Por lo tanto, el primer aspecto de la presente invención se refiere a una cepa aislada de *Bacillus halosaccharovorans* depositada en la "Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)" con el número de registro CECT9165.

En la presente invención los términos "B410" y "CECT9165", refiriéndose a la cepa de la invención, se usan indistintamente.

La cepa de la invención se aisló de un suelo agrícola en Almería (España) y se depositó, de acuerdo con el Tratado de Budapest, en la CECT en el Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de València C.P 46980 Catedrático Agustín Escardino N.º 9 Paterna, Valencia (España), con el número de registro CECT9165. Se depositó por el depositante Futureco Bioscience S.A., Av. Del Cadí 19-23 P.I. Sant Pere Molanta 08799 Olerdola Barcelona, el 13 de julio de 2016. La cepa se identificó por el depositante con la referencia B410 y recibió el número de registro CECT9165. Además, se declaró viable.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un cultivo bacteriano que comprende la cepa definida en el primer aspecto de la invención.

Debido al efecto plaguicida de la cepa de la presente invención, puede usarse como un producto fitosanitario. Como

se ilustra en los ejemplos a continuación, la cepa del primer aspecto de la invención puede usarse como producto fitosanitario de acuerdo con las directrices de la FAO, que son las directrices emitidas por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Las bacterias aisladas como se definen en el primer aspecto de la invención pueden usarse como ingrediente de una composición fitosanitaria.

5

Por lo tanto, un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad efectiva de la cepa como se define en el primer aspecto de la invención o el cultivo bacteriano como se define en el segundo aspecto de la invención y uno o más compuesto o compuestos agrícolamente aceptables.

10 Un quinto aspecto de la invención se refiere a un proceso para la obtención de una suspensión celular viable derivada de la cepa CECT9165 de *B. halosaccharovorans* del primer aspecto de la invención; comprendiendo el proceso:

(i) inocular la cepa en un medio de cultivo, (ii) someter el medio de cultivo inoculado de la etapa (i) a condiciones adecuadas para el crecimiento de la cepa y (iii) someter opcionalmente el medio resultante de la etapa (ii) a una etapa de concentración.

15 Un sexto aspecto de la invención se refiere al uso de una cepa como se define en el primer aspecto de la invención para controlar una infección por nematodos y/o insectos en una planta.

Un séptimo aspecto de la presente invención se refiere a un método para controlar una infección provocada por nematodos y/o insectos en una planta que comprende aplicar a una parte de una planta o al sustrato usado para

20 cultivar dicha planta una cepa como se define en el primer aspecto de la invención.

Un octavo aspecto de la presente invención se refiere a un kit que comprende una cantidad efectiva de la cepa del primer aspecto de la invención o el cultivo bacteriano del segundo aspecto de la invención o la composición del tercer aspecto de la invención.

25

Un noveno aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit del octavo aspecto de la invención para controlar una infección por nematodos y/o una infección por pulgón en una planta.

Breve descripción de los dibujos

30

La Fig. 1 muestra una comparación de la actividad nematocida *in vitro* de la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* y Nemacur® ("producto químico") contra huevos de *Meloidogyne javanica* y *M. incognita*.

La Fig. 2 muestra una comparación de la actividad nematocida *in vitro* de la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* y 35 Vydate® ("producto químico") contra huevos de *M. javanica* y *M. incognita*.

La Fig. 3 muestra una comparación de la actividad nematocida *in vitro* de la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* y Vydate® ("producto químico") contra juveniles (J2) de *M. javanica* y *M. incognita*.

40 La Fig. 4 muestra la actividad nematocida *in vitro* de la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* contra huevos de *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida*.

La Fig. 5 muestra la actividad nematocida *in vitro* de la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* contra huevos de *Globodera rostochiensis* comparado con el producto químico de referencia (Vydate®)

45

La Fig. 6 muestra el porcentaje de supervivencia de pulgón registrado en condiciones de laboratorio comparando el tratamiento con otras cepas bacterianas.

La Fig. 7 muestra el porcentaje de eficacia de B410 sobre el control de pulgones 48 h y 96 h después del tratamiento 50 en condiciones de laboratorio en comparación con la eficacia de otras cepas bacterianas.

En todas las figuras: los datos representados con diferente letra ("a" o "b") indican que hubo una diferencia estadísticamente significativa entre ellos (los datos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) usando un programa R; las medias de los tratamientos se compararon usando la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) 55 protegida de Fisher a $P = 0,05$). "Control": control negativo. "Eclosión de huevos (%)": porcentaje de eclosión de huevos.

Descripción detallada de la invención

60 Todos los términos y expresiones como se usan en la presente solicitud, salvo que se especifique lo contrario, se entenderán en su significado habitual como se conoce en la técnica. Otras definiciones más específicas para determinados términos y expresiones como se usan en la presente solicitud son como se exponen a continuación y pretenden aplicarse de manera uniforme a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones a menos que una definición expuesta expresamente de otro modo proporcione una definición más amplia. Las definiciones 65 proporcionadas en el presente documento se incluyen con fines de comprensión y se espera que se apliquen a lo

largo de la descripción, las reivindicaciones y los dibujos.

El primer aspecto de la invención se refiere a una cepa aislada de *Bacillus halosaccharovorans* depositada en la "Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)" con el número de registro CECT9165.

5

En una realización particular del primer aspecto de la invención, opcionalmente junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas a continuación, la cepa aislada de *Bacillus halosaccharovorans* es la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT9165.

10

En una realización particular del primer aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el efecto nematocida es contra al menos un nematodo del género *Meloidogyne* y *Globodera*. En otra realización, el efecto nematocida es contra uno o más de *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida*. En otra realización, la cepa como se define en el primer aspecto de la invención tiene un efecto insecticida contra *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida*.

15

En una realización particular del primer aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, la cepa como se define en el primer aspecto de la invención tiene un efecto insecticida al menos contra la superfamilia *Aphidoidea*. En otra realización, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, la cepa como se define en el primer aspecto de la invención tiene un efecto insecticida al menos contra la familia *Aphididae*. En otra realización, la cepa como se define en el primer aspecto de la invención tiene un efecto insecticida contra *Aphis gossypii*.

20

25

En otra realización del primer aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, la cepa como se define en el primer aspecto de la invención tiene un efecto nematocida contra *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida*; y un efecto afidicida es contra *Aphis gossypii*.

30

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un cultivo bacteriano que comprende la cepa definida en el primer aspecto de la invención.

En una realización del segundo aspecto de la invención, el cultivo bacteriano comprende una cepa viable como se define en el primer aspecto de la invención.

35

En otra realización del segundo aspecto de la invención, el cultivo bacteriano comprende la cepa de la invención inactivada.

El término "inactivado" significa que el microorganismo no es capaz de formar colonias. En una realización, los microorganismos inactivados tienen la membrana celular intacta o rota.

40

En una realización del segundo aspecto de la invención, el cultivo bacteriano es un producto de inoculación.

Por "producto de inoculación" se entiende un producto obtenido después de inocular la cepa en un medio de cultivo adecuado, sometiendo el medio de cultivo inoculado a condiciones de crecimiento adecuadas.

45

En otra realización del segundo aspecto de la invención, el producto de inoculación comprende la cepa de la invención inactivada.

50

Por "producto de inoculación que comprende la cepa de la invención inactivada" se refiere a un producto obtenido después de inocular la cepa en un medio de cultivo adecuado, someter el medio de cultivo inoculado a condiciones de crecimiento adecuadas y después, inactivar la cepa.

Con miras a un uso práctico en el control de plagas, los agentes plaguicidas normalmente se formulan en composiciones que también incluyen compuestos agrícolamente aceptables. Por lo tanto, un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad efectiva de la cepa como se define en el primer aspecto de la invención o el cultivo bacteriano como se define en el segundo aspecto de la invención y uno o más compuestos agrícolamente aceptables.

55

60

La expresión "cantidad efectiva" como se usa en el presente documento, significa una cantidad de un principio activo (ingrediente; es decir, una cepa bacteriana, en la presente invención es la cepa *B. halosaccharovorans* CECT9165 lo suficientemente alta para proporcionar el beneficio deseado, el control de nematodos y pulgones, pero lo suficientemente baja como para evitar efectos secundarios graves.

65

En una realización del tercer aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones

proporcionadas anteriormente o a continuación, la cepa está presente en una concentración de 10^5 ufc/ml a 10^{12} ufc/ml. En otra realización del tercer aspecto de la invención, la cepa está presente en una concentración de 10^5 ufc/ml, 10^6 ufc/ml, 10^7 ufc/ml, 10^8 ufc/ml, 10^9 ufc/ml, 10^{10} ufc/ml, 10^{11} ufc/ml o 10^{12} ufc/ml.

5 Para los fines de la invención, cualquier intervalo dado incluye los extremos tanto inferior como superior del intervalo.

La cantidad indicada como ufc/dosis se refiere a las unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa de la invención por dosis. La cantidad indicada como ufc/ml se refiere a las unidades formadoras de colonias de la cepa de la invención por mililitro.

10

La expresión "cantidad efectiva" como se usa en el presente documento, significa una cantidad de la cepa *B. halosaccharovorans* CECT9165 como se define en el primer aspecto de la invención, suficientemente alta para proporcionar el beneficio deseado, ya sea el tratamiento o la prevención de la enfermedad de la planta, pero lo suficientemente baja como para evitar efectos secundarios graves. La dosis particular del compuesto administrado de

15 acuerdo con la presente invención se determinará, por supuesto, según las circunstancias particulares del caso, incluyendo el compuesto administrado, la vía de administración, la afección particular a tratar y las consideraciones similares.

En otra realización del tercer aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, la composición es una composición fitosanitaria.

20

En otra realización del tercer aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el compuesto agrícola aceptable se selecciona del grupo que consiste en: fortificantes para plantas, nutrientes, agentes humectantes, compuestos que mejoran la adherencia,

25

compuestos tamponantes, estabilizantes, antioxidantes, protectores osmóticos y filtros solares.

En otra realización del tercer aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, la composición comprende al menos un plaguicida adicional.

30 En otra realización del tercer aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el plaguicida adicional se selecciona del grupo que consiste en otra cepa bacteriana con propiedades plaguicidas, un fungicida, un bactericida, un herbicida, un insecticida químico o un nematocida químico. Dicho plaguicida adicional no tiene por qué afectar negativamente a la actividad/viabilidad de la cepa de la invención incluida en la composición.

35

En la presente invención, el término "plaguicida" se entiende por su significado habitual en el campo de la agronomía como un producto destinado a destruir, repeler, regular o interrumpir el crecimiento de organismos vivos que se consideran plagas. Claramente, debido a la naturaleza de la cepa CECT9165 de *B. halosaccharovorans*, en el presente documento se entiende que "plaguicida" es un plaguicida biológico o ecológico (orgánico), denominado también

40

bioplaguicida. En el alcance de la presente invención, el término "plaguicida" tendría el mismo significado que el término "fitosanitario".

En una realización del tercer aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, puede estar en forma de una solución, un sedimento, una suspensión,

45

composiciones liofilizadas u otras composiciones secas (por ejemplo, composición secada por congelación). La composición liofilizada o seca puede reconstituirse con un vehículo líquido antes de su uso o usarse directamente. La composición puede prepararse de acuerdo con diversas formulaciones adecuadas para usos fitosanitarios, por ejemplo, elegidas del grupo que consiste en formulaciones del siguiente tipo: líquido destinado a usarse sin dilución (AL), polvo destinado a usarse sin dilución (AP), gránulo encapsulado (CG), líquido o gel de contacto (CL), polvo de

50

contacto (CP), polvo en polvo (DP), concentrado emulsionable (EC), gránulo emulsionable (EG), emulsión de tipo aceite (EO), emulsión de tipo agua (EW), gránulo fino (FG), macrogránulos (GG), gel emulsionable (GL), polvo para pulverizar (GP), gránulos (GR), grasa (GS), gel hidrosoluble (GW), microemulsión (ME), microgránulos (MG), suspensión concentrada diluible en agua (OF), dispersión oleaginosa (OD), suspensión miscible en agua (OL), polvo para dispersión en aceite (OP), concentrado en forma de gel o pasta (PC), barras (para uso agrofarmacéutico) (PR),

55

suspensión concentrada (SC), suspoemulsión (SE), gránulos hidrosolubles (GS), concentrados solubles (SL), aceite formador de película (SO), polvos hidrosolubles (PS), comprimidos hidrosolubles (ST), comprimidos (TB), gránulos dispersables en agua (WG), polvo humectable (WP), comprimidos dispersables en agua (WT) (el código que consiste en dos letras mayúsculas correspondientes a los códigos internacionales para formulaciones fitosanitarias).

60 En una realización del tercer aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, la composición es una composición de dispersión oleaginosa (DO).

En una realización del tercer aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, la composición es una formulación OD y comprende una

65

concentración de la cepa como se define en el primer aspecto de la invención en el intervalo de 10^5 a 10^{12} UFC/ml

(10^5 ufc/ml, 10^6 ufc/ml, 10^7 ufc/ml, 10^8 ufc/ml, 10^9 ufc/ml, 10^{10} ufc/ml, 10^{11} ufc/ml o 10^{12} ufc/ml).

En una realización del tercer aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, la composición es una formulación OD y comprende una
5 concentración de la cepa como se define en el primer aspecto de la invención de 10^9 UFC/ml.

En una realización del tercer aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, la composición es una formulación OD y comprende una
10 concentración de la cepa como se define en el primer aspecto de la invención en el intervalo de $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^{12}$ UFC/ml y también comprende un ingrediente oleaginoso, en una realización es un aceite vegetal, en otra realización es aceite de soja o aceite de judía de soja.

En una realización del tercer aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, la composición es una formulación OD y comprende una
15 concentración de la cepa como se define en el primer aspecto de la invención en el intervalo de $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^{12}$ UFC/ml y también comprende un ingrediente oleaginoso, un éster orgánico y sílice. En otra realización, el ingrediente oleaginoso es un aceite vegetal; en otra realización es aceite de soja. En otra realización es aceite de judía de soja al 69 %, el éster orgánico (por ejemplo, éster de ácido graso etoxilado) está al 20 %, la sílice está al 1 % y la cepa es como TGA1 al 10 %.

20 "Compuestos agrícolamente aceptables" se refieren a aquellos compuestos y/o materiales, que son adecuados para su uso en agricultura. En general, dichos compuestos no deberían ser tóxicos para los seres humanos y, preferentemente, deberían ser respetuosos con el medio ambiente.

25 En una realización particular del tercer aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, las composiciones de la invención pueden contener compuestos para mejorar la adherencia de las cepas en las plantas a tratar, así como compuestos fitofortificantes, nutrientes, agentes humectantes, estabilizantes, protectores osmóticos, antioxidantes, protectores solares,
30 compuestos tamponantes o combinaciones de los mismos.

Algunos ejemplos de productos de adhesión son gelatina, almidón, pectinas, alginatos y diversos tipos de gomas tales como xantana. Muchos de estos compuestos también son agentes humectantes. En el caso de los protectores solares, pueden usarse rojo Congo, carbonato cálcico y emulsiones de cera. Los fitofortificantes son compuestos que pueden
35 facilitar que los cultivos desarrollen fortaleza o tolerancia contra patógenos o condiciones ambientales adversas, por ejemplo, análogos del ácido jasmónico y algunos estimulantes de las defensas de las plantas tales como harpinas, quitosanos y laminarinas. Adicionalmente, algunos ejemplos de protectores osmóticos son trehalosa, betaínas y aminoácidos. Finalmente, el ácido ascórbico y el glutatión se incluyen entre los antioxidantes.

Las composiciones del tercer aspecto de la invención pueden prepararse mediante protocolos de rutina, tal como, por
40 ejemplo, mezclando los diferentes ingredientes.

Un quinto aspecto de la invención se refiere a un proceso para la obtención de una suspensión celular viable derivada de la cepa CECT9165 de *B. halosaccharovorans* del primer aspecto de la invención, comprendiendo el proceso:

(i) inocular la cepa en un medio de cultivo, (ii) someter el medio de cultivo inoculado de la etapa (i) a condiciones
45 adecuadas para el crecimiento de la cepa y (iii) someter opcionalmente el medio resultante de la etapa (ii) a una etapa de concentración.

La expresión "derivado de la cepa CECT9165" significa que la suspensión se obtiene de la cepa como se define en el
50 primer aspecto de la presente invención.

La cepa de la invención puede inocularse en el medio de cultivo a una concentración final comprendida del 5 al 7 % v/v. Preferentemente el cultivo inoculado se encuentra en una fase de crecimiento exponencial. Los medios de cultivo adecuados para el crecimiento de la cepa de la invención son medios sintéticos, tales como LB (del inglés *lysogenic broth*, caldo lisogénico) y PM (*saline production medium*, medio de producción salino), o medios de origen vegetal
55 tales como melaza (por ejemplo, de caña de azúcar, remolacha y otros). Las condiciones adecuadas para el crecimiento de la cepa son temperaturas comprendidas de 4 a 45 °C, un pH comprendido de 6 a 9 y una concentración de oxígeno comprendida del 50 al 100 %. El crecimiento de la cepa de la invención se produce mediante agitación.

En una realización del quinto aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, las condiciones para el crecimiento de la cepa son temperaturas
60 comprendidas entre 28 y 30 °C, un pH comprendido entre 7 y 8,5 y una concentración de oxígeno comprendida entre el 85 y el 100 %.

En otra realización del proceso para la obtención de la suspensión, las células se separan del medio para obtener una
65 suspensión concentrada. Las técnicas de separación adecuadas incluyen centrifugación o filtración del cultivo. Al llevar

a cabo la centrifugación del cultivo, por ejemplo, a un mínimo de 5000 rpm, las células se obtienen en el sedimento, que se resuspende en parte del medio de cultivo o en un medio tamponado adecuado de tal manera que la concentración de la cepa sea de aproximadamente 1×10^5 - 1×10^{12} UFC/ml (10^5 ufc/ml, 10^6 ufc/ml, 10^7 ufc/ml, 10^8 ufc/ml, 10^9 ufc/ml, 10^{10} ufc/ml, 10^{11} ufc/ml o 10^{12} ufc/ml).

5

Una vez obtenida la suspensión, ésta puede someterse a una etapa de deshidratación. La deshidratación puede llevarse a cabo mediante un proceso de liofilización. Como alternativa, la suspensión puede deshidratarse mediante secado en lecho fluidizado. Otra opción es deshidratar la suspensión mediante secado por pulverización o secado en un horno al vacío. En este sentido, otra característica ventajosa de la cepa de la invención es que presenta una alta

10

resistencia a los procesos de deshidratación, que son habituales en la obtención de microorganismos a escala industrial. Para mejorar la viabilidad celular, puede añadirse un ingrediente protector osmótico inerte a la suspensión antes de llevar a cabo el proceso de deshidratación.

15

En otra realización particular del quinto aspecto de la invención, el proceso comprende resuspender las células resultantes de la etapa de separación en un tampón adecuado para producir una suspensión concentrada de células.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un extracto libre de células derivado de la cepa CECT9165 de *B. halosaccharovorans* como se define en el primer aspecto de la invención, pudiendo obtenerse dicho extracto mediante un proceso que comprende: (i) inocular la cepa en un medio de cultivo adecuado; (ii) someter el medio de cultivo

20

inoculado a condiciones de crecimiento adecuadas; (iii) separar las células del medio de cultivo de la etapa (ii); (iv) recoger el extracto acelular; y (v) opcionalmente someter el extracto acelular a una etapa de concentración.

El medio acelular obtenido mediante los procesos de separación descritos anteriormente, podría usarse y/o incluirse en una formulación apropiada directamente o someterse a una etapa de concentración para alcanzar una composición

25

más adecuada. Por lo tanto, en una realización del cuarto aspecto de la invención a la etapa de concentración del extracto acelular que puede realizarse mediante deshidratación, filtración, ultrafiltración, centrifugación, ultracentrifugación, precipitación o cromatografía.

Un sexto aspecto de la invención se refiere al uso de una cepa aislada de *Bacillus halosaccharovorans* como se define

30

en el primer aspecto, que tiene efecto nematocida e insecticida, para controlar una infección por nematodos y/o insectos en una planta.

En una realización del sexto aspecto de la invención, se refiere al uso de una cepa aislada de *Bacillus halosaccharovorans* como se define en el primer aspecto, que tiene efecto nematocida y aficida, para controlar una

35

infección por nematodos y/o una por pulgones en una planta.

Un séptimo aspecto de la presente invención se refiere a un método para controlar una infección provocada por nematodos y/o pulgones en una planta que comprende aplicar a una parte de una planta o al sustrato usado para cultivar dicha planta una cepa de *Bacillus halosaccharovorans* como se define en el primer aspecto que tiene efecto

40

nematocida e insecticida.

En una realización del séptimo aspecto de la invención, se refiere a un método para controlar una infección provocada por nematodos y/o pulgones en una planta que comprende aplicar a una parte de una planta o al sustrato usado para cultivar dicha planta una cepa de *Bacillus halosaccharovorans* como se define en el primer aspecto que tiene efecto

45

nematocida y aficida.

La cepa del sexto y el séptimo aspectos de la invención puede usarse como un cultivo bacteriano o como una composición. Por lo tanto, en donde la cepa es la definida en el primer aspecto de la invención, el cultivo bacteriano es como el cultivo bacteriano definido en el segundo aspecto de la invención y la composición es la composición

50

definida en el tercer aspecto de la invención.

En una realización del séptimo aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, la cepa de *B. halosaccharovorans* como se define en el primer aspecto de la invención se administra a la planta en un régimen de dosificación de 10^5 a 10^{12} UFC/ml (10^5 ufc/ml, 10^6 ufc/ml, 10^7 ufc/ml, 10^8 ufc/ml, 10^9 ufc/ml, 10^{10} ufc/ml, 10^{11} ufc/ml o 10^{12} ufc/ml) por día una vez durante varias semanas. En una realización del séptimo aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, la cepa de *B. halosaccharovorans* como se define en el primer aspecto de la invención se administra a la planta en un régimen de dosificación de 10^7 ufc/ml por día una vez durante varias

55

semanas.

La dosis podrá adaptarse de acuerdo con la composición del tercer aspecto de la invención y la formulación de la composición que se use y también de acuerdo con las condiciones climáticas, cualquier fenómeno de resistencia u otros factores naturales, la naturaleza del tratamiento o el grado de infestación y de acuerdo con las plantas o sitios a tratar.

60

En una realización del séptimo aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, la cepa, el cultivo bacteriano o la composición se aplica a cajas de viveros de plantas, durante el tratamiento de semillas, el aderezo de semillas, la desinfección de semillas, el tratamiento de inmersión de raíces de plántulas, el tratamiento de pozos de siembra, el tratamiento del pie de la planta, el tratamiento de hileras de siembra, la pulverización de superficies, la incorporación al suelo o mediante aplicación a un medio de cultivo acuático en cultivo hidropónico.

En una realización del séptimo aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, la parte de la planta tratada es la semilla. Este tratamiento puede lograrse mediante métodos ordinarios; por ejemplo, un método en donde las semillas se sumergen en la composición del tercer aspecto de la invención.

El tratamiento de la planta, es decir, la raíz y/o las semillas, permite la acción nematocida de la cepa de la invención contra nematodos de las raíces.

El término "planta" comprende todas las especies vegetales cultivadas por el ser humano, en particular aquellas destinadas a la alimentación o a la alimentación animal, tales como cereales, forraje, hortalizas, cultivos frutales, vides y/o para el suministro de madera para todos los fines (tales como calefacción, muebles de construcción de viviendas y/u ornamentación). Algunos ejemplos de plantas incluyen cereales (por ejemplo, arroz, cebada, trigo, centeno, avena y maíz), judías (por ejemplo, soja, judía adzuki, haba gruesa, guisantes y cacahuetes), árboles frutales/frutas (por ejemplo, manzanos, perales, cítricos, uvas, melocotoneros, albaricoques, cerezos, olivos, frutos secos, almendras, plátanos, bayas y fresas), verduras (por ejemplo, tomate, col, espinaca, brócoli, lechuga, cebolla, ajo, puerro y pimienta), cultivos de raíces (por ejemplo, patata, zanahoria, boniato, rábano, raíz de loto y nabo), cultivos industriales (por ejemplo, algodón, cáñamo, morera de papel, mitsumata, colza, remolacha, lúpulo, caña de azúcar, remolacha azucarera, caucho, café, tabaco, té), pepos (por ejemplo, calabaza, pepino, sandía, melón), plantas de pasto (por ejemplo, dátilo, sorgo, hierba Timothy, trébol, alfalfa), céspedes (por ejemplo, hierba mascarene, bentgrass), cultivos de aromáticas (por ejemplo, lavanda, romero, tomillo, perejil, basilica, menta, coriandro, pimienta, jengibre) y plantas de flores (por ejemplo, crisantemo, rosa, orquídeas).

La expresión "parte de una planta" incluye cualquier segmento de la planta, tales como la raíz, el tallo, las hojas y las semillas.

El término "semilla" incluye lo que se denomina semillas, y también cuerpos vegetales para la propagación vegetativa tales como bulbos, tubérculos y patata de siembra.

En una realización del sexto o del séptimo aspectos de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, la planta es una planta de tomate, de pepino o de patata.

El término "sustrato" comprende cualquier soporte para cultivar una planta y el material para el mismo no está particularmente limitado, siempre que la planta pueda crecer en él; por ejemplo, mallas de invernadero, agua, arena, suelo, vermiculita, algodón, papel, tierra de diatomeas, agar, sustancias en gel, sustancias poliméricas, lana de roca, lana de vidrio, astillas de madera, cortezas y piedra pómez.

En una realización del séptimo aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el método de aplicación se realiza en las proximidades de la planta o en un vivero para el cultivo de plántulas.

En una realización del séptimo aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el método de aplicación se realiza directamente en la planta.

Los ejemplos a continuación demuestran el uso de una cepa de *B. halosaccharovorans* como un bioplaguicida, en el control de infecciones por nematodos y pulgones.

La actividad insecticida contra pulgones mostrada por la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* podría extrapolarse a otros insectos del orden de los hemípteros.

En una realización del sexto y del séptimo aspectos de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, los insectos son insectos hemípteros.

En una realización del sexto y del séptimo aspectos de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, los insectos son insectos hemípteros de la familia *Aphididae*, *Adelgidae*, *Phylloxeridae* y/o *Aleyrodidae*.

En una realización del sexto y del séptimo aspectos de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el insecto hemíptero de la familia *Aleyrodidae* es

Trialeurodes vaporariorum (moscas blancas).

En una realización del sexto y del séptimo aspectos de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, los insectos son de la familia *Aphididae*.

5

En una realización del sexto y del séptimo aspectos de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el uso del sexto aspecto y el método del séptimo aspecto son para controlar y prevenir la colonización de nematodos y/o pulgones plaga o tratar plantas infestadas. En particular, la invención se refiere a usos para controlar esas plagas vegetales.

10

El término "tratamiento" se refiere por lo tanto a plantas infestadas. El término control comprende prevenir infestaciones de las plantas por dichas plagas, repeler o eliminar dichas plagas.

En una realización del sexto y del séptimo aspectos de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el uso del sexto aspecto y el método del séptimo aspecto son para tratar una planta infectada por nematodos o pulgones plaga.

En una realización del sexto y del séptimo aspectos de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el nematodo es un nematodo del nudo de la raíz o un nematodo del quiste.

En una realización del sexto y del séptimo aspectos de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el nematodo es del género *Meloidogyne*, tales como *Meloidogyne incognita* (nematodo del nudo de la raíz meridional), *Meloidogyne javanica* (nematodo del nudo de la raíz de Java), *Meloidogyne hapla* (nematodo del nudo de la raíz septentrional) y *Meloidogyne arenaria* (nematodo del nudo de la raíz del cacahuete); nematodos del género *Globodera*, tales como *Globodera rostochiensis* (nematodo dorado) y *Globodera pallida* (nematodo del quiste de la patata); nematodos del género *Ditylenchus*, tales como *Ditylenchus destructor* (nematodo de la podredumbre de la patata) y *Ditylenchus dipsaci* (nematodo del bulbo y del tallo); nematodos del género *Pratylenchus*, tales como *Pratylenchus penetrans* (nematodo lesionador de la raíz de cobb), *Pratylenchus fallax* (nematodo lesionador de la raíz del crisantemo), *Pratylenchus coffeae* (nematodo lesionador de la raíz del café), *Pratylenchus loosi* (nematodo lesionador de la raíz del té) y *Pratylenchus vulnus* (nematodo lesionador de la raíz del nogal); nematodos del género *Heterodera*, tales como *Heterodera glaucina* (nematodo del quiste de la soja) y *Heterodera shachtolii* (nematodo del quiste de la remolacha azucarera); nematodos del género *Aphelenchoides*, tales como *Aphelenchoides besseyi* (nematodo de la punta blanca del arroz), *Aphelenchoides ritzemabosi* (nematodo foliar del crisantemo) y *Aphelenchoides fragariae* (nematodo de la fresa); nematodos del género *Aphelenchus*, tales como *Aphelenchus avenae* (nematodo micófago); nematodos del género *Radopholus*, tales como *Radopholus similis* (nematodo barrenador); nematodos del género *Tylenchulus*, tales como *Tylenchulus semipenetrans* (nematodo de los cítricos); nematodos del género *Rotylenchulus*, tales como *Rotylenchulus reniformis* (nematodo reniforme); o nematodos que se encuentran en los árboles, tales como *Bursaphelenchus xylophilus* (nematodo de la madera de pino).

En una realización del sexto y del séptimo aspectos de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el nematodo se selecciona del género *Meloidogyne* y *Globodera*.

45

En una realización del sexto y del séptimo aspectos de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el nematodo se selecciona del grupo que consiste en *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida*.

El término "pulgón" se refiere a los insectos de la superfamilia *Aphidoidea*, familia *Afidae*.

En una realización del sexto y del séptimo aspectos de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el pulgón se selecciona del grupo que consiste en: *Aphis gossypii* (pulgón del algodón y del melón), *Myzus persicae* (pulgón verde del melocotonero), *Myzus varians* (pulgón del melocotón-clemátide), *Myzus cerasi* (pulgón negro de la cereza), *Brachycaudus persicae* (pulgón negro del melocotonero), *Aphis pomi* (pulgón verde de la manzana), *Brachycaudus helichrysi* (pulgón rizador de las hojas de la ciruela), *Hyalopterus pruni* (pulgón harinoso de la ciruela), *Dysaphis plantaginea* (pulgón rosado del manzano), *Dysaphis pyri*, (pulgón de la paja de la pera), *Acyrtosiphon pisum* (pulgón del guisante), *Macrosiphum euphorbiae* (pulgón rosado y verde de la patata), *Aphis spiraecola* (*A. citricola*) (pulgón verde de los cítricos), *Aphis fabae* (pulgón negro de la judía), *Rhopalosiphum maidis* (pulgón del maíz), *Rhopalosiphum padi* (pulgón de la avena), *Sitobion avenae* (pulgón del grano inglés), *Diuraphis noxia* (pulgón del trigo ruso), *Brevicoryne brassicae* (pulgón de la col), *Eriosoma lanigerum* (pulgón lanífero del manzano), *Nasonovia ribisnigri* (pulgón de la lechuga), *Amphorophora idaei* (pulgón grande de la frambuesa), *Toxoptera aurantii* (pulgón negro de los cítricos y pulgón del café), *Elatobium abietinum* (pulgón verde del abeto) y *Pemphigus bursarius* (pulgón de la lechuga).

65

En una realización del sexto y del séptimo aspectos de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el pulgón es del género *Aphis*.

En una realización del sexto y del séptimo aspectos de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el pulgón es *Aphis gossypii*.

En una realización del sexto y del séptimo aspectos de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el nematodo se selecciona del género *Meloidogyne* y *Globodera*; y en donde el pulgón es del género *Aphis*.

En una realización del sexto y del séptimo aspectos de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el nematodo se selecciona del género *Meloidogyne* y *Globodera*; o como alternativa, se selecciona del grupo que consiste en *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida*; o como alternativa el pulgón es del género *Aphis*; o, como alternativa, el pulgón es *Aphis gossypii*; o, como alternativa, el nematodo se selecciona del género *Meloidogyne* y el pulgón es del género *Aphis*; o, como alternativa, el nematodo se selecciona del género *Globodera* y el pulgón es del género *Aphis*; o, como alternativa, el nematodo es *Meloidogyne incognita* o *Meloidogyne javanica* y el pulgón es del género *Aphis*; o, como alternativa, el nematodo es *Globodera rostochiensis* o *Globodera pallida* y el pulgón es del género *Aphis*; o, como alternativa, el nematodo se selecciona del género *Meloidogyne* y el pulgón es el pulgón es *Aphis gossypii*; o, como alternativa, el nematodo se selecciona del género *Globodera* y el pulgón es *Aphis gossypii*; o, como alternativa, el nematodo se selecciona del grupo que consiste en *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* y el pulgón es del género *Aphis*; o, como alternativa, el nematodo es *Meloidogyne javanica* y el pulgón es del género *Aphis*; o, como alternativa, el nematodo es *Globodera rostochiensis* y el pulgón es del género *Aphis*; o, como alternativa, el nematodo es *Globodera pallida* y el pulgón es del género *Aphis*; o, como alternativa, el nematodo se selecciona del grupo que consiste en *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* y el pulgón es *Aphis gossypii*; o, como alternativa, el nematodo es *Meloidogyne incognita* y el pulgón es *Aphis gossypii*; o, como alternativa, el nematodo es *Meloidogyne javanica* y el pulgón es *Aphis gossypii*; o, como alternativa, el nematodo es *Globodera rostochiensis* y el pulgón es *Aphis gossypii*; o, como alternativa, el nematodo es *Globodera pallida* y el pulgón es *Aphis gossypii*.

En la presente invención el término "infección" comprende infección asintomática o infección sintomática de la planta provocada por un nematodo.

En una realización del sexto y del séptimo aspectos de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el control puede realizarse en cualquier planta.

Un octavo aspecto de la presente invención se refiere a un kit que comprende una cantidad efectiva de la cepa como se define en el primer aspecto de la invención o el cultivo bacteriano del segundo aspecto de la invención o la composición del tercer aspecto de la invención.

Todas las realizaciones proporcionadas anteriormente para la cepa, el cultivo bacteriano y la composición también son realizaciones del kit del octavo aspecto de la invención.

En una realización del octavo aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el kit puede comprender una dosis semanal, mensual u otra dosis periódica de la cepa del primer aspecto de la invención. Como un ejemplo ilustrativo, un kit que comprende una dosis semanal puede comprender siete composiciones distintas que comprenden el probiótico (siete dosis diarias). Como otro ejemplo, un kit que comprende una dosis mensual puede comprender treinta composiciones que comprenden la cepa del primer aspecto de la invención.

En caso de que la cepa del primer aspecto de la invención esté liofilizada, el kit del octavo aspecto de la invención puede contener un agente de resuspensión comestible, tal como agua.

En otra realización del octavo aspecto de la invención, opcionalmente, junto con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el kit comprende medios para facilitar el cumplimiento de la dosificación. Por ejemplo, los kits pueden ser particularmente ventajosos con el fin de garantizar que la persona que los usó esté realizando la administración correcta de la cantidad efectiva de la cepa de la invención a la planta de acuerdo con el cronograma prescrito apropiadamente. Las tarjetas de blíster u otros dispositivos contenedores configurados de forma apropiada pueden ser particularmente adecuados para ilustrar claramente la secuencia o el momento de administración de los diversos componentes. El kit puede obtenerse como una tarjeta, o en cajas de cuatro, seis, siete (por ejemplo, un suministro semanal) u ocho tarjetas envasadas juntas. Adicionalmente, pueden obtenerse kits mensuales o de otro tipo.

El kit que comprende la cepa aislada del primer aspecto de la invención puede comprender cualquier medio que

permita el cultivo correcto de la cepa de la invención, tal como medio de cultivo, suplementos o antibióticos, así como instrucciones para la correcta preparación y/o aplicación a la planta.

Un noveno aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit del octavo aspecto de la invención para controlar una infección por nematodos y/o una infección por pulgón en una planta.

Todas las realizaciones proporcionadas anteriormente el séptimo y el octavo aspectos de la invención, con respecto a las infecciones y plantas particulares, entre otros, también son reivindicaciones del noveno aspecto.

- 10 A lo largo de toda la descripción y en las reivindicaciones la palabra "comprender" y variaciones de la misma, no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Adicionalmente, la palabra "comprender" abarca el caso de "consistir en". Los objetos, las ventajas y las características adicionales de la invención serán evidentes para los expertos en la materia tras examinar la descripción o pueden aprenderse poniendo en práctica la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que estos sean limitantes de la presente invención. Los signos de referencia relacionados con los dibujos y puestos entre paréntesis en una reivindicación, son únicamente para intentar aumentar la inteligibilidad de la reivindicación y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la reivindicación. Adicionalmente, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas descritas en el presente documento.

20 Ejemplos:

Ejemplo 1. Caracterización de la cepa B410 de *B. halosaccharovorans*

1.1. Ejemplo

25 La cepa de la presente invención se secuenció y se caracterizó en términos de su intervalo de temperatura, intervalo de pH, intervalo de salinidad y producción de biopelículas.

Materiales y métodos

30 La cepa B410 de *B. halosaccharovorans* se aisló en un suelo agrícola en régimen de agricultura ecológica de Almería (Sur de España). La identificación del aislado bacteriano se logró mediante análisis de secuencia del gen de ARNr 16S.

35 Se usaron otros aislados de *Bacillus* como comparación, incluyendo otras cepas de la colección Futureco Bioscience y cepas compradas de la colección *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ). Las otras cepas de Futureco Bioscience fueron las siguientes: B2399, *Bacillus litoralis*; B2309, *Bacillus litoralis* / *niabensis* / *simplex*; B2525, *Bacillus niabensis*; B145, *Bacillus niabensis*; B149, *Bacillus niabensis* / *litoralis* / *Bacillus* sp.; y B1203, *Bacillus niabensis*. Las cepas de la colección DSMZ se incluyeron como una referencia y fueron las siguientes: 40 DSM17723 (*Bacillus niabensis*), DSM 25387 (*Bacillus halosaccharovorans*) y DSM16303 (*Bacillus litoralis*).

La identificación de los aislados bacterianos se logró mediante análisis de secuencia del gen de ARNr 16S. Los cultivos se cultivaron de forma rutinaria a 28 °C en medio Caldo Marino en un agitador giratorio a 200 rpm. El ADN molde se aisló usando el kit Quick DNA Fungal/Bacterial de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Zymo Research). La 45 secuenciación del gen ARNr 16S se realizó como se describe a continuación. Una mezcla de reacción de PCR, que consistía en 2,5 µl de Tampón 10xNH₄ (Bioline), 0,75 µl de MgCl₂ 50 mM, 0,625 µl de mezcla de dNTP 10 mM 0,5 µl de cebador 8f 10 µM SEQ ID NO:1 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 0,8 µl de cebador 1492r 10 µM (SEQ ID NO:2 5'-ACCTTGTTACGACTT-3'), 0,25 µl de polimerasa Taq Biotaq (5 U/µl; Bioline), 17,875 µl de agua nanopura y 2 µl de ADN molde, se amplificó de acuerdo con el siguiente programa: 95 °C 5 min; 35 ciclos de 95 °C 30 s, 54 °C 50 30 s y 72 °C 60 s y 72 °C 5 min. El producto de PCR se purificó usando el kit EZNA Cycle Pure (Omega Bio-Tek) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El producto de PCR purificado se secuenció por un servicio de secuenciación externo (Secugen) usando el cebador 1492r (SEQ ID NO: 2) y el método Sanger con BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

55 Para determinar la temperatura óptima para el crecimiento de aislados de *Bacillus* seleccionados, cada cepa se sembró en la superficie de placas de agar nutritivo que después se incubaron a temperaturas de 4 °C, 40 °C, 42 °C, 45 °C y 50 °C. El crecimiento bacteriano se evaluó todos los días durante 6 días de incubación.

El intervalo de pH de crecimiento a 28 °C de la cepa se determinó en placas estériles de 96 pocillos. Para el 60 experimento, las bacterias se cultivaron primero durante la noche en Caldo Marino. Después de eso, se añadieron 100 µl de suspensiones bacterianas con una densidad óptica final a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,01 al medio LB a los siguientes pH: 6,48, 7,03, 9,33, 10,04 y 10,98. A continuación, se inocularon 200 µl de cada aislado de *Bacillus* para el pH (2 pocillos por pH).

65 Las placas se leyeron después de 24 h de incubación a 28 °C. Para determinar los extremos finales, se tuvieron en

cuenta varios enfoques. El crecimiento de las bacterias se evaluó mediante densidad óptica a 620 nm (DO_{620}). La viabilidad celular se confirmó mediante la adición de 30 μ l de resazurina al 0,01 %. Cualquier cambio de color de azul violeta a rosa se registró como positivo.

- 5 El efecto de la salinidad sobre la tasa de crecimiento de la cepa recolectada a 28 °C se determinó en placas estériles de 96 pocillos mediante diluciones seriadas dos veces de NaCl en 100 μ l de LB sin NaCl. Para el experimento, las bacterias se cultivaron primero durante la noche en Caldo Marino. Después de eso, 100 μ l de suspensiones bacterianas con una densidad óptica final a 600 nm (DO_{600}) de 0,01 se añadieron a los pocillos que contenían las siguientes diluciones de NaCl: 15, 10, 7,5, 5, 3,75, 2,5, 1,875, 1,25, 0,93, 0,65, 0,465 y 0 %. Las placas se leyeron después de 48 h de incubación a 28 °C. Para determinar los extremos finales de CIM, se tuvieron en cuenta varios enfoques. Inicialmente se tomó como el valor de CIM la concentración más baja que no mostraba crecimiento bacteriano según lo evaluado mediante inspección visual y la viabilidad celular se confirmó mediante la adición de 30 μ l de resazurina al 0,01 %. Cualquier cambio de color de azul violeta a rosa se registró como positivo y, en este caso, la CIM se definió como la concentración más baja de NaCl que carece de este cambio de color. Además de la evaluación visual de la CIM y antes de añadir resazurina, las DO_{620} se determinaron en cada pocillo.

- La producción de biopelículas a 28 °C de la cepa de recolección se determinó en placas estériles de 96 pocillos mediante réplicas de 21 pocillos. Para el experimento, las bacterias se cultivaron primero durante la noche en Caldo Marino. Después de eso, se añadieron 200 μ l de suspensiones bacterianas con una densidad óptica final a 600 nm (DO_{600}) de 0,1 en Caldo Marino a los pocillos. Las placas se leyeron después de 72 h de incubación a 28 °C. La producción de biopelículas se informó como Biopelícula relativa. Después de la incubación se leyó la densidad óptica de las placas a 620 nm, después de eso las biopelículas se tiñeron con cristal violeta al 0,1 % y se diluyeron con etanol para obtener su densidad óptica a 620 nm.
- 25 La biopelícula relativa fue la relación de la DO de la tinción de biopelícula con cristal violeta a 620 nm dividida por la DO a 620 nm del crecimiento celular inicial.

Resultados:

- 30 La secuenciación reveló una secuencia (SEQ ID NO: 3) que era un 98 % idéntica a la de la cepa E33 de *B. halosaccharovorans* (número de registro del NCBI NR_109116.1; fecha de acceso a la base de datos 1/10/2018) (de acuerdo con Stoddard SF, *et al.* Nucleic Acids Res. enero de 2015; 43:D593-8).

- El intervalo de crecimiento de temperatura de todos los aislados de *Bacillus* resultó ser similar debido a que la mayoría de ellos crecen de 4 °C a 45 °C excepto DSM 17723, que resultó ser capaz de crecer a 50 °C. Todas ellas fueron consideradas bacterias mesófilas.

- El crecimiento en el intervalo de pH de B410 fue de 6,48 a 9,33 y, por lo tanto, se consideró cepa neutrófila, lo mismo para las cepas B2525 y DSM 25387. B145, B149, B1203, DSM 17723 crecieron de 6,48 a 7,03 y estas cepas también se consideraron bacterias neutrófilas. B2399 y B2309 no crecieron en estas condiciones de ensayo. En este ensayo, DSM 160303 sólo creció a 9,33 considerándose alcalófila.

- B410 fue la única cepa probada capaz de crecer del 0 % al 10 % de NaCl y se consideró una cepa halotolerante. Su intervalo óptimo de salinidad de cultivo fue del 1,25 % al 3,75 %. El crecimiento del intervalo de salinidad de B2399, B145, B149, B1203 y DSM 17723 fue más limitado, tanto como del 0 % al 3,75 % siendo todas ellas bacterias no halotolerantes. Cabe mencionar que B145, B149 y DSM 17723 no crecieron al 0 % de NaCl porque necesitaban algo de NaCl para crecer. B2309, B2525, DSM 25387 y DSM 16303 no crecieron en estas condiciones de ensayo.

- B410 fue productor de biopelículas, lo mismo que las cepas B2309, B2525, B149, DSM 17723, DSM 25387 y DSM 16303. B2525 y DSM 25387 fueron productores muy altos de biopelículas.

- A pesar de que los aislados de *Bacillus* de este estudio procedían de especies cercanas, cada cepa evaluada resultó ser diferente entre sí, lo que explicó por qué las condiciones de crecimiento eran diferentes. Al observar los resultados globalmente, por un lado, se pudo ver que B410, B145, B149, B1203 y DSM 17723 habían crecido en todas las condiciones del ensayo y, por lo tanto, podrían haberse evaluado todos los parámetros de este estudio para estas cepas. Sin embargo, por otra parte, B2309, B2525, DSM 25387 y DSM 16303 presentaron problemas de crecimiento en algunas condiciones de ensayo. Cada cepa era diferente entre sí porque los resultados globales de ninguna cepa coincidían con los de otra.

- 60 B410 se describió como cepa mesófila, neutrófila, halotolerante y formadora de biopelículas. Los ensayos realizados demostraron que la cepa B410 se diferenciaba de otras cepas probadas por su alta tolerancia al NaCl y porque era capaz de crecer en todas las condiciones de ensayo.

Tabla 1 (a). Caracterización de resultados globales de cada aislado de *Bacillus*.

Cepa	Intervalo de temperatura (°C)	Intervalo de pH	Intervalo de salinidad (%)	Intervalo de salinidad óptima (%)	Biopelícula relativa
B410	4-45	6,48-9,33	0-10	1,25-3,75	0,22
B2399	4-45	Sin crecimiento	0-2,5	0,65	0
B2309	4-45	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	0,16
B2525	4-45	6,48-9,33	Sin crecimiento	Sin crecimiento	3,08
B145	4-45	6,48-7,03	0,65-1,25	0,65	0,03
B149	4-45	6,48-7,03	0,65	0,65	0,25
B1203	4-45	6,48-7,03	0-3,75	0-0,47	0
DSM 17723	4-50	6,48-7,03	1,25-3,75	1,88	0,34
DSM 25387	4-45	6,48-9,33	Sin crecimiento	Sin crecimiento	1,3
DSM 16303	4-45	9,33	Sin crecimiento	Sin crecimiento	0,89

1.2. Ejemplo

La cepa de la presente invención se caracterizó en términos de sus características bioquímicas.

5

Materiales y métodos

Las cepas usadas eran aisladas de *Bacillus halosaccharovorans* de la colección Futureco Bioscience (B410) y la cepa DSM25387 de la colección Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), como una referencia.

10

Las actividades enzimáticas se determinaron usando API-50CH® (bioMérieux, Madrid, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las bacterias se resuspendieron en medio API® -50 CHL o medio API® 50 CHB/E. La suspensión se usó para llenar los tubos (cúpulas) de las tiras API®. Durante la incubación de las tiras API®, la fermentación se reveló por un cambio de color en el tubo, provocado por la producción de ácido y detectado por el indicador de pH presente en el medio.

15

La actividad oxidasa se midió usando tiras Bactident® Oxidasa (Merk-chemicals) siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad catalasa se midió siguiendo el protocolo descrito en Vashist Hemraj *et al.* 2013 "A review on commonly used biochemical test for bacteria" Innovare Journal of Life Science 1(1): 1-7.

20

Resultados:

De acuerdo con API-50CH®, B410 utilizó los siguientes sustratos como fuente de carbohidratos: glicerol, L-arabinosa, D-xilosa, metil-βD-xilopiranosido, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, L-ramnosa, inositol, D-manitol, metil-αD-manopiranosido, metil-αD-glucopiranosido, N-acetilglucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, D-lactosa, D-melibiosa, D-sacarosa, D-trehalosa, D-melecitosa, D-rafinosa, almidón, glucógeno, gentiobiosia, D-turanosa y D-arabitol. Por otra parte, B410 no utilizó eritritol, D-arabinosa, D-ribosa, L-xilosa, D-adonitol, L-sorbosa, dulcitol, D-sorbitol, inulina, xilitol, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, L-fucosa, L-arabitol, gluconato potásico, 2-cetogluconato potásico y 5-cetogluconato potásico (Tabla 1b).

30

B410 y DSM 25387 produjeron catalasa y oxidasa. En estas pruebas, solo se encontró una diferencia entre B410 y la cepa tipo DSM 25387, concretamente, en la asimilación de metil-αD-manopiranosido.

Tabla 1b. Resultados API-50CH® de B410 y DSM 25387.

35

Pocillo	Ensayo de sustrato para	B410	DSM 25387
0	Control	Negativo	Negativo
1	Glicerol	Positivo	Positivo
2	Eritritol	Negativo	Negativo
3	D-arabinosa	Negativo	Negativo
4	L-arabinosa	Positivo	Positivo
5	D-ribosa	Negativo	Negativo
6	D-xilosa	Positivo	Positivo
7	L-xilosa	Negativo	Negativo
8	D-adonitol	Negativo	Negativo
9	Metil-βD-xilopiranosido	Positivo	Positivo
10	D-galactosa	Positivo	Positivo
11	D-glucosa	Positivo	Positivo

(continuación)

Pocillo	Ensayo de sustrato para	B410	DSM 25387
12	D-fructosa	Positivo	Positivo
13	D-manosa	Positivo	Positivo
14	L-sorbosa	Negativo	Negativo
15	L-ramnosa	Positivo	Positivo
16	Dulcitol	Negativo	Negativo
17	Inositol	Positivo	Positivo
18	D-manitol	Positivo	Positivo
19	D-sorbitol	Negativo	Negativo
20	Metil- α D-manopiranosido	Positivo	Negativo
21	Metil- α D-glucopiranosido	Positivo	Positivo
22	N-acetilglucosamina	Positivo	Positivo
23	Amigdalina	Positivo	Positivo
24	Arbutina	Positivo	Positivo
25	Esculina, citrato férrico	Positivo	Positivo
26	Salicina	Positivo	Positivo
27	D-celobiosa	Positivo	Positivo
28	D-maltosa	Positivo	Positivo
29	D-lactosa (origen bovino)	Positivo	Positivo
30	D-melibiosa	Positivo	Positivo
31	D-sacarosa (sacarosa)	Positivo	Positivo
32	D-trehalosa	Positivo	Positivo
33	Inulina	Negativo	Negativo
34	D-melecitosa	Positivo	Positivo
35	D-rafinosa	Positivo	Positivo
36	Amidón (almidón)	Positivo	Positivo
37	Glucógeno	Positivo	Positivo
38	Xilitol	Negativo	Negativo
39	Gentiobiosa	Positivo	Positivo
40	D-Turanosa	Positivo	Positivo
41	D-lixosa	Negativo	Negativo
42	D-tagatosa	Negativo	Negativo
43	D-fucosa	Negativo	Negativo
44	L-fucosa	Negativo	Negativo
45	D-arabitol	Positivo	Positivo
46	L-arabitol	Negativo	Negativo
47	Gluconato potásico	Negativo	Negativo
48	2-Cetogluconato potásico	Negativo	Negativo
49	5-Cetogluconato potásico	Negativo	Negativo

Ejemplo 2. Actividad nematocida *in vitro* de la cepa B410 de *Bacillus halosaccharovorans* contra los huevos de los "nematodos del nudo de la raíz"

5

La actividad nematocida *in vitro* de la cepa B410 de *Bacillus halosaccharovorans* contra huevos del nematodo del nudo de la raíz (RKN) *M. javanica* y huevos de *M. incognita* se realizó y se comparó con dos productos químicos de referencia: NemaCur® (ejemplo 2.1.) o Vydate® (ejemplo 2.2.).

10 Materiales y métodos

Las pruebas se realizaron en la oscuridad para imitar las condiciones del suelo en una incubadora (INCUBIG 288L 2000237, JP Selecta, España). La temperatura de incubación fue de 26 °C.

- 15 La capacidad nematocida *in vitro* de la cepa B410 de la bacteria *B. halosaccharovorans* sobre una mezcla de huevos RKN (*M. javanica* y *M. incognita*) (que se obtuvo de un cultivo de tomatera) se evaluó en cámaras de eclosión (placas multipocillos Nunclon™ Surface, Nunc, Dinamarca) en las cuales se añadieron 2 g de arena previamente esterilizada. El sustrato se inoculó después con una suspensión acuosa que contenía 120 huevos de los RKN mencionados anteriormente (60 huevos de cada especie de nematodo). Inmediatamente después, se aplicaron 200 μ l del agente de control biológico *B. halosaccharovorans* cepa B410 a $7,0 \times 10^8$ UFC/ml en el ejemplo 2.1 y a $4,5 \times 10^7$ UFC/ml en el ejemplo 2.2.

- Un control con una sustancia química de referencia en la dosis comercialmente recomendada (NemaCur® aplicado al 0,0125 %, principio activo: Fenamifos al 24 %, Bayer en el ejemplo 2.1. y vydate® aplicado al 0,2 %, principio activo: Oxamilo al 24 %, DuPont en el ejemplo 2.2.) y un control con agua destilada estéril (para establecer una referencia para comparar los resultados con el porcentaje de eclosión normal) se incluyeron.

La cámara de eclosión se incubó a 26 °C durante 3 semanas y se realizaron lecturas periódicas a los 7, 14 y 21 días después de aplicar el agente de control biológico para determinar el porcentaje de eclosión (los recuentos se realizaron mediante una cámara Hawksley®; microscopio OPTECH BIOSTAR B4, Optech Optical Technology, Alemania). Se realizaron seis repeticiones de cada tratamiento.

Resultados:

Ejemplo 2.1.: Comparación con Fenamifos:

Los huevos de *M. javanica* y *M. incognita* tratados con la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* mostraron una reducción significativa en la eclosión de huevos con respecto al control (Figura 1).

Tres semanas después de aplicar los diferentes tratamientos, el 27,38 % de los huevos no tratados (control) eclosionaron, mientras que el 5,68 % de los tratados con la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* eclosionaron y el 2,50 % de los tratados con Nematicur® (producto químico de referencia) eclosionaron. El día 21 después del tratamiento la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* alcanzó un 79,25 % de eficacia en la reducción de la eclosión respecto al control en condiciones *in vitro*. La eficacia para reducir la eclosión fue similar (no hubo diferencias estadísticamente significativas) a la del producto químico de referencia, que tuvo una eficacia en la reducción de la eclosión del 90,86 %.

Ejemplo 2.2.: Comparación con Oxamilo:

Los huevos de *M. javanica* y *M. incognita* tratados con la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* mostraron una reducción significativa en la eclosión con respecto al control (Figura 2).

Tres semanas después de aplicar los diferentes tratamientos, el 34,74 % de los huevos no tratados (control) eclosionaron, mientras que el 3,43 % de los tratados con la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* eclosionaron y el 21,84 % de los tratados con Vydate® (producto químico de referencia) eclosionaron. Por lo tanto, La cepa B410 de *B. halosaccharovorans* alcanzó un 90,13 % de eficacia en la reducción de la eclosión respecto al control en condiciones *in vitro*, mientras que en el producto químico de referencia, la eficacia para reducir la eclosión fue significativamente mucho menor (37,13 %).

Ejemplo 3: Actividad nematocida *in vitro* de la cepa B410 de *Bacillus halosaccharovorans* contra juveniles (J2) de RKN

La capacidad nematocida *in vitro* de la bacteria *B. halosaccharovorans* cepa B410 se evaluó frente a una mezcla de juveniles de RKN *M. javanica* y *M. incognita* (juveniles infecciosos en estadio J2).

Materiales y métodos:

Las pruebas se realizaron en la oscuridad para imitar las condiciones del suelo en una incubadora (INCUBIG 288L 2000237, JP Selecta, España). La temperatura de incubación fue de 26 °C. La mezcla de juveniles de RKN *M. javanica* y *M. incognita* (estadio de juveniles infecciosos, J2) procedieron de un cultivo en una tomatera y se colocaron en cámaras de eclosión (placas multipocillos Nunclon™ Surface, Nunc, Dinamarca), en las cuales se añadieron 2 g de suelo previamente esterilizado.

Se suministró una suspensión acuosa que contiene una mezcla de 200 formas juveniles de *M. javanica* + *M. incognita* (100 nematodos de cada especie) y después se aplicaron 200 µl del agente de control biológico, la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* a $4,5 \times 10^7$ UFC/ml. Se realizaron cuatro repeticiones de cada tratamiento.

La cámara de eclosión se incubó a 26 °C durante 14 días y se realizaron recuentos mediante la cámara Hawksley® a los 7 días y 14 días para determinar el número de juveniles vivos (% de supervivencia) (microscopio OPTECH BIOSTAR B4, Optech Optical Technology, Alemania). Se incluyeron un control negativo con agua destilada estéril y un producto químico de referencia en dosis comercial (Vydate® aplicado al 0,2 %, principio activo: Oxamilo al 24 %, DuPont).

Resultados:

Los juveniles de RKN tratados con la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* mostraron una reducción significativa en la supervivencia de los juveniles con respecto al control cuando se aplicó a dosis de $4,5 \times 10^7$ ufc/ml (Figura 3).

Dos semanas después de aplicar los diferentes tratamientos, el 87,45 % de los juveniles (control negativo) sobrevivieron, considerando que el 0 % de los tratados con la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* aplicada a $4,5 \times 10^7$ UFC/ml sobrevivió y el 3,55 % de los tratados con el producto químico de referencia sobrevivió. Por lo tanto, la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* alcanzó el 100 % de eficacia en reducir la supervivencia de juveniles respecto

al control en condiciones *in vitro* mientras que la eficacia del tratamiento químico fue de aproximadamente el 97,45 %. No hubo diferencias estadísticas entre la eficacia alcanzada por el microorganismo objeto de la presente invención y el producto químico de referencia.

5 Ejemplo 4: Actividad nematocida *in vitro* de *Bacillus halosaccharovorans* cepa B410 contra huevos de "Nematodos del quiste de la patata" *Globodera rostochiensis* y *G. pallida*

Se evaluó la actividad nematocida *in vitro* de la bacteria *B. halosaccharovorans* cepa B410 en huevos de nematodos del quiste de la patata (PCN) *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida*.

10 Materiales y métodos

Las pruebas se realizaron en la oscuridad para imitar las condiciones del suelo en una incubadora (INCUBIG 288L 2000237, JP Selecta, España). La temperatura de incubación fue de 26 °C. Se usaron cámaras de eclosión (placas multipocillos de superficie Nunclon™, Nunc, Dinamarca) en las cuales se añadieron 2 g de arena previamente esterilizada.

Los quistes de *Globodera* se obtuvieron de un suelo infestado usando una lata Fenwick (método de flotación). Los quistes se desinfectaron con lejía al 2 % durante 2 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril. Después los quistes se trituraron mecánicamente para liberar los huevos de *Globodera* del interior. En el ejemplo 4.1, la prueba *in vitro* consistió en dos tratamientos con 4 repeticiones cada uno: 1) Huevos de control; 2) Huevos tratados con la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* (aplicada a $6,2 \times 10^7$ UFC/ml). En el ejemplo 4.2, la prueba *in vitro* consistió en tres tratamientos con 4 repeticiones cada uno: 1) Huevos de control; 2) Huevos tratados con la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* (a $7,0 \times 10^7$ UFC/ml) aplicado como TGAI y 3) Control de producto químico (Vydate®, Oxamilo al 24 %, DuPont), aplicado a la dosis comercial al 0,2 %.

Trescientos huevos de una mezcla de PCN (150 de *G. pallida* y 150 de *G. rostochiensis* de una población denominada GGAL-1701 aislada de un campo comercial de patatas en Galicia, España) se colocaron en cada pocillo del Ejemplo 4.1. Por otra parte, en el Ejemplo 4.2 doscientos cincuenta huevos de *G. rostochiensis* (población denominada GPRA-1803 aislada de un campo comercial de patatas en Cataluña, España) se vertieron en cada pocillo. A continuación, en ambos ejemplos se añadieron 4,5 ml de solución de Difusión de raíz de patata (PRD) al 10 % por pocillo para inducir la eclosión de los huevos.

Para preparar el PRD, se sembraron brotes de patata variedad Kennebec en bandejas que contenían sustrato estéril (turba/vermiculita; 1/1, v/v). Las patatas germinadas se dejaron en una cámara climática durante 3 semanas. Después se sumergieron raíces de plantas de tres semanas de edad en agua destilada estéril durante 24 horas a 25 °C. Después de 24 horas, el agua destilada que había estado en contacto con las raíces se centrifugó (4000 rpm, 15 minutos), se filtró (22 µm) y se almacenó en el congelador hasta necesitarla.

Una vez se añadió el PRD, se añadió una solución de la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* con una concentración de $6,2 \times 10^7$ UFC/ml (ejemplo 4.1) o $7,0 \times 10^7$ UFC/ml (ejemplo 4.2) (200 µl/pocillo). Las cámaras de eclosión se mantuvieron a 26 °C durante todo el período de evaluación. Se tomaron lecturas de prueba a los 14, 28 y 35 días (usando una cámara Hawksley®) y se añadió 1 ml de PRD nuevo al 10 % cada semana.

45 Resultados:

Los huevos de PCN tratados con la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* mostraron una reducción significativa de la eclosión con respecto al control cuando se aplicó (figura 4, ejemplo 4.1; y figura 5, ejemplo 4.2) y con respecto al producto químico de referencia (figura 5).

50 Ejemplo 5: Actividad nematocida *in vivo* de la cepa B410 de *Bacillus halosaccharovorans* contra los "nematodos del nudo de la raíz" (*Meloidogyne javanica* y *M. incognita*)

Se realizaron tres ejemplos usando la cepa B410 de *B. halosaccharovorans*: como "sedimento" (ejemplo 5.1), como TGAI (ejemplo 5.2) y como prototipo formulado (ejemplo 5.3). Los resultados de todos ellos se presentan al final de esta sección.

Materiales y métodos

60 5.1 Actividad nematocida *in vivo* de un "sedimento" de la cepa B410 de *B. halosaccharovorans*

La capacidad nematocida *in vivo* de la bacteria *B. halosaccharovorans* cepa B410 se evaluó en dos experimentos en un invernadero: el ejemplo 5.1.1 (contra *M. javanica* + *M. incognita*) y el ejemplo 5.1.2 (contra *M. javanica*). En ambos experimentos, las plantas se instalaron en un invernadero (temperatura 22±2 °C, humedad relativa HR: 50±10) durante 39 días desde la primera aplicación de la bacteria *B. halosaccharovorans* cepa B410.

El diseño experimental estuvo compuesto por dos tratamientos diferentes: 1) Control con plantas no tratadas; 2) Plantas tratadas con una suspensión de la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* aplicada como "sedimento". Cada tratamiento consistió en 3 réplicas con 3 plantas por réplica.

5

El sedimento se obtuvieron como sigue: Se descongeló 1 ml de una muestra congelada del criovial de la cepa B410 (-80 °C) y se cultivó en caldo de soja triptico (TSB) en un matraz de 100 ml durante 3 días aproximadamente, a 30 °C. Se centrifugó y ese "sedimento" que quedó (el microorganismo como tal) se probó en el ensayo.

- 10 Se trasplantaron veintisiete plántulas de tomatera (variedad "Durinta") de 3-4 semanas de edad en macetas de 3000 cm³ rellenas con un sustrato que consistía en una mezcla de arena y perlita (3:1; volumen:volumen). Un tercio de las plantas se trataron con 10 ml de una solución acuosa que contenía la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* a una dosis de 1,04x10⁶ UFC/ml (ejemplo 5.1.1.) o 7,1x10⁷ UFC/ml (ejemplo 5.1.2) tres días antes del trasplante (tratamiento preventivo). Un día después del trasplante, todas las tomateras se inocularon con una suspensión acuosa con nematodos del nudo de la raíz, en el ejemplo 5.1.1 con *M. javanica* + *M. incognita* (a una dosis de 100 juveniles infecciosos por 100 cm³ de sustrato, una mezcla del 50 % de cada especie obtenida de una tomatera) y en el ejemplo 5.1.2 con *M. javanica* (a una dosis de 100 juveniles infecciosos por 100 cm³ del sustrato). A continuación, se aplicaron 20 ml de una solución acuosa que contenía la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* al mismo tercio de las plantas 7 días después de la inoculación con los nematodos (7 DAI) a una dosis de 1,16x10⁸ UFC/ml (ejemplo 5.1.1) u 8,9x10⁵ UFC/ml (ejemplo 5.1.2) y 35 DAI a una dosis de 1,89x10⁶ UFC/ml (ejemplo 5.1.1) o 4,1x10⁶ UFC/ml (ejemplo 5.1.2) (véase la tabla 2 para ver un esquema de los ejemplos 5.1.1 y 5.1.2).

Tabla 2: Pruebas en invernadero *in vivo* contra RKN en tomateras en donde se aplicó la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* ("sedimento")

	Día 0	Día 3	Día 4	Día 11	Día 39
	1ª Aplicación (A, preventiva)	Trasplante	Inoculación de nematodos	2ª Aplicación (B, curativa)	3ª Aplicación (C, curativa)
Ejemplo 5.1.1 B410 (UFC/ml)	1,04x10 ⁶		<i>M. javanica</i> + <i>M. incognita</i>	1,16x10 ⁸	1,89x10 ⁶
Ejemplo 5.1.2 B410 (UFC/ml)	7,1x10 ⁷		<i>M. javanica</i>	8,9x10 ⁵	4,1x10 ⁶

25

5.2: Actividad nematocida *in vivo* de TGA1 de la cepa B410 de *Bacillus halosaccharovorans*

La capacidad nematocida *in vivo* de la bacteria *B. halosaccharovorans* cepa B410 se evaluó en dos experimentos: ejemplo 5.2.1 y ejemplo 5.2.2 (como se explica a continuación).

30

El diseño experimental estuvo compuesto por tres tratamientos diferentes: 1) Control con plantas no tratadas; 2) Plantas tratadas con una suspensión de la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* aplicada como "Principio activo de calidad técnica" ("TGA1" que consiste en 30 % de células y 70 % de sacarosa) en una dosis (en promedio) de aproximadamente 10⁷ UFC/ml (TGA1-10⁷). 3) Plantas tratadas con una suspensión de la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* aplicada como TGA1 en una dosis (en promedio) de aproximadamente 10⁶ UFC/ml (TGA1-10⁶). Cada tratamiento consistió en 3 réplicas con 3 plantas por réplica.

35

Se trasplantaron veintisiete plántulas de tomatera (variedad "Durinta") de 3-4 semanas de edad en macetas de 3000 cm³ rellenas con un sustrato que consistía en una mezcla de arena y (3:1; volumen:volumen). Un día después del trasplante, todas las tomateras se inocularon con una suspensión acuosa con mezcla de nematodos del nudo de la raíz, *M. javanica* + *M. incognita* (a una dosis de 100 juveniles infecciosos por 100 cm³ de sustrato). Era una mezcla de dichos nematodos, 50 % de *M. javanica* (población AL05) más el 50 % de *M. incognita* (población AL09); las dos poblaciones se aislaron de Almería, España (por IFAPA). Había 3 conjuntos diferentes de plantas:

5.2.1 Ejemplo:

Un tercio de las plantas no se trataron (plantas de control sin cepa B410).

Otro tercio de las plantas se trató una vez con 10 ml de una solución acuosa que contenía la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* a dosis de 1,30x10⁷ UFC/ml tres días antes del trasplante (tratamiento preventivo). A continuación, se aplicaron 20 ml de una solución acuosa que contenía la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* al mismo tercio de las plantas 7 días después de la inoculación con los nematodos (7 DAI) a una dosis de 4,90x10⁷ UFC/ml, 1,57x10⁷ UFC/ml a 21 DAI y 6,00x10⁷ UFC/ml a 35 DAI.

55 Y un último tercio de las plantas se trató una vez con 10 ml de una solución acuosa que contenía la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* a una dosis de 2,16x10⁶ UFC/ml tres días antes del trasplante (tratamiento preventivo). A continuación, se aplicaron 20 ml de una solución acuosa que contenía la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* al mismo tercio de las plantas 7 días después de la inoculación con los nematodos (7 DAI) a una dosis de

4,40x10⁶ UFC/ml, 1,75x10⁶ UFC/ml a 21 DAI y 4,30x10⁶ UFC/ml a 35 DAI.

5.2.2 Ejemplo:

- 5 Un tercio de las plantas no se trataron (plantas de control sin cepa B410).

Otro tercio de las plantas se trató una vez con 10 ml de una solución acuosa que contenía la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* a dosis de 1,36x10⁸ UFC/ml tres días antes del trasplante (tratamiento preventivo). A continuación, se aplicaron 20 ml de una solución acuosa que contenía la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* al mismo tercio de las plantas 7 días después de la inoculación con los nematodos (7 DAI) a una dosis de 3,36x10⁷ UFC/ml, 5,40x10⁷ UFC/ml a 21 DAI y 6,60x10⁷ UFC/ml a 35 DAI.

Y un último tercio de las plantas se trató una vez con 10 ml de una solución acuosa que contenía la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* a una dosis de 1,76x10⁷ UFC/ml tres días antes del trasplante (tratamiento preventivo). A continuación, se aplicaron 20 ml de una solución acuosa que contenía la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* al mismo tercio de las plantas 7 días después de la inoculación con los nematodos (7 DAI) a una dosis de 2,60x10⁶ UFC/ml, 4,10x10⁶ UFC/ml a 21 DAI y 7,60x10⁶ UFC/ml a 35 DAI.

Tabla 3. Esquemas de los tratamientos realizados usando la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* aplicación en planta en pruebas de invernadero *in vivo* contra *Nematodos del nudo de la raíz (RKN)* en tomatas

	Día 0	Día 3	Día 4	Día 11	Día 25	Día 39
	1ª aplicación (A, preventiva)	trasplante	inoculación de nematodos	2ª aplicación (B, curativa)	3ª aplicación (C, curativa)	4ª aplicación (D, curativa)
Experimento 5.2.1.	1,30x10 ⁷		<i>M. javanica</i> + <i>M. incognita</i>	4,90x10 ⁷	1,57x10 ⁷	6,00x10 ⁷
	2,16x10 ⁶		<i>M. javanica</i> + <i>M. incognita</i>	4,40x10 ⁵	1,75x10 ⁵	4,30x10 ⁵
Experimento 5.2.2.	1,36x10 ⁸		<i>M. javanica</i> + <i>M. incognita</i>	3,36x10 ⁷	5,40x10 ⁷	6,60x10 ⁷
	1,76x10 ⁷		<i>M. javanica</i> + <i>M. incognita</i>	2,60x10 ⁵	4,10x10 ⁵	7,60x10 ⁵

5.3: Actividad nematocida *in vivo* de "Prototipos formulados" de la cepa B410 de *Bacillus halosaccharovorans*

La capacidad nematocida *in vivo* de una formulación nematocida basada en la bacteria *B. halosaccharovorans* cepa B410 se evaluó en dos experimentos, ejemplo 5.3.1 y ejemplo 5.3.2 ambos contra una mezcla de *M. javanica* y *M. incognita* (obtenido de una tomatera).

Materiales y métodos

El diseño experimental estuvo compuesto por dos tratamientos diferentes: 1) Control con plantas no tratadas; 2) Plantas tratadas con una suspensión de la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* aplicada como una "formulación" (OD) a una dosis (en promedio) 3,36x10⁷ ufc/ml (Formulación-10⁷) en el ejemplo 5.3.1 o 2,61x10⁷ ufc/ml (Formulación-10⁷) en el ejemplo 5.3.2. Ambos tratamientos consistieron en 3 réplicas con 3 plantas por réplica.

Se trasplantaron dieciocho plántulas de tomatera (variedad "Durinta") de 3-4 semanas de edad en macetas de 3000 cm³ rellenas con un sustrato que consistía en una mezcla de arena y perlita (3:1; volumen:volumen). Un día después del trasplante, todas las tomatas se inocularon con una suspensión acuosa con nematodos del nudo de la raíz, *M. javanica* + *M. incognita* (a una dosis de aproximadamente 100 juveniles infecciosos por 100 cm³ de sustrato) en el ejemplo 5.3.1 o *M. javanica* (a una dosis de aproximadamente 100 juveniles infecciosos por 100 cm³ de sustrato) en el ejemplo 5.3.2. Había dos conjuntos diferentes de plantas:

La mitad de las plantas no se trataron (plantas de control). La otra mitad de las plantas se trató una vez con 20 ml de una solución acuosa que contenía 1 % de una formulación basada en la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* a una dosis de 2,92x10⁷ UFC/ml (ejemplo 5.3.1) o 2,64x10⁷ (ejemplo 5.3.2) el día del trasplante (tratamiento preventivo). A continuación, 20 ml de una solución acuosa que contenía el 1 % de la formulación basada en la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* se aplicaron a la misma mitad de las plantas 7 días después de la inoculación con los nematodos (7 DAI) a una dosis de 3,60x10⁷ UFC/ml (ejemplo 5.3.1) o 4,20x10⁷ (ejemplo 5.3.2); 3,30x10⁷ UFC/ml (ejemplo 5.3.1) o 1,80x10⁷ UFC/ml (ejemplo 5.3.2) a 21 DAI; y 3,60x10⁷ UFC/ml (ejemplo 5.3.1) o 1,80x10⁷ UFC/ml (ejemplo 5.3.2) a 35 DAI. Véase la tabla 4 para ver un esquema de los ejemplos 5.3.1 y 5.3.2.

La formulación consistió en una mezcla de: aceite vegetal de soja (Gustave Hess, Alemania) 690 g/l + Sílice (Silysiamont, Italia) (10 g/l) + Éster de ácido graso etoxilado (Lamberti-Chemical Specialist, Italia) (200 g/l) + TGAI (cepa de la invención) (100 g/l). Los materiales se mezclaron en un reactor de laboratorio usando un agitador de alta

velocidad diseñado para aceites.

Tabla 4: Formulación basada en la aplicación en planta de la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* en una prueba en invernadero *in vivo* contra RKN en tomatas

	Día 1	Día 2	Día 9	Día 23	Día 37
	Trasplante + 1ª Aplicación (A, preventiva)	Inoculación de nematodos	2ª Aplicación (B, curativa)	3ª Aplicación (C, curativa)	4ª Aplicación (D, curativa)
Ejemplo 5.3.1	2,92x10 ⁷	<i>M. javanica</i> + <i>M. incognita</i>	3,60x10 ⁷	3,30x10 ⁷	3,60x10 ⁷
Ejemplo 5.3.2	2,64x10 ⁷	<i>M. javanica</i>	4,20x10 ⁷	1,80x10 ⁷	1,80x10 ⁷

5

En todos los casos, las plantas se instalaron en un invernadero; en el ejemplo 5.1: temperatura (T): 22±2 °C - Humedad relativa (HR): 50±10 durante 10 semanas desde que se trasplantaron las plántulas; en los ejemplos 5.2 y 5.3, T: 25±2 - HR: 50±10) durante 9 semanas desde que se trasplantaron las plántulas.

10 Para todos los experimentos (experimentos 5.1, 5.2 y 5.3) al final del bioensayo se determinó el número total de huevos por planta y huevos por gramo de raíz en cada tratamiento: se extrajeron del sistema radicular mediante disrupción mecánica y se pasaron por diferentes tamices desde malla 200 (75 µm) hasta malla 500 (25 µm) (los recuentos se realizaron mediante cámara Hawksley®; microscopio Optech biostar B4, Optech Optical Technology, Alemania).

15 Pf en medias de número de huevos/planta y La reproducción de nematodos (huevos/gramo de raíz fresca) se evaluó en todos los tratamientos 10 o 9 semanas después del trasplante (10 semanas en el caso del "sedimento" y 9 semanas en el caso del formulación TGAi y OD).

En todos los casos después de los tratamientos realizados, los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) usando el software R (R Core Team, 2013, Austria). Las diferencias significativas entre tratamientos se determinaron mediante la prueba de Diferencia Mínima Significativa (LSD) a P≤0,05.

Resultados de los experimentos *in vivo* usando sedimento, formulación TGAi y DO:

25 Los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* mostraron que la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* aplicada como un sedimento, como un TGAi o en una formulación con una DO del 1 % tenía actividad nematocida contra RKN, mostraron una reducción significativa en ambos parámetros con respecto al control en todos los casos (véase la tabla 5 a continuación).

30 Tabla 5. Eficacia (%) de TGAi de la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* contra RKN en tomatas en invernadero corregida respecto al control usado como referencia.

Ejemplos y tratamientos	Eficacia (%) sobre la población final (P _F)(huevos/planta)	Eficacia (%) sobre la reproducción (huevos/g de raíz fresca)
5.1.1; sedimento	57,32	76,21
5.1.2; sedimento	58,11	60,69
5.2.1; TGAi de la cepa B410 10 ⁷	76,95	61,58
5.2.1; TGAi de la cepa B410 10 ⁶	34,24	29,42
5.2.2; TGAi de la cepa B410 10 ⁷	56,01	51,64
5.2.2; TGAi de la cepa B410 10 ⁶	35,10	32,01
5.3.1; Formulación DO de la cepa B410 10 ⁷	46,42	41,77
5.3.2; Formulación DO de la cepa B410 10 ⁷	54,89	48,83

En el caso del TGAi, el % de eficacia fue significativamente mayor (sobre Población Final y sobre Reproducción) en las plantas tratadas con TGAi de la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* 10⁷ en comparación con las plantas tratadas con una dosis más baja (TGAi de la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* 10⁶).

Ejemplo 6: estudio de laboratorio de la eficacia insecticida de la cepa B410 de *Bacillus halosaccharovorans* contra pulgones

40 Para determinar la eficacia insecticida de la cepa B410 *B. halosaccharovorans* contra el pulgón del melón de algodón (*Aphis gossypii*) se realizó un estudio de laboratorio.

Materiales y métodos:

El experimento se realizó en las instalaciones de pruebas de i2LResearch Ltd. (Newcastle, RU) en condiciones de laboratorio controladas.

La actividad insecticida de la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* se comparó con la misma actividad en otras cepas bacterianas de Futureco Bioscience Microorganisms Collection. Esos microorganismos fueron los siguientes: B1325 (*Bacillus safensis*), B788 (*Caulobacter* sp / *Caulobacter segnis*), B96 (*Lysinibacillus sphaericus* / *Lysinibacillus fusiformis*) y B1001 (*Bacillus humi*) que se seleccionaron por su potencial efecto insecticida. Los cuatro microorganismos (TGAi) se probaron a una tasa estándar ($5E+07$ UFC/ml, volumen de aplicación de 2 ml). Los productos probados se diluyeron en agua antes del inicio de la prueba y la solución se agitó completamente para asegurar su homogeneidad. También se incluyó un control negativo (solo agua) con fines comparativos. Los tratamientos se aplicaron directamente sobre los insectos en el material vegetal en las dosis especificadas en la siguiente tabla. Cada tratamiento estuvo compuesto por 3 réplicas.

Los insectos (Algodón, pulgones del melón, *Aphis gossypii*) se obtuvieron de un cultivo de laboratorio interno. En los experimentos se usaron adultos de sexo mixto y de edad avanzada.

Las placas de Petri se recubrieron con un disco/fragmento de hoja, cortado de lechuga (*Lactuca sativa*) y montado sobre un disco de algodón húmedo. Se contaron diez pulgones en cada placa de Petri (y se colocaron directamente sobre material vegetal). Luego se pulverizaron el material vegetal y los pulgones con los tratamientos. Los tratamientos se aplicaron usando un pequeño atomizador. Todo el equipo de pulverización se calibró completamente antes de su uso.

Los pulgones se evaluaron a las 48, 96 y 144 horas después del tratamiento. En cada período de observación, los insectos se calificaron de acuerdo con los siguientes criterios:

1. No afectado/saludable: individuo completado no afectado y que muestra un comportamiento normal.
2. Derribo: el individuo no puede realizar movimientos direccionales y/o volar, pero los apéndices se mueven vigorosamente con o sin sondeo.
3. Muerto: sin respuesta a estímulos táctiles.

Las condiciones de aplicación del tratamiento fueron: temperatura, 15,0 °C; humedad (%), no aplicable; y humedad de las hojas, seca.

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando Minitab (versión 16). Los datos de cada evaluación se sometieron a un Análisis de Varianza con el tratamiento como un factor. Posteriormente se usaron pruebas de comparación de Tukey HSD para distinguir entre medias. Antes del análisis se verificaron los datos para garantizar que se cumplieran los supuestos del modelo estadístico. Cuando los datos no estaban distribuidos normalmente, el ANOVA se realizó en el conjunto de datos transformados.

En todos los análisis, la probabilidad de que no se produjeran diferencias significativas entre los tratamientos se calculó como el valor de probabilidad F (p (F)). Todas las pruebas se realizaron con un intervalo de confianza del 95 %.

Resultados:

B410 fue el TGAi de acción más rápida, produce una mortalidad significativa por pulgón 48 horas después de la exposición. Los resultados del ANOVA mostraron que 48 horas después de la exposición a los productos de prueba, B410 fue el único tratamiento que produjo una mortalidad significativa en comparación con el control de agua. Después de 96 horas de exposición, todos los productos proporcionaron una mortalidad significativa de pulgones en comparación con el control de agua (véanse las figuras 6 y 7). Esta tendencia continuó hasta la evaluación final a las 144 horas.

No se registraron efectos fitotóxicos durante la duración del ensayo.

Ejemplo 7: evaluación de la toxicidad oral aguda de *Bacillus halosaccharovorans* en ratones

Materiales y métodos:

Para determinar si la cepa B410 de *B. halosaccharovorans* era segura, se probó su toxicidad oral en ratones.

Materiales y métodos:

Se usaron tres ratones Balb/C machos y tres hembras de 4-5 semanas de edad (ratones albinos QC'd libres de patógenos controlados con control de calidad; Envigo). Los animales ayunaron durante la noche antes de la dosificación. El día antes del experimento, se registró el peso corporal de los animales y se recogieron muestras de heces de animales individuales. Cada animal recibió una dosis única oral de la cepa B410 de *B. halosaccharovorans*: 10^9 UFC B410 TGAi (vehículo 200 μ l de H₂O estéril) (preparado como se describió anteriormente). Los ratones que recibieron agua esterilizada (control de vehículo) también se mantuvieron durante todo el estudio. Los ratones se

alojaron en un ambiente controlado y se monitorizaron durante 21 días y se registraron las observaciones. Diariamente, una vez, se observó lo siguiente para cada animal: piel y pelaje, ojos y membranas mucosas, sistema respiratorio, sistema circulatorio, sistema nervioso autónomo y central, actividad somatomotora, patrón de comportamiento, observación de temblores, convulsiones, diarrea, letargo, salivación y coma si lo hubiera. Se

- 5 comprobaron los pesos de los animales individuales antes y después de la alimentación forzada una vez por semana. La necropsia se realizó al final del día 21 después de la sonda oral para evaluar la presencia o ausencia de la cepa bacteriana en los tejidos. La recolección de tejido y el hemocultivo se realizaron de forma aséptica para evitar cualquier contaminación cruzada.
- 10 Necropsia: el riñón, el cerebro, el hígado, el pulmón, el bazo, la sangre y los ganglios linfáticos intestinales se recogieron de cada animal y se mantuvieron inmediatamente en hielo seco y se almacenaron a -20 °C hasta su posterior procesamiento. Se extrajo ARN de los tejidos anteriores y se realizó RT-PCR para determinar la presencia de B410 TGA1 usando los cebadores específicos: "B neoben F1, F1" 5'-CGGAATCGCTAGTAATCGCG -3' (SEQ ID NO: 4); "B neoben R1", 5'-CCCAATCATCTGTCCACCT -3' (SEQ ID NO: 5); "B neoben F2", 5'-TCGGGTCGTAAAGCTCTGTT -3' (SEQ ID NO: 6); y "B neoben R2", 5'-TTCTGCACTCAAGTTCCCCA -3' (SEQ ID NO: 7). Estos dos pares de cebadores se usaron para garantizar que el producto de amplificación fuera el 16S de *B. halosaccharovorans*.

Procesamiento de sangre: en la necropsia, se recogieron muestras de sangre completa asépticas de cada animal.

- 20 Inmediatamente después de la recolección, se colocaron 100 µl de cada muestra de sangre y se esparcieron en una placa de agar y se mantuvieron a 28 °C durante 120 horas. Las placas se analizaron a intervalos regulares para evaluar cualquier crecimiento bacteriano.

- Eliminación del agente de control de plagas microbianas (MPCA): la recolección de heces en el momento de la dosificación y los días 7, 14 y 21 se mantuvieron a 4 °C para una extracción de ARN adicional y análisis por RT-PCR.

- Medios de cultivo de sangre/bacterias: Se añadieron 1 g de extracto de carne, 2 g de extracto de levadura, 5 g de peptona, 5 g de NaCl y 15 g de agar (para 1000 ml) y se esterilizaron a 121 °C durante 20 min y en lo sucesivo se vertieron en placas y se usaron para el hemocultivo y la determinación de B410 TGA1 CFU/g. Protocolo de extracción de ARN: se usaron 50 mg de tejido para la extracción de ARN siguiendo las instrucciones del fabricante (kit de aislamiento de ARN Zymo Research, N.º de Cat R1050).

- Control de adición: 100 µl de 10⁹ UFC de TGA1 se adicionaron con 50 mg de tejido cerebral y hepático y se extrajo el ARN total usando el kit de extracción de ARN total Quick RNA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Zymo Research) con la adición de Proteinasa K y paso de digestión con lisozima (incluido en el kit mencionado anteriormente) para aislar ARN total incluyendo el ARN bacteriano.

- Control positivo: se diluyeron 0,2 g de B410 TGA1 en serie 7 veces en agua esterilizada y se sembraron en placas (100 µl) y se reconfirmó la muestra de UFC/g. Las colonias bacterianas cultivadas en placas de agar se recogieron y se usaron directamente para la extracción de ARN total y como control positivo para el estudio.

- Síntesis de ADNc: El ARN total de tejidos y heces se midió en un lector de microplacas (Biotek). Se usaron 2 µg de ARN total (1 µg en el caso de muestras de heces) para la síntesis de ADNc usando el kit de síntesis de primera cadena Superscript IV (Life technologies, N.º de Cat: 18091050). También se mantuvieron los controles positivos (B410 TGA1) y negativos (H₂O) apropiados.

- Ensayo de RT-PCR: Se diluyeron 20 µl en total de la mezcla de ADNc 1:10 veces (muestras de tejido) y 1:5 veces (muestras de ADNc de heces) y se realizó RT-PCR usando PowerUp SYBR™ Green Master Mix según las instrucciones del fabricante (Life Technologies, N.º de Cat A25776) con un dispositivo de PCR en tiempo real StepOne™ de Applied Biosystems. Las reacciones de PCR consistieron en 5 µl de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, 0,5 µl de cada cebador específico (F1 y R1, o F2 y R2) y 10 ng de ADNc como plantilla, en un volumen de reacción total de 20 µl. Las condiciones del ciclo térmico fueron como sigue: 2 min a 50 °C, 2 min a 95 °C y 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C y 1 min a 72 °C.

55 Resultados:

- El peso corporal de los animales control y sondados con *B. halosaccharovorans* B410 no fueron significativamente diferentes. Las placas de hemocultivo incubadas durante 120 h a 28 grados no tuvieron crecimiento visible y se concluyó que eran negativas. Los síntomas clínicos monitorizados no revelaron cambios adversos. Los datos de RT-PCR revelaron que los cebadores específicos de ARNr 16s no se amplificaron en ninguna de las muestras de tejido o heces de animales sondados con *B. halosaccharovorans* B410 (valores de Ct promedio 33). Las muestras de tejido enriquecidas con TGA1 B410 *B. halosaccharovorans* se amplificaron usando los cebadores específicos de *B. halosaccharovorans* junto con el control positivo (valor de Ct promedio 20 para el cerebro y 25 para el hígado). Los controles negativos (con sonda de agua) no tuvieron amplificación en RT-PCR (valor de Ct promedio 32). Cebador de ADNr 16s de control positivo amplificado en el ciclo 6 (valor de Ct 12). Los datos revelan ausencia de *B.*

halosaccharovorans B410 en cualquiera de las muestras analizadas usando los cebadores específicos de RT-PCR.

Los animales no tuvieron efectos clínicos adversos visibles y no se encontró infectividad ni patogenicidad. Los animales
sondados con cepa no tuvieron efectos clínicos adversos visibles y la cepa bacteriana no se detectó en la sangre, las
5 heces u otros órganos examinados.

REFERENCIAS CITADAS EN LA SOLICITUD:

WO9404684

10

Xiang N *et al.* "Biological control of *Meloidogyne incognita* by Spore-forming Plant Growth-promoting Rhizobacteria on
Cotton" Plant Disease 2017(101):774-784.

Stoddard SF, *et al.* rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new
15 foundation for future development. Nucleic Acids Res. enero de 2015; 43(Database issue):D593-8

Vashist Hemraj *et al.* 2013 "A review on commonly used biochemical test for bacteria" Innovare Journal of Life Science
1(1): 1-7

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Bacillus halosaccharovorans* depositada en la "Colección Española de Cultivos Tipo" (CECT) con el número de registro CECT9165.
2. Un cultivo bacteriano que comprende la cepa de acuerdo con la reivindicación 1, preferentemente el cultivo bacteriano es un producto de inoculación.
3. Una composición que comprende una cantidad efectiva de la cepa CECT9165 de *Bacillus halosaccharovorans* de acuerdo con la reivindicación 1 o el cultivo bacteriano de acuerdo con la reivindicación 2 y uno o más compuestos agrícola-mente aceptables.
4. La composición de acuerdo con la reivindicación 3 donde la cepa está presente en una concentración de 10^5 UFC/ml a 10^{12} UFC/ml.
5. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4 donde la composición se formula como una formulación de dispersión oleaginoso, que comprende preferentemente un ingrediente oleaginoso, un éster orgánico y sílice.
6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 que comprende al menos un plaguicida adicional.
7. Un proceso para obtener una suspensión celular viable procedente de la cepa CECT9165 de *Bacillus halosaccharovorans* como se define en la reivindicación 1, comprendiendo el proceso: (i) inocular la cepa en un medio de cultivo, (ii) someter el medio de cultivo inoculado de la etapa (i) a condiciones adecuadas para el crecimiento de la cepa y (iii) someter opcionalmente el medio resultante de la etapa (ii) a una etapa de concentración.
8. Uso de la cepa CECT9165 de *Bacillus halosaccharovorans* como se define en la reivindicación 1 para controlar una infección por nematodo y/o pulgón en una planta.
9. Un método para controlar una infección provocada por nematodos y/o pulgones en una planta que comprende aplicar a una parte de una planta o al sustrato usado para cultivar dicha planta la cepa CECT9165 de *Bacillus halosaccharovorans* como se define en la reivindicación 1.
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 8 o el método de acuerdo con la reivindicación 9, donde la cepa aislada se aplica en forma de un cultivo bacteriano o en forma de una composición, la composición comprendiendo además uno o más excipientes agrícola-mente aceptables.
11. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 o 10 o el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, donde: el nematodo se selecciona del género *Meloidogyne* y *Globodera*; o como alternativa, se selecciona del grupo que consiste en *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida*; o como alternativa el pulgón es del género *Aphis*; o, como alternativa, el pulgón es *Aphis gossypii*; o, como alternativa, el nematodo se selecciona del género *Meloidogyne* y el pulgón es del género *Aphis*; o, como alternativa, el nematodo se selecciona del género *Globodera* y el pulgón es del género *Aphis*; o, como alternativa, el nematodo se selecciona del género *Meloidogyne* y el pulgón es *Aphis gossypii*; o, como alternativa, el nematodo se selecciona del género *Globodera* y el pulgón es *Aphis gossypii*; o, como alternativa, el nematodo se selecciona del grupo que consiste en *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* y el pulgón es del género *Aphis*; o, como alternativa, el nematodo se selecciona del grupo que consiste en *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* y el pulgón es *Aphis gossypii*.
12. Un kit que comprende una cantidad efectiva de la cepa como se define en la reivindicación 1, el cultivo bacteriano como se define en la reivindicación 2 o la composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 3-6.
13. Uso del kit de acuerdo con la reivindicación 12 para controlar una infección provocada por nematodos y/o pulgones en una planta.

FIG.1

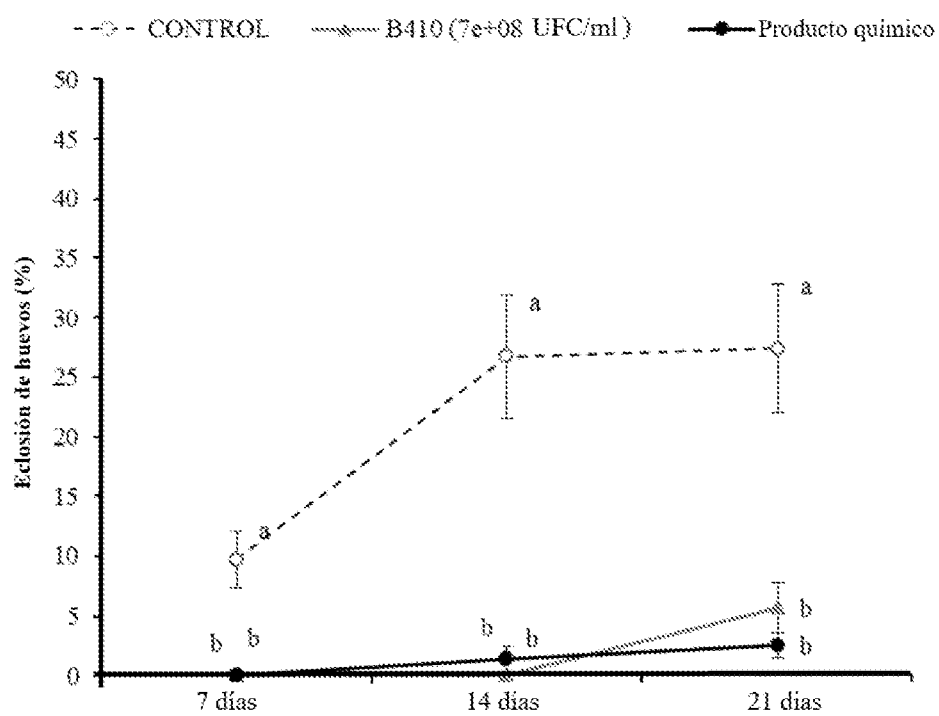


FIG. 2

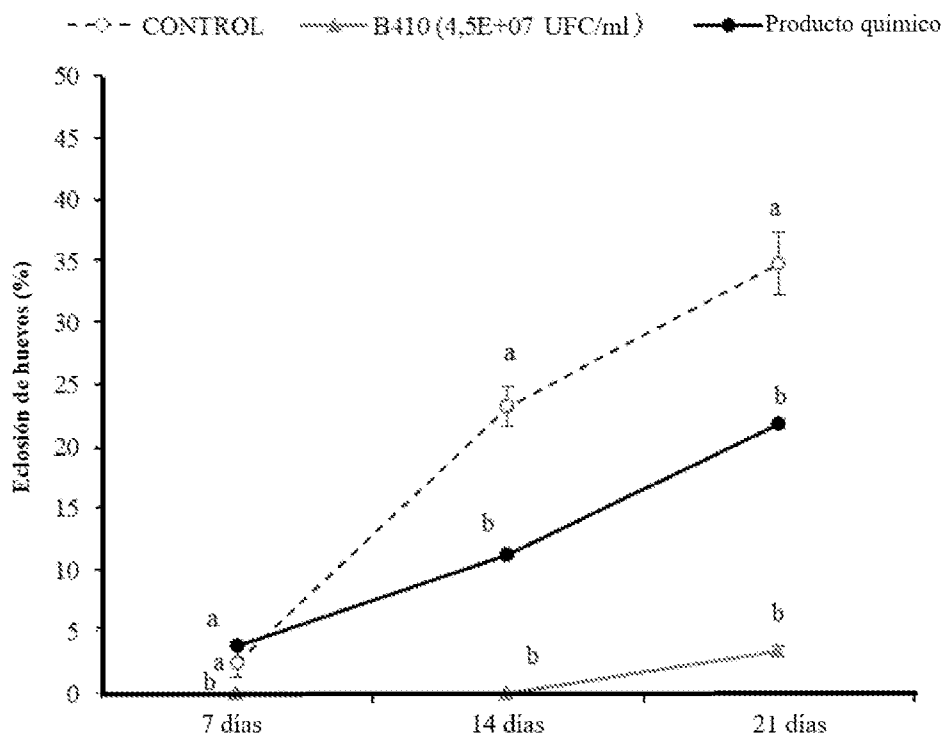


FIG. 3

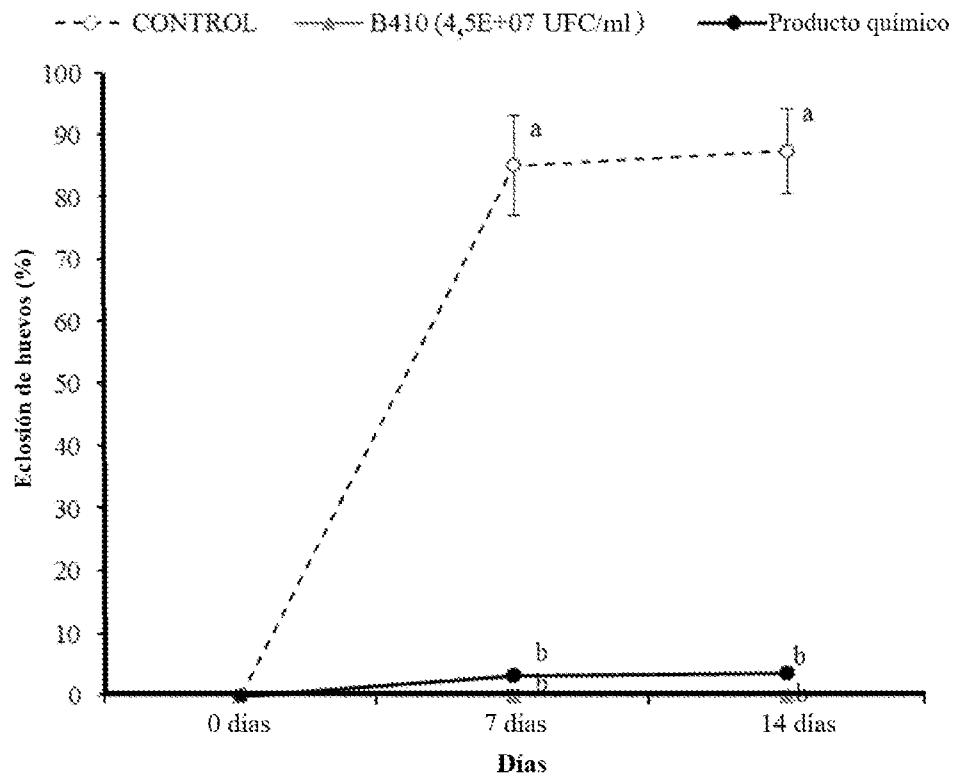


FIG. 4

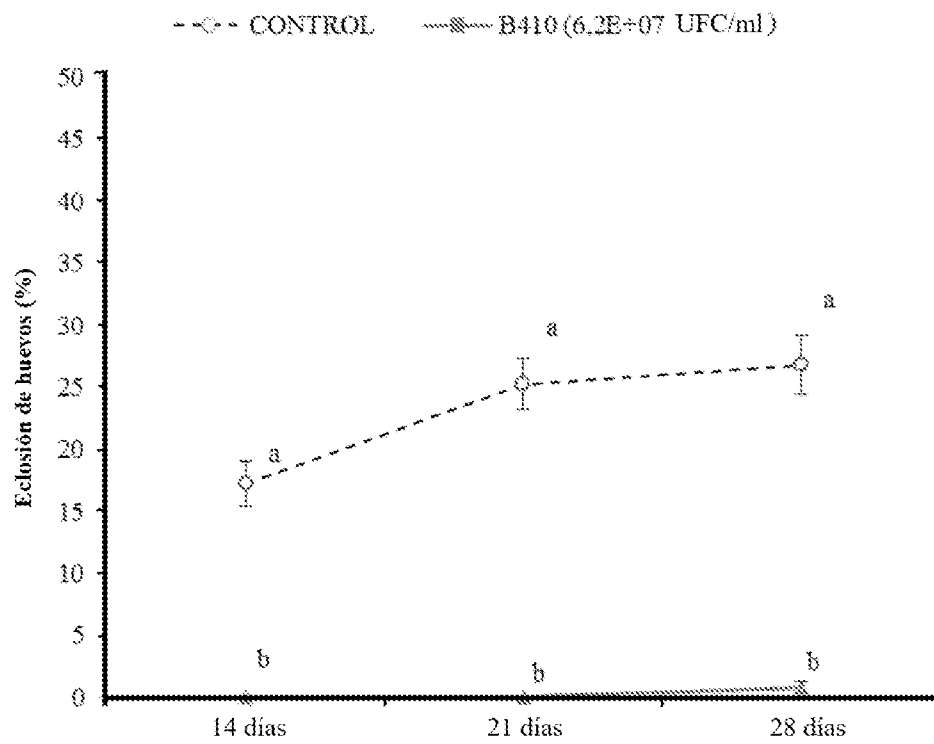


FIG. 5

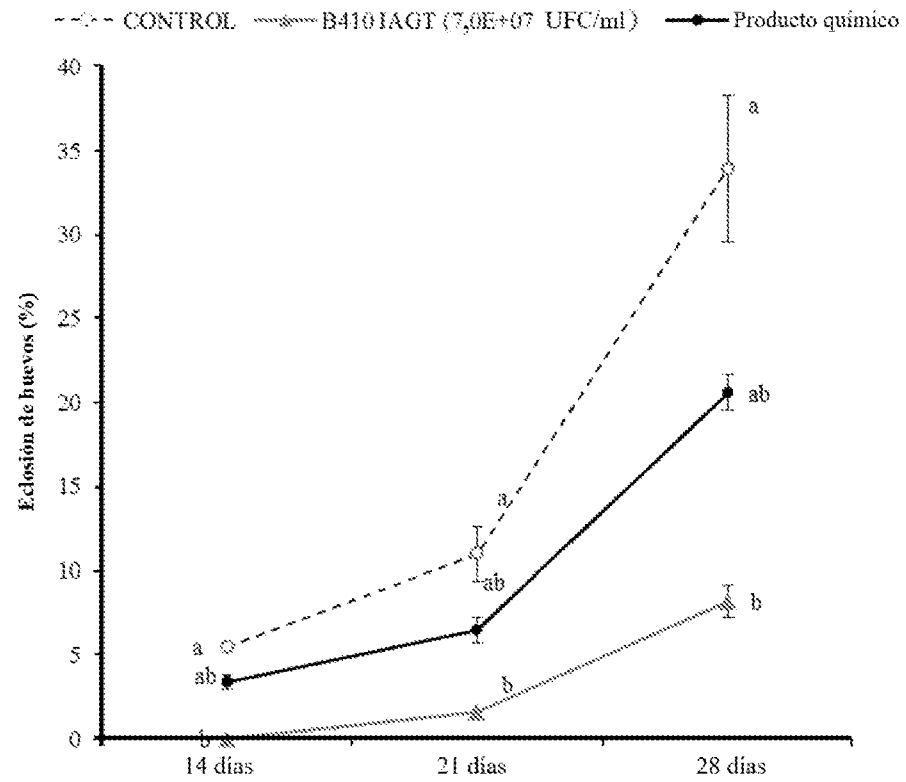


FIG. 6

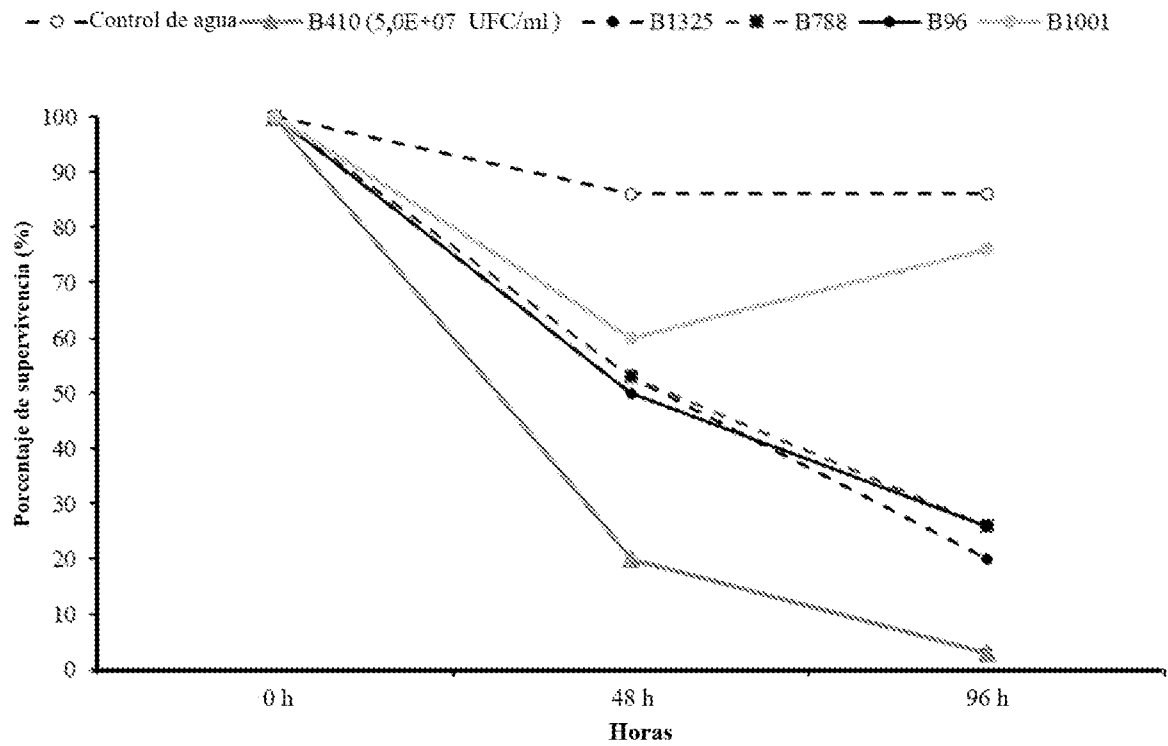


FIG. 7

