

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 940 245**

51 Int. Cl.:

**A01N 63/22** (2010.01)

**A01P 21/00** (2006.01)

**C12R 1/07** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2018** **E 18382861 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2023** **EP 3659440**

54 Título: **Microorganismos promotores del crecimiento vegetal y enzimas para los ciclos biogénicos del suelo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.05.2023**

73 Titular/es:

**BIO-ILIBERIS RESEARCH AND DEVELOPMENT  
S.L. (100.0%)  
Claudio Coello 125, 5º Izqda  
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**ROCA HERNÁNDEZ, AMALIA y  
PIZARRO TOBIÁS, PALOMA**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones:**

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

ES 2 940 245 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

Microorganismos promotores del crecimiento vegetal y enzimas para los ciclos biogénicos del suelo

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de las cepas microbiológicas que tienen la capacidad de promover la resistencia de las plantas a al menos un fitopatógeno, para producir al menos un compuesto estimulante del crecimiento vegetal y/o para solubilizar fosfato y/o hierro insolubles, y a sus aplicaciones. Específicamente, la invención se refiere al microorganismo de la cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. con número de registro CECT 9748 y sobrenadantes del cultivo.

**Antecedentes de la invención**

En los últimos años, ha aumentado la conciencia sobre los efectos nocivos que los fertilizantes químicos inorgánicos y los productos fitosanitarios ejercen sobre el medio ambiente. El agotamiento de los nutrientes del suelo a través de la lixiviación en las vías fluviales y la contaminación son algunos de los efectos negativos de estos fertilizantes químicos inorgánicos. Los compuestos químicos fitosanitarios suelen tener una gama de acciones tan amplia que impactan tanto en la flora como en los pequeños animales del ecosistema y también pueden tener efectos nocivos para la salud de los invertebrados, las plantas superiores y los animales y los seres humanos. Los efectos ambientales adversos han dado lugar a legislaciones más estrictas que impiden su uso que, junto con un creciente interés por la agricultura ecológica, ha planteado la necesidad de alternativas adecuadas.

La idea de eliminar el uso de fertilizantes y productos fitosanitarios químicos nocivos para el medio ambiente se está convirtiendo poco a poco en una realidad debido a la aparición de microorganismos que pueden servir para el mismo fin o incluso hacerlo mejor. Esto trae la idea de usar microbios que pueden desarrollarse para su uso como fertilizantes biológicos (biofertilizantes) mientras que al mismo tiempo se previenen los fitopatógenos. Son respetuosos con el medio ambiente ya que son organismos vivos naturales. Aumentan el rendimiento y la producción de los cultivos y, además, en los países desarrollados, son menos costosos en comparación con los fertilizantes químicos y fitosanitarios. Estos biofertilizantes/fitosanitarios se denominan normalmente "microbios de control biológico". Estos microbios pueden colonizar de manera eficiente la rizosfera de las plantas y producir nutrientes para la planta hospedadora mientras influyen positivamente en el crecimiento y desarrollo de las raíces y el crecimiento general de la planta a través del control de patógenos (Vessey J.K., 2003, Plant and Soil 255: 571-86) y, en algunos casos, pueden colonizar eficazmente la parte aérea de la planta o al menos sobrevivir sobre ellas para ejercer su función.

Las cepas de *Bacillus* que mejoran el crecimiento de las plantas y/o la resistencia a los patógenos de las plantas son bien conocidas, tal como se desvela en el documento CN107384840A, el documento CN106434445A y el documento CN106995791A. Adicionalmente, S. Sivasakthi et al enseñan en el International Journal of Microbiological Research, 2013, páginas 227-233 que *Bacillus* es un género muy abundante y su actividad PGPR es común.

Es mucho más probable lograr el objetivo de una agricultura sostenible en todo el mundo mediante el uso generalizado de biofertilizantes/bioplaguicidas. Sin embargo, para lograr este objetivo es fundamental que los microorganismos presenten características adicionales para que puedan sustituir a otros productos de síntesis química que actualmente se usan para proteger cultivos vegetales frente a fitopatógenos y situaciones de estrés abiótico, y como suplementos de fosfato y hierro.

Sería particularmente ventajoso tener microorganismos que exhiban uno o más de esos rasgos adicionales para usarlos como biofertilizantes. Ha resultado difícil obtener microorganismos de estas características y que cumplan con las estrictas normativas en cuanto a eficacia y seguridad.

Por lo tanto, todavía existe la necesidad en la técnica de proporcionar microorganismos con propiedades mejoradas para usar como biofertilizantes.

**Sumario de aspectos de la invención**

Los presentes inventores han seleccionado una cepa del *Bacillus* spp., es decir, la cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. con número de registro CECT 9748, a partir de muestra de suelo obtenida en Pinos Genii (Granada, España), que es capaz de producir compuestos promotores del crecimiento de las plantas (Ejemplos 1 a 6) y proteger las plantas contra el estrés ambiental (Ejemplo 27) y fitopatógenos (Ejemplos 21 a 24). Esta cepa también es capaz de solubilizar fosfato y hierro insolubles del suelo y usar las formas solubilizadas como nutrientes (Ejemplos 7 a 13). Por otra parte, este microorganismo produce proteasas que favorecen el ciclo del nitrógeno (Ejemplo 1). Por lo tanto, el uso de microorganismos de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. contribuye a la disminución del uso de compuestos fitosanitarios (es decir, fungicidas, etc.) y también contribuye a disminuir el uso de compuestos nitrogenados con fosfatos. Como se muestra en los ejemplos, dichos microorganismos sobresalen en la promoción del crecimiento vegetal en una serie de cultivos vegetales de interés agrícola y en la protección de dichos cultivos vegetales contra fitopatógenos y estrés abiótico.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un microorganismo de la cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. con número de registro CECT 9748.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un sobrenadante de un cultivo del microorganismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un fertilizante, una semilla, un cepellón, un sustrato, un soporte sólido activo que comprende al menos un microorganismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención o un sobrenadante de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método para estimular el crecimiento de las plantas, que comprende una etapa de aplicar una cantidad eficaz de al menos un microorganismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o un sobrenadante de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, o un fertilizante, un sustrato, un soporte sólido activo o de acuerdo con el tercer aspecto de la invención, a la planta o, alternativamente, una etapa de sembrar una semilla o un cepellón de acuerdo con el tercer aspecto de la invención.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un método para proteger una planta contra fitopatógenos, que comprende una etapa de aplicar una cantidad eficaz de un microorganismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o un sobrenadante de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, o un fertilizante, un sustrato o un soporte sólido activo de acuerdo con el tercer aspecto de la invención, a la planta o, alternativamente, una etapa de sembrar una semilla o un cepellón de acuerdo con el tercer aspecto de la invención.

En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a un método para proteger una planta contra el estrés medioambiental y fitopatógenos, que comprende la etapa de aplicar una cantidad eficaz de al menos un microorganismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o un sobrenadante de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, o un fertilizante, un sustrato o un soporte sólido activo de acuerdo con el tercer aspecto de la invención, a la planta o, alternativamente, la etapa de sembrar una semilla o un cepellón de acuerdo con el tercer aspecto de la invención.

En un séptimo aspecto, la presente invención se refiere a un método para solubilizar un fosfato insoluble y/o hierro insoluble en un sustrato sólido o un campo, que comprende la etapa de aplicar al menos un microorganismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o un fertilizante, un sustrato o un soporte sólido activo de acuerdo con el tercer aspecto de la invención, al sustrato sólido o campo o, alternativamente, la etapa de sembrar una semilla o un cepellón de acuerdo con el tercer aspecto de la invención sobre el sustrato sólido o campo.

En un octavo aspecto, la presente invención se refiere al uso del microorganismo de acuerdo con cualquiera del primer aspecto de la invención o el sobrenadante de acuerdo con el primer aspecto de la invención o la semilla fertilizante, el cepellón, el soporte sólido activo o el suelo de acuerdo con el tercer aspecto de la invención, para estimular el crecimiento vegetal y/o proteger una planta contra fitopatógenos y/o para proteger una planta contra el estrés ambiental y/o para solubilizar un fosfato insoluble y/o hierro insoluble en un sustrato o campo sólido y/o para obtener una cepa con capacidad para promover la resistencia al crecimiento de fitopatógenos, para producir al menos un compuesto estimulante del crecimiento vegetal y/o para solubilizar fosfato y/o hierro insolubles.

## Descripción detallada de la invención

### 1. Microorganismo de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un microorganismo de la cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. con número de registro CECT 9748, en lo sucesivo en el presente documento "el microorganismo de la invención".

La presente invención se refiere a un microorganismo de la cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp., depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de registro CECT 9748.

La cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. se caracteriza porque el gen que codifica el ARN 16S comprende la secuencia de SEQ ID NO:3.

Los procesos de promover la resistencia de las plantas a al menos un fitopatógeno, producir al menos un compuesto estimulante del crecimiento vegetal, solubilizar fosfatos y solubilizar hierro son de una naturaleza genética independiente.

La expresión "capacidad de promover la resistencia de las plantas a al menos un fitopatógeno", como se usa en el presente documento, se refiere a los rasgos bacterianos que inhiben el funcionamiento de uno o más organismos patógenos de las plantas. La resistencia de la planta a al menos un fitopatógeno puede ser resistencia sistémica. Los mecanismos por los cuales el microorganismo de la invención puede promover la resistencia de las plantas a al menos un fitopatógeno incluyen la producción de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, la síntesis de uno o más antibióticos, la producción de enzimas que degradan la pared celular, tales como proteasas, amilasas y lipasas,

la competencia, la síntesis de cianuro de hidrógeno, la resistencia sistémica inducida, el enfriamiento del quórum y la producción de sideróforos.

En una realización, el fitopatógeno se selecciona de hongos o bacterias.

En una realización particular, el fitopatógeno son hongos. Los ejemplos no limitantes de hongos incluyen *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solanii*, y *Pythium ultimum*.

En una realización, la capacidad de promover la resistencia de las plantas a al menos un fitopatógeno es mediante la síntesis de uno o más antibióticos. Los ejemplos no limitantes de antibióticos incluyen Tas A, sublancina, subtilosina, bacilisina, clorotetaina, subtilina, bacileno, surfactina, iturina y fengicina.

En una realización, la capacidad de promover la resistencia de las plantas a al menos un fitopatógeno es mediante la producción de enzimas que degradan la pared celular. Las enzimas incluyen quitinasa, que degrada la quitina, es decir, un resto del polímero de  $\beta$ -(1, 4)-N-acetil glucosamina y una parte integral de la pared celular de muchos hongos fitopatógenos;  $\beta$ -1,3-glucanasa, que degrada otro carbohidrato de la pared celular; proteasa, que pueden degradar las proteínas de la pared celular; amilasas, que pueden degradar carbohidratos y almidones; y lipasa, que puede degradar algunos de los lípidos asociados a la pared celular; todos los cuales pueden, hasta cierto punto, lisar individualmente las células fúngicas.

En una realización, la capacidad de promover la resistencia de las plantas a al menos un fitopatógeno es compitiendo con el fitopatógeno. El microorganismo de la invención puede superar a los fitopatógenos por los nutrientes o por los sitios de unión en la raíz de la planta. Tal competición puede actuar limitando la unión del fitopatógeno a la planta, dificultando de esta manera su proliferación.

En una realización, la capacidad de promover la resistencia de las plantas a al menos un fitopatógeno es mediante la producción de sideróforos. Los sideróforos producidos por las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) tienen una afinidad mucho mayor por el hierro que los sideróforos producidos por plantas u hongos, por lo que los sideróforos de PGPB pueden secuestrar incluso cantidades diminutas de hierro, limitando de esta manera la cantidad de hierro que está disponible para los fitopatógenos.

La capacidad de un microorganismo para promover la resistencia de las plantas a al menos un fitopatógeno puede determinarse por cualquier método convencional. Por ejemplo, una cantidad adecuada de un cultivo de un fitopatógeno, tal como un hongo, puede colocarse en un agar de dextrosa de patata en una placa de Petri (Masago *et al.*, 1976, *Phytopathology* 67:425), al que se le añade una cantidad adecuada de un microorganismo a ensayar, o del sobrenadante obtenido del cultivo de dicho microorganismo, se aplica y se monitoriza la inhibición del crecimiento del fitopatógeno (Ejemplos 21 y 24).

La capacidad de un microorganismo para producir enzimas que degradan la pared celular, tales como proteasas, amilasas,  $\beta$ -glucosidasas y lipasas, puede evaluarse por cualquier método que sea convencional en la técnica, tales como los métodos descritos en los Ejemplos 1, 2, 3, 4 y 5 de la presente solicitud.

La expresión "capacidad para producir al menos un compuesto estimulante del crecimiento vegetal", como se usa en el presente documento, se refiere a la propiedad por la cual una cepa es capaz de sintetizar y liberar al suelo al menos un compuesto estimulante del crecimiento vegetal. La expresión "compuesto estimulante del crecimiento vegetal" o "compuesto promotor del crecimiento vegetal", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que promueven el crecimiento de las plantas al facilitar el desarrollo del sistema de raíces de las plantas, el alargamiento del tallo, la floración, etc. Los ejemplos de compuestos estimulantes del crecimiento vegetal que pueden producirse por la variante de la cepa de la invención incluyen, sin limitación, fuentes de nitrógeno, tales como aminoácidos; fitohormonas, tales como ácido indol 3-acético (IAA), ácido giberélico (GA3), citoquinina, etileno, zeatina y ácido abscísico (ABA); enzimas que favorecen la asimilación de nitrógeno o que hidrolizan proteínas, tales como proteasas; enzimas que facilitan el ciclo del carbono, tales como glucosidasas y amilasas; y compuestos reguladores del crecimiento vegetal, tales como poliaminas, por ejemplo, cadaverina (CAD).

La capacidad de un microorganismo para producir compuestos estimulantes o promotores del crecimiento de las plantas puede determinarse por medio de cualquier método convencional, por ejemplo, mediante un ensayo de estimulación del crecimiento vegetal temprano. Brevemente, dicho ensayo comprende sembrar semillas, por ejemplo, maíz, cebada, césped o Avex III (mezcla de hierbas), en una mezcla homogénea formada por suelo agrícola mezclado con arena (sílice) y un cultivo del microorganismo a ensayar (en una densidad de población adecuada) (Ejemplos 15 a 17), preferentemente adherido a un sustrato (Ejemplo 18) o a un soporte sólido (Ejemplo 19) o a una semilla (Ejemplo 20). El sistema se incuba en condiciones que permitan la germinación de semillas (por ejemplo, a 20 °C en la oscuridad). El porcentaje de germinación de semillas y/o la longitud del tallo se determina una semana después de la siembra. La capacidad de un microorganismo para producir compuestos que estimulen o promuevan el crecimiento de las plantas también puede determinarse suplementando semillas o cepellones antes de la siembra (Ejemplo 20).

La capacidad de un microorganismo para producir cada tipo de compuesto estimulante del crecimiento vegetal también

puede determinarse por separado. La producción de fitohormonas puede determinarse mediante técnicas de cromatografía adecuadas, tales como cromatografía de fase inversa y cromatografía de gases-espectrometría de masas con control selectivo de iones (GC-MS-SIM), como se describe por Perrig *et al.*, 2007, Appl Microbiol Biotechnol 75:1143-50). La producción de etileno puede determinarse por, por ejemplo, cromatografía de gases-detección de ionización de llama. La producción de IAA puede evaluarse usando LB modificado (Naik *et al.*, 2008; como anteriormente) y colocando un disco de papel Whatman con el microorganismo inoculado sobre el medio. Después de la incubación, el disco de papel Whatman se hace reaccionar con el reactivo de Salkowsky. Si aparece un color rojizo en el papel Whatman después de 1 h de incubación, la producción de IAA se considera positiva (Ejemplos 1 y 6). El experto en la materia comprenderá que pueden realizarse otros ensayos que sirvan para evaluar la estimulación o promoción del crecimiento vegetal, tales como, por ejemplo, los ensayos mencionados en la solicitud de patente internacional WO 2011/147826.

En una realización, el al menos un compuesto estimulante del crecimiento de las plantas es una fitohormona. En una realización preferida, la fitohormona es IAA.

La capacidad de un microorganismo para hidrolizar proteínas se refiere a la capacidad bacteriana de producir proteasas que son capaces de hidrolizar o descomponer las proteínas y péptidos que están presentes en el suelo. La hidrólisis de proteínas en el suelo favorece la captación de nitrógeno en las plantas ya que libera pequeños péptidos y aminoácidos que favorecen la nutrición vegetal. Muchos tipos de proteasas que se secretan se conocen como endopeptidasas, que se caracterizan por su acción preferencial en los enlaces peptídicos en las regiones internas de la cadena polipeptídica lejos de los extremos N y C (Rao *et al.*, 1998, Microbiol Mol Biol Rev 62:597-635). Uno de los cuatro subgrupos de endoproteasas son las serina proteasas que incluyen las subtilisin, que son endoproteasas producidas por las cepas de *Bacillus* sp. (Rani *et al.*, 2012 Int J Curr Life Sci 2:12-8).

La capacidad de un microorganismo para hidrolizar proteínas puede determinarse por cualquier método convencional. Por ejemplo, un microorganismo a ensayar puede cultivarse en un medio de suelo que contenga leche desnatada (Naik *et al.*, 2008, Microbial Ecology 56:492-504). La hidrólisis de proteínas se detecta cuando se forma un halo claro en el medio que rodea a una colonia dada (Ejemplos 1 y 2).

Las proteínas pueden ser proteínas que se encuentran en el suelo o proteínas del suelo.

En otra realización, el al menos un compuesto estimulante del crecimiento vegetal es una proteasa.

La capacidad de un microorganismo para producir enzimas que facilitan el ciclo del carbono, tales como glucosidasas y amilasas, puede evaluarse por cualquier método que sea convencional en la técnica, tales como los métodos descritos en los Ejemplos 1, 3 y 4 de la presente solicitud.

En otra realización, el al menos un compuesto estimulante del crecimiento vegetal es una glucosidasa. En otra realización preferida, la glucosidasa es una  $\beta$ -glucosidasa.

En otra realización, el al menos un compuesto estimulante del crecimiento vegetal es una amilasa.

La expresión "capacidad de solubilizar fosfato", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de una cepa para liberar y solubilizar fosfato a partir de una fuente de fosfato insoluble, tal como el fosfato presente, por ejemplo, en suelos o en fosfato de roca (por ejemplo, fosfato de calcio dibásico ( $\text{CaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), fosfato de calcio tribásico ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  o TPC), etc.) y usarlo como fuente de fósforo. La solubilización de fosfato por un microorganismo puede evaluarse mediante métodos que son convencionales en la técnica. Por ejemplo, inoculando un cultivo de dicho microorganismo en un medio que contiene uno o más fosfatos insolubles como única fuente de fósforo (por ejemplo, fosfato tricálcico, etc.), incubando en condiciones adecuadas y contando los microorganismos viables; en estas condiciones, el mantenimiento o aumento de la densidad de población bacteriana es indicativo de que dichos microorganismos solubilizan dichos fosfato/fosfatos insolubles y lo/los usan como fuente de fósforo (Rodríguez & Fraga, 1999, Biotechnology Advances 17:319-39). Otro ensayo que permite esclarecer si un microorganismo es capaz de solubilizar fosfatos insolubles consiste en sembrarlos en medios sólidos especializados para este fin, tales como Agar Pikovskaya (Naik *et al.*, 2008; como anteriormente), en donde el microorganismo genera un microambiente debido a la producción de ácidos orgánicos, lo que se traduce en un halo visible en el medio (Ejemplos 1, 7 y 8). Otro ejemplo consiste en añadir un microorganismo a ensayar al agua que contiene roca fosfórica fundida, en presencia de una fuente de carbono y con aireación, y monitorizar la solubilización del fósforo (Ejemplos 10, 11 y 12).

La expresión "capacidad de solubilizar hierro", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de una cepa para solubilizar el hierro insoluble presente, por ejemplo, en suelos o en roca fosfórica (por ejemplo, óxidos de hierro, etc.). La forma más común para que los microorganismos solubilizan el hierro es mediante la producción, que son pequeños, compuestos quelantes de hierro de alta afinidad que son absorbidos por la cepa de la invención y facilitan la tasa de absorción de hierro por parte de las plantas. La producción de sideróforos puede determinarse por cualquier método convencional, por ejemplo, mediante la inoculación de cultivo bacteriano puro en placas que contenían agar CAS (Alexander & Zuberer, 1991, Biology Fertility Soils 12:39) y observando la formación de color

naranja alrededor de cada colonia tras la incubación (Ejemplos 1 y 9). La capacidad de un microorganismo de solubilizar el hierro también puede determinarse inoculando un cultivo de dicho microorganismo en un medio que contenga hierro insoluble como única fuente de hierro (por ejemplo, tricloruro férrico, etc.) y contando los microorganismos viables, como se describe en el documento WO 2010/018210. En estas condiciones, el mantenimiento de o un aumento de la densidad de población bacteriana es indicativo de que dichos microorganismos solubilizan dicho hierro insoluble y lo usan como fuente de hierro (Rodríguez & Fraga, 1999, como anteriormente). Otro ejemplo consiste en inocular un cultivo de dicho microorganismo en un medio de cultivo adecuado que no contenga hierro y añadir roca fosfórica moldeada que contenga del 15 al 30 % de  $P_2O_5$ , incubando en condiciones adecuadas y contando los microorganismos viables; en estas condiciones, el mantenimiento o un aumento de la densidad de población bacteriana es indicativo de que dichos microorganismos usan hierro o, la formación de un color amarillo verdoso en los sobrenadantes de los cultivos es indicativa de la excreción de ciertos sideróforos en el medio de cultivo (Ejemplo 13).

La CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. promueve la resistencia de las plantas a al menos un fitopatógeno, produce al menos un compuesto estimulante del crecimiento vegetal, hidroliza proteínas y azúcares derivados de materia vegetal, solubiliza el fosfato insoluble y solubiliza el hierro insoluble, como se demuestra en los Ejemplos de la presente solicitud.

Adicionalmente, los presentes inventores han demostrado que la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. También se ha demostrado que la es inocua para otros microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (Ejemplo 30) y microorganismos heterótrofos del suelo (Ejemplos 30 y 31).

Se reconocerá que el sobrenadante de la invención contiene los productos derivados del metabolismo del microorganismo de la invención, es decir, compuestos que promueven la resistencia de las plantas a al menos un fitopatógeno y/o al menos un compuesto estimulante del crecimiento vegetal y/o compuestos que hidrolizan proteínas y azúcares derivados de materia vegetal y/o cualquier compuesto que ayude a solubilizar fosfato insoluble y/o hierro. Estas características permiten que el sobrenadante de la invención tenga múltiples aplicaciones en el campo de la agricultura, tal como su uso como fertilizante y fortalecedor de plantas.

Por lo tanto, la invención también contempla el sobrenadante de un cultivo del microorganismo de acuerdo con la invención, en lo sucesivo en el presente documento "el sobrenadante de la invención".

Como se usa en el presente documento, el término "sobrenadante" se refiere a un medio de cultivo libre de células que ha sido condicionado por el crecimiento de un microorganismo y que, como resultado del condicionamiento, contiene compuestos que han sido sintetizados y secretados por el microorganismo. Para obtener un sobrenadante de acuerdo con la invención, se inocula un medio de cultivo con la cepa de la invención, que se cultiva en condiciones adecuadas. Por ejemplo, la cepa de la invención puede cultivarse en un medio de cultivo mínimo que comprende una fuente de carbono que puede usarse por la cepa. Dicha fuente de carbono puede comprender, sin limitación, glucosa, sacarosa, lactosa, ácido benzoico, ácido cítrico o combinaciones de los mismos. Prácticamente cualquier medio de cultivo adecuado para el desarrollo y crecimiento del microorganismo de la invención puede usarse en la puesta en práctica de dicho método. Adicionalmente, el medio de cultivo puede comprender otros medios específicos para lograr la producción del metabolito deseado. Dichos medios de cultivo son bien conocidos en el estado de la técnica y su preparación es una práctica rutinaria para un experto en la materia. La cepa puede cultivarse a una temperatura entre 15 °C y 40 °C hasta alcanzar una densidad celular igual o mayor que  $10^9$  ufc/ml. Las células se retiran después del medio por cualquier medio adecuado, tal como decantación, centrifugación o filtración.

Cuando el caldo de cultivo o el sobrenadante no vayan a usarse inmediatamente, puede conservarse hasta su uso en condiciones de frío, por ejemplo, a 4 °C, -20 °C o -80 °C.

Un cultivo biológicamente puro del microorganismo de la invención es un aspecto adicional de la invención.

## **2. Productos que contienen la cepa de la invención**

### **2.1. Fertilizante**

En otro aspecto, la invención se refiere a un fertilizante que comprende el microorganismo de la invención, en lo sucesivo en el presente documento "el primer fertilizante de la invención".

La expresión "microorganismo de la invención" se ha descrito anteriormente en detalle y su definición y realizaciones se incluyen en el presente documento por referencia.

El término "fertilizante", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto que se agrega a un suelo para facilitar el crecimiento de las plantas. La cepa de la invención se puede añadir a prácticamente cualquier fertilizante, ya sea sólido o líquido, para poner en práctica la presente invención. Ejemplos ilustrativos no limitantes de fertilizantes: fertilizantes de un solo nutriente, fertilizantes binarios y fertilizantes tipo NPK y fertilizantes basados en una mezcla de microelementos. El principal fertilizante de un solo nutriente basado en nitrógeno es el amoníaco o sus

soluciones. El nitrato de amonio y la urea también se usan ampliamente. Los principales fertilizantes fosfatados puros son los superfosfatos, que comprenden cantidades variables de diversos fosfatos, tales como  $P_2O_5$ . Los fertilizantes binarios, o fertilizantes NP, NK o PK, proporcionan combinaciones de dos componentes de nitrógeno, fósforo y potasio. Los fertilizantes NPK son fertilizantes de tres componentes que aportan nitrógeno, fósforo y potasio.

Cualquier fertilizante líquido con un pH comprendido entre 2 y 10 también puede usarse para la puesta en práctica de esta invención. Los ejemplos no limitantes de fertilizantes líquidos incluyen fertilizantes basados en ácidos fúlvicos, fertilizantes líquidos con diferentes composiciones, tales como mezclas 16:2:4, mezclas 20:5:0, etc. o diversos tipos de fertilizantes en gotas con una composición NPK de 8:9:9, 16:4:4, etc. El microorganismo de la invención puede añadirse al fertilizante.

El fertilizante descrito en el presente documento puede contener, si se desea, otros ingredientes o constituyentes comúnmente usados en composiciones agrícolas, tales como tensioactivos, adhesivos, principios activos o reguladores de pH, siempre que no pongan en peligro o comprometan la viabilidad del microorganismo de la invención. Dichos ingredientes o constituyentes comúnmente usados en las composiciones agrícolas son generalmente conocidos por los expertos en la materia. Los principales micronutrientes ampliamente usados son molibdeno, cinc y cobre, aunque las necesidades de micronutrientes dependen de la planta. Por ejemplo, la remolacha azucarera parece requerir boro y las legumbres requieren cobalto.

El fertilizante de la invención puede obtenerse por métodos convencionales mezclando dicho fertilizante con un cultivo que contenga el microorganismo de la invención. Dicha mezcla se realiza con la adecuada proporción peso volumen (p:v) la cual es muy variable dependiendo de, entre otros factores, las unidades formadoras de colonias (ufc) presentes en el cultivo y las ufc por unidad de medida (g o ml) de fertilizante a obtener en el fertilizante suplementado de la invención.

En una realización particular, se mezclan entre 0,01 y 1 ml de cultivo que contiene  $10^7$  ufc del microorganismo de la invención con 1 g de fertilizante sólido. En otra realización específica, se mezcla 1 ml de cultivo que contiene  $10^7$  ufc del microorganismo de la invención con 1 ml de fertilizante líquido con un pH comprendido entre 2 y 10. Se entenderá que, cuando se añade al abono más de un microorganismo de la invención, las proporciones anteriores se calculan usando los cultivos combinados.

Para facilitar la adhesión del microorganismo de la invención al fertilizante, puede usarse un adhesivo adecuado. Puede usarse prácticamente cualquier adhesivo aceptable en agricultura. Los ejemplos no limitativos de dichos adhesivos incluyen goma arábiga y polímeros basados en alginato, tales como alginato cálcico. La cantidad de adhesivo puede variar, pero normalmente es igual o inferior al 1 % en peso del peso total del fertilizante.

El fertilizante de la invención puede obtenerse mezclando un abono con un cultivo puro que contenga la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp., o con uno o más cultivos puros, cada uno de los cuales contiene un microorganismo diferente de la invención. Convenientemente, el fertilizante adsorbe al menos  $10^3$  ufc del microorganismo de la invención por gramo de fertilizante, al menos  $10^4$  ufc/g de fertilizante, al menos  $10^5$  ufc por g de fertilizante, al menos  $10^6$  ufc/g de fertilizante, al menos  $10^7$  ufc/g de fertilizante, al menos  $10^8$  ufc/g de fertilizante, al menos  $10^9$  ufc/g de fertilizante, al menos  $10^{10}$  ufc/g de fertilizante o más.

La mezcla del fertilizante con el cultivo que contiene el microorganismo de la invención puede realizarse generalmente basado en una proporción peso-volumen (p:v) muy variable, dependiendo, entre otros factores, de las ufc/ml presentes en el cultivo y de las ufc por gramo de fertilizante a obtener en el fertilizante de la invención.

El fertilizante de la invención puede comprender únicamente el microorganismo de la invención o también diferentes microorganismos de interés en la agricultura, por ejemplo, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, otras cepas de *Bacillus*, etcétera.

La presencia del microorganismo de la invención en el abono que proporciona el abono contribuiría no sólo a reducir el problema medioambiental relativo a la acumulación de fosfato insoluble en los suelos cultivables ya que permitiría su asimilación, pero también contribuiría a reducir el crecimiento de patógenos en la superficie tratada ya que eliminaría el hierro, un elemento necesario para los patógenos; de los alrededores. Los fertilizantes suministrados de esta manera desempeñarían un doble papel en el desarrollo de las plantas, a saber (i) facilitar los nutrientes y estimular el crecimiento y (ii) prevenir el crecimiento de patógenos (por ejemplo, hongos, bacterias patógenas, etc.) para las plantas. Cuando el fertilizante de la invención se aplica en la parte aérea de la planta evita la proliferación de fitopatógenos en la filosfera.

Se entenderá que el sobrenadante de la invención también proporciona compuestos beneficiosos a un fertilizante. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un fertilizante que comprende al menos un sobrenadante de la invención, en lo sucesivo en el presente documento "el segundo fertilizante de la invención".

La expresión "sobrenadante de la invención" se ha descrito anteriormente en detalle y sus definiciones y realizaciones se incluyen en el presente documento por referencia.

Las características particulares del primer fertilizante de la invención pueden adaptarse convenientemente para el segundo fertilizante de la invención.

## 5 2.2. Sustrato

Como apreciará un experto en la materia, la aplicación del microorganismo de la invención a las plantas puede facilitarse fijando el microorganismo sobre un sustrato. El sustrato favorecerá ventajosamente la proliferación de dicha cepa en la rizosfera vegetal. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un sustrato que comprende el microorganismo de la invención, en lo sucesivo en el presente documento "el primer sustrato de la invención".

La expresión "microorganismo de la invención" se ha descrito anteriormente en detalle y su definición y realizaciones se incluyen en el presente documento por referencia.

El término "sustrato", como se usa en el presente documento, es un sustrato inerte sin suelo que se compone principalmente de elementos orgánicos y que es capaz de sostener las plantas. Prácticamente cualquier sustrato que cumpla dichas condiciones puede usarse en la presente invención. Los ejemplos no limitantes de sustratos incluyen turba (musgo de turba), corteza, polvo de coco, polvo de corcho, celulosa, extractos de algas previamente secadas y molidas, compost y mezclas de los mismos.

El sustrato de la invención puede obtenerse mezclando dicho sustrato con un cultivo puro que contenga el microorganismo de la invención o con más de un cultivo puro que contenga cada uno un microorganismo diferente de acuerdo con la invención. Convenientemente, el sustrato adsorbe al menos  $10^3$  ufc del microorganismo de la invención por gramo de sustrato, al menos  $10^4$  ufc/g de sustrato, al menos  $10^5$  ufc por g de sustrato, al menos  $10^6$  ufc/g de sustrato, al menos  $10^7$  ufc/g de sustrato, al menos  $10^8$  ufc/g de sustrato, al menos  $10^9$  ufc/g de sustrato, al menos  $10^{10}$  ufc/g de sustrato o más.

La mezcla del sustrato con el cultivo que contiene el microorganismo de la invención puede realizarse generalmente basado en una proporción peso-volumen (p:v) muy variable, dependiendo, entre otros factores, de las ufc/ml presentes en el cultivo y de las ufc por gramo de sustrato a obtener en el sustrato de la invención. Sin embargo, en una realización particular, dicha relación sustrato:cultivo que contiene el microorganismo de la invención está comprendida entre 1:0,01 y 1:1 (p:v); en una realización específica, 1 ml de cultivo que contiene  $10^7$  del microorganismo de la invención se mezcla con 1 gramo de sustrato.

El sustrato de la invención puede comprender adicionalmente diferentes microorganismos de interés en agricultura. Los microorganismos pueden combinarse ya que el microorganismo de la invención no ejerce efectos perjudiciales sobre un rango de bacterias heterótrofas o bacterias de interés en la agricultura (Ejemplos 30 y 31).

Se entenderá que el sobrenadante de la invención también proporciona compuestos beneficiosos a un sustrato. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un sustrato que comprende al menos un sobrenadante de la invención, en lo sucesivo en el presente documento "el segundo sustrato de la invención".

La expresión "sobrenadante de la invención" se ha descrito anteriormente en detalle y sus definiciones y realizaciones se incluyen en el presente documento por referencia.

Las características particulares del primer sustrato de la invención pueden adaptarse convenientemente para el segundo sustrato de la invención.

## 50 2.3. Soporte sólido activo

Como entenderá un experto en la materia, la aplicación de la cepa de la invención a las plantas puede facilitarse fijando la cepa sobre un soporte sólido. El soporte sólido favorecerá ventajosamente la proliferación de dicha cepa en la rizosfera vegetal. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un soporte sólido que comprende el microorganismo de la invención, en lo sucesivo en el presente documento "el primer soporte sólido activo de la invención".

La expresión "microorganismo de la invención" se ha descrito anteriormente en detalle y su definición y realizaciones se incluyen en el presente documento por referencia.

La expresión "soporte sólido" o "soporte sólido activo", como se usa en el presente documento, es un soporte sólido inerte que tiene un área superficial alta para permitir una alta capacidad de adsorción de microorganismos (Busscher & Weerkamp, 1999, FEMS Microbiology Letters 46:465).

Prácticamente cualquier soporte sólido que cumpla dichas condiciones puede usarse en la presente invención. Los ejemplos no limitantes de soportes sólidos incluyen arcilla, tales como bentonita, montmorillonita, talco, sepiolita y zeolita, perlita, espuma de poliestireno, vermiculita, talco, lana de roca y mezclas de los mismos.

El soporte sólido activo de la invención puede obtenerse mezclando dicho soporte sólido con un cultivo puro que contenga el microorganismo de la invención o con más de un cultivo puro que contenga cada uno un microorganismo diferente de la invención. Convenientemente, el soporte sólido adsorbe al menos  $10^3$  ufc del microorganismo de la invención por gramo de soporte sólido, al menos  $10^4$  ufc/g de soporte sólido, al menos  $10^5$  ufc por g de soporte sólido, al menos  $10^6$  ufc/g de soporte sólido, al menos  $10^7$  ufc/g de soporte sólido, al menos  $10^8$  ufc/g de soporte sólido, al menos  $10^9$  ufc/g de soporte sólido, al menos  $10^{10}$  ufc/g de soporte sólido o más.

La mezcla del soporte sólido activo con el cultivo que contiene el microorganismo de la invención puede realizarse generalmente basado en una proporción peso-volumen (p:v) muy variable, dependiendo, entre otros factores, de las ufc/ml presentes en el cultivo y de las ufc por gramo de soporte sólido a obtener en el soporte sólido activo de la invención. Sin embargo, en una realización particular, dicha relación de cultivo de soporte sólido que contiene el microorganismo de la invención está comprendida entre 1:0,01 y 1:1 (p:v); en una realización específica, se mezcla 1 gramo de soporte sólido con 1 ml de cultivo que contiene  $10^7$  de la cepa de la invención.

El soporte sólido activo de la invención puede comprender adicionalmente diferentes microorganismos de interés en agricultura.

Se entenderá que el sobrenadante de la invención también proporciona compuestos beneficiosos a un soporte sólido. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un soporte sólido que comprende al menos un sobrenadante de la invención, en lo sucesivo en el presente documento "el segundo soporte sólido activo de la invención".

La expresión "sobrenadante de la invención" se ha descrito anteriormente en detalle y sus definiciones y realizaciones se incluyen en el presente documento por referencia.

Las características particulares del primer soporte sólido activo de la invención pueden adaptarse convenientemente al segundo soporte sólido activo de la invención.

#### **2.4. Semilla**

En otro aspecto, la invención se refiere a una semilla que comprende el microorganismo de la invención, en lo sucesivo en el presente documento "la semilla de la invención".

La expresión "microorganismo de la invención" se ha descrito anteriormente en detalle y su definición y realizaciones se incluyen en el presente documento por referencia.

El término "semilla", como se usa en el presente documento, se refiere a una planta embrionaria encerrada en una cubierta exterior protectora, que se forma como parte del proceso de reproducción en las plantas. La semilla puede ser la semilla de cualquier planta con interés agrícola, silvícola, alimentario (para fines humanos o animales), ornamental o energético, etc.

El microorganismo de la invención puede estar presente parcial o completamente en la superficie de la semilla.

La semilla de la invención puede obtenerse por métodos convencionales. A modo de ilustración, puede obtenerse sumergiendo la semilla en una suspensión o cultivo puro del microorganismo de la invención o, alternativamente, pulverizando dicha suspensión o cultivo sobre las semillas. La suspensión o cultivo puro puede contener más de un microorganismo de la invención. Otros métodos incluyen mezclar la semilla y el microorganismo de la invención previamente incorporados en un soporte sólido para facilitar la adhesión del microorganismo de la invención a dicha semilla.

La semilla de la invención puede comprender al menos  $10^3$  ufc del microorganismo de la invención por gramo de semilla, al menos  $10^4$  ufc/g de semilla, al menos  $10^5$  ufc por g de semilla, al menos  $10^6$  ufc/g de semilla, al menos  $10^7$  ufc/g de semilla, al menos  $10^8$  ufc/g de semilla, al menos  $10^9$  ufc/g de semilla, al menos  $10^{10}$  ufc/g de semilla o más.

Adicionalmente, para mejorar la adhesión del microorganismo de la invención a la semilla, puede usarse un adhesivo de tipo agrícola que contiene una concentración adecuada de dicha cepa, tal como un gel o polímero de tipo orgánico, tales como goma arábica o polímeros de alginato u otros polímeros tales como CARBOPOL® GEL, todos los cuales son inertes para el microorganismo de la invención.

La semilla de la invención puede comprender adicionalmente diferentes microorganismos de interés en agricultura.

Se entenderá que el sobrenadante de la invención también proporciona compuestos beneficiosos a una semilla. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una semilla que comprende al menos un sobrenadante de la invención, en lo sucesivo en el presente documento "la segunda semilla de la invención".

La expresión "sobrenadante de la invención" se ha descrito anteriormente en detalle y sus definiciones y realizaciones se incluyen en el presente documento por referencia.

Las características particulares de la primera semilla de la invención pueden adaptarse convenientemente para la segunda semilla de la invención.

## 2.5. Cepellón

En otro aspecto, la invención se refiere a un cepellón que comprende el microorganismo de la invención, en lo sucesivo en el presente documento "el primer cepellón de la invención".

La expresión "microorganismo de la invención" se ha descrito anteriormente en detalle y su definición y realizaciones se incluyen en el presente documento por referencia.

Como se usa en el presente documento, el término "cepellón" se refiere a la masa principal de raíces en la base de una planta. El cepellón es de particular importancia cuando una planta se trasplanta o se planta en el suelo ya que la calidad y la preparación del cepellón determinarán lo bien que sobrevivirá la planta a este trasplante. El cepellón puede ser el cepellón de interés agrícola, silvícola, alimentario (para fines humanos o animales), ornamental o energético, etc. El microorganismo de la invención puede recubrir total o parcialmente el cepellón.

El cepellón de la invención puede obtenerse por métodos convencionales. A modo de ilustración, puede obtenerse sumergiendo la semilla en una suspensión o cultivo puro del microorganismo de la invención o, alternativamente, pulverizando dicha suspensión o cultivo sobre el cepellón. La suspensión o cultivo puro puede contener más de un microorganismo de la invención. Otros métodos incluyen mezclar el cepellón y el microorganismo de la invención previamente incorporados en un soporte sólido para facilitar la adhesión del microorganismo de la invención a dicho cepellón.

El cepellón de la invención puede comprender al menos  $10^3$  ufc del microorganismo de la invención por gramo de cepellón, al menos  $10^4$  ufc/g de cepellón, al menos  $10^5$  ufc por g de cepellón, al menos  $10^6$  ufc/g de cepellón, al menos  $10^7$  ufc/g de cepellón, al menos  $10^8$  ufc/g de cepellón, al menos  $10^9$  ufc/g de cepellón, al menos  $10^{10}$  ufc/g de cepellón o más.

Adicionalmente, para mejorar la adhesión del microorganismo de la invención al cepellón, puede usarse un adhesivo de tipo agrícola que contiene una concentración adecuada de dicha cepa, tal como un gel o polímero de tipo orgánico, tales como goma arábica o polímeros de alginato, todos los cuales son inertes para el microorganismo de la invención.

El cepellón de la invención puede comprender adicionalmente diferentes microorganismos de interés en agricultura.

Se entenderá que el sobrenadante de la invención también proporciona compuestos beneficiosos a un cepellón. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un cepellón que comprende al menos un sobrenadante de la invención, en lo sucesivo en el presente documento "el segundo cepellón de la invención".

La expresión "sobrenadante de la invención" se ha descrito anteriormente en detalle y sus definiciones y realizaciones se incluyen en el presente documento por referencia.

Las características particulares del primer cepellón de la invención pueden adaptarse convenientemente para el segundo cepellón de la invención.

## 3. Métodos de uso

Se apreciará fácilmente que el microorganismo de la invención tiene multitud de aplicaciones en agricultura. Los métodos que explotan el uso del microorganismo de la invención para estimular el crecimiento vegetal, para proteger una planta contra patógenos, para proteger una planta contra el estrés ambiental y/o para solubilizar un fosfato insoluble y/o hierro insoluble en un sustrato sólido o suelo también son parte de la presente invención.

### 3.1. Método para estimular el crecimiento vegetal

La presencia del microorganismo de la invención o del sobrenadante de la invención es particularmente ventajosa en agricultura porque favorece la germinación simultánea de las semillas, proporciona un crecimiento homogéneo de las plantas de un mismo cultivo y coordina la floración, la fructificación y los períodos de maduración de la fruta.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para estimular el crecimiento vegetal, en lo sucesivo en el presente documento "el método para estimular el crecimiento vegetal de la invención", que comprende la etapa de aplicar una cantidad eficaz del microorganismo de la invención.

La capacidad del microorganismo de la invención para producir al menos un compuesto estimulante del crecimiento

vegetal y/o para solubilizar fosfato y/o hierro insolubles es particularmente ventajosa.

Alternativamente, el método para estimular el crecimiento de plantas de la invención puede comprender la etapa de aplicar el sobrenadante de la invención a la planta.

5 Se apreciará fácilmente que el microorganismo de la invención puede aplicarse de diferentes maneras, es decir, directamente al suelo, preferentemente al área de influencia radicular de la planta o a la filosfera, o como parte de un fertilizante, o adherido a un sustrato o soporte sólido activo.

10 Alternativamente, el método para estimular el crecimiento de plantas de la invención puede comprender la etapa de aplicar el fertilizante de la invención a la planta.

Alternativamente, el método para estimular el crecimiento de plantas de la invención puede comprender la etapa de aplicar el sustrato de la invención a la planta.

15 Alternativamente, el método para estimular el crecimiento de plantas de la invención puede comprender la etapa de aplicar el soporte sólido activo de la invención a la planta.

20 Alternativamente, el método para estimular el crecimiento de plantas de la invención puede comprender la etapa de aplicar el suelo de la invención a la planta.

Alternativamente, el crecimiento de una planta puede estimularse mediante la siembra de una semilla o un cepellón de dicha planta suplementado con el microorganismo de la invención, es decir, la semilla o cepellón de la invención. En este caso, el microorganismo de la invención se replicará y poblará el área del suelo que rodea la semilla o la raíz y ejercerá su función estimulando el crecimiento de la planta.

25 Alternativamente, el método para estimular el crecimiento vegetal de la invención puede comprender la etapa de sembrar la semilla de la invención o el cepellón de la invención cerca de la planta cuyo crecimiento se desea estimular. Siempre que la semilla o el cepellón se planten lo suficientemente cerca del área de influencia radicular de la planta, el microorganismo de la invención se replicará y poblará áreas cercanas de la rizosfera.

30 Las expresiones "sobrenadante de la invención", "fertilizante de la invención", "sustrato de la invención", "soporte sólido activo de la invención", "semilla de la invención" y "cepellón de la invención", se han descrito anteriormente en detalle y sus definiciones y realizaciones se incluyen aquí como referencia.

35 La expresión "cantidad eficaz", como se usa en el contexto de este aspecto de la invención, se refiere a la cantidad del microorganismo de la invención, el sobrenadante de la invención o los productos que contienen dicho microorganismo o sobrenadante de acuerdo con la invención, que se requiere para estimular, mejorar o inducir el crecimiento vegetal, es decir, aumentar la biomasa de dicha planta. La expresión "biomasa vegetal", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de materia orgánica contenida en una planta, es decir, la materia orgánica que constituye tanto la parte aérea de la planta, es decir, el tallo, el tronco, las hojas, las ramas, el fruto, las inflorescencias, etc. (biomasa aérea) como la parte subterránea de la misma, es decir, las raíces, los callos, los tubérculos, etc. (biomasa subterránea). La "biomasa vegetal" a menudo se mide como la masa seca o el peso (o "peso fresco", cuando sea apropiado) de la planta. Como sabrá la persona experta, existen múltiples métodos y parámetros que sirven para calcular el crecimiento vegetal o el aumento de biomasa en el estado de la técnica, incluyendo, sin limitación, la tasa de crecimiento, la tasa de crecimiento relativa, la relación del área foliar, el área foliar específica, la proporción de hojas, la tasa de asimilación neta, la proporción del tallo, la proporción de raíces y el contenido de materia seca.

40 La cantidad eficaz de un microorganismo de acuerdo con este aspecto de la invención puede determinarse mediante métodos que son convencionales en la técnica. Por ejemplo, diferentes cantidades del microorganismo de la invención, el sobrenadante de la invención o los productos que contienen dicho microorganismo o sobrenadante de acuerdo con la invención, pueden aplicarse a diferentes plantas que se encuentran en la misma fase de desarrollo. El crecimiento vegetal, es decir, el aumento en la biomasa, se monitoriza a lo largo del tiempo para determinar cuál de las cantidades probadas es eficaz. El aumento de la biomasa de la planta puede medirse como un % de aumento de la biomasa en comparación con una planta que no ha sido tratada con el microorganismo de la invención.

45 Otros indicadores de la estimulación del crecimiento de las plantas pueden incluir longitud del tallo aumentada, longitud de la raíz aumentada, número de raíces secundarias aumentado, germinación más temprana de las semillas, número de semillas en germinación, floración más temprana, cantidad y calidad de los frutos y cosechas más tempranas.

50 La cantidad eficaz dependerá de la planta en particular, la fase de crecimiento y el área de influencia radicular, que puede traducirse como el tamaño de la planta. La cantidad eficaz puede medirse en ufc totales, ufc por gramo de suelo rizosférico o cualquier otra unidad conveniente. La cantidad eficaz del microorganismo de la invención puede estar entre  $10^3$  y  $10^9$  ufc del microorganismo o de la invención por gramo de suelo rizosférico. La cantidad eficaz del sobrenadante de la invención puede estar entre 1 ml y 10 l por m<sup>2</sup> de la superficie del suelo. La cantidad eficaz del

fertilizante, del sustrato o del soporte sólido activo de la invención puede ser una cantidad que resulte entre  $10^3$  y  $10^9$  ufc del microorganismo o de la invención por gramo de suelo rizosférico. Dichas cantidades pueden aplicarse en una sola administración o en varias administraciones.

- 5 El crecimiento de prácticamente cualquier planta puede estimularse de acuerdo con este método. A modo de ilustración, cualquier planta que tenga interés agrícola puede usarse para este método, incluyendo plantas de interés en la alimentación humana o animal, plantas de interés ornamental, plantas de interés forestal, plantas de interés energético, etcétera. Algunos ejemplos no limitantes incluyen avena, cebada, maíz, trigo, tomate, pimienta, pepino, berenjena, césped, sorgo, rosales, geranios, margaritas, soja, cualquier árbol, tales como árboles frutales, roble, nogal, haya, pino, etc.

El método para estimular el crecimiento de la invención puede ser particularmente eficaz en las primeras fases de crecimiento.

- 15 En una realización, la estimulación del crecimiento de las plantas está provocada por una estimulación de la germinación de semillas o por una estimulación del crecimiento temprano.

Existen varios mecanismos por los cuales los microorganismos de la invención pueden estimular el crecimiento de las plantas. En primer lugar, la producción de compuestos estimulantes del crecimiento vegetal, tales como las fitohormonas, también puede desempeñar un papel. Por ejemplo, IAA rizobacteriano cambia las reservas de auxina de la planta, en última instancia aumentando la longitud de la raíz y el área superficial y, en el proceso, aumentando el nivel de exudados de la raíz disponibles para ser captados por las plantas; la citoquinina promueve la división celular, o citocinesis, en raíces y brotes de plantas; las giberelinas regulan diversos procesos de desarrollo, incluyendo elongación del tallo, germinación, dormancia, floración, desarrollo floral y senescencia de hojas y frutos.

25 En segundo lugar, una gran proporción del nitrógeno orgánico presente en los suelos se encuentra en forma de péptidos y proteínas. Al producir proteasas, los péptidos y las proteínas del suelo se hidrolizan, lo que hace que el N esté disponible para que las plantas lo capten.

30 En tercer lugar, se ha demostrado que el microorganismo de la invención forma biopelículas en la superficie de las raíces de las plantas hortícolas lo que tiene un efecto protector contra los organismos patógenos y, a su vez, promueve el crecimiento vegetal.

35 En cuarto lugar, convirtiendo el fosfato y el hierro orgánicos e inorgánicos insolubles en formas fácilmente accesibles para las plantas.

En quinto lugar, la producción de sideróforos puede prevenir o disminuir la proliferación de patógenos al reducir la cantidad de hierro disponible para un patógeno, que a su vez promueve el crecimiento vegetal.

40 En una realización, las semillas son de una monocotiledónea. En otra realización, las semillas son de una dicotiledónea.

### 3.2. Método para proteger una planta contra fitopatógenos

45 Se ha demostrado que la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* forma biopelículas en la superficie de las raíces de las plantas (Ejemplos 25 y 26). Dichas biopelículas ocupan por completo el nicho ecológico, previniendo la colonización de otros tipos de organismos patógenos de la rizosfera. Adicionalmente, la capacidad de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* de producir sideróforos (Ejemplo 1) también es importante para proteger las plantas contra patógenos. Los fitopatógenos pueden mantenerse en niveles bajos secuestrando el hierro disponible en el suelo con la producción de sideróforos.

50 Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para proteger una planta contra fitopatógenos, que comprende una etapa de aplicar una cantidad eficaz de un microorganismo de acuerdo con la invención a la planta.

55 En otra realización, también se aplica a la planta una cantidad eficaz de diferentes microorganismos de interés en la agricultura.

60 Alternativamente, el método para proteger una planta contra fitopatógenos puede comprender una etapa de aplicar una cantidad eficaz de un sobrenadante de acuerdo con la invención a la planta.

Alternativamente, el método para proteger una planta contra fitopatógenos puede comprender una etapa de aplicar una cantidad eficaz de un biofertilizante de acuerdo con la invención a la planta.

65 Alternativamente, el método para proteger una planta contra fitopatógenos puede comprender una etapa de aplicar una cantidad eficaz de un sustrato de acuerdo con la invención a la planta.

Alternativamente, el método para proteger una planta contra fitopatógenos puede comprender una etapa de aplicar una cantidad eficaz de un soporte sólido activo de acuerdo con la invención a la planta.

- 5 Alternativamente, el método para proteger una planta contra fitopatógenos puede comprender una etapa de sembrar una semilla de acuerdo con la invención.

Alternativamente, el método para proteger una planta contra fitopatógenos puede comprender una etapa de sembrar un cepellón de acuerdo con la invención.

- 10 Las expresiones "microorganismo de la invención", "sobrenadante de la invención", "fertilizante de la invención", "sustrato de la invención", "soporte sólido activo de la invención", "semilla de la invención" y "cepellón de la invención", se han descrito anteriormente en detalle y sus definiciones y realizaciones se incluyen aquí como referencia.

- 15 El término "fitopatógeno", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier organismo que es patógeno para las plantas. Los ejemplos de organismos fitopatógenos incluyen, sin limitación hongos; organismos similares a hongos, tales como oomicetos y phytomyxea; bacterias, tales como *Erwinia* spp., *Burkholderia*, *Xantomonas* spp. y *Pseudomonas* spp.; fitoplasmas y espiroplasmas; virus y viroides; protozoos, tales como *Phytophthora*; nematodos; y plantas parásitas, tales como muérdago y cuscúta.

- 20 En una realización, el fitopatógeno es un hongo. Los ejemplos de hongos cuyo crecimiento es detenido por el microorganismo de la invención, incluyendo sin limitación, *Phytophthora*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Alternaria*, etcétera.

- 25 La expresión "cantidad eficaz", como se usa en el contexto de este aspecto de la invención, se refiere a la cantidad del microorganismo de la invención, independientemente de la forma de presentación que se requiera para obtener el efecto deseado de proteger una planta frente a la colonización de fitopatógenos y con ello obtener resultados beneficiosos.

- 30 La cantidad eficaz de un microorganismo de acuerdo con este aspecto de la invención puede determinarse empíricamente mediante métodos que son convencionales en la técnica. Por ejemplo, diferentes cantidades del microorganismo de la invención, pueden aplicarse a diferentes plantas que se encuentran en la misma fase de desarrollo y sufren el mismo tipo de infección o infestación patógena. El crecimiento vegetal, es decir, el aumento de la biomasa y/o la presencia del fitopatógeno se monitoriza a lo largo del tiempo para determinar cuál de las cantidades probadas es eficaz.

- 35 La cantidad eficaz dependerá de la planta en particular, la fase de crecimiento y el área de influencia radicular, lo que puede traducirse como el tamaño de la planta, y también en el tipo particular de fitopatógeno que está colonizando la planta. La cantidad eficaz puede medirse en ufc totales del microorganismo de la invención, ufc del microorganismo de la invención por gramo de suelo rizosférico o cualquier otra unidad conveniente. La cantidad eficaz del microorganismo de la invención puede estar entre  $10^3$  y  $10^9$  ufc por gramo de suelo rizosférico. La cantidad eficaz del sobrenadante de la invención puede estar entre 1 ml y 10 l por m<sup>2</sup> de la superficie del suelo. La cantidad eficaz del fertilizante, del sustrato o del soporte sólido activo de la invención puede ser una cantidad que resulte entre  $10^3$  y  $10^9$  ufc por gramo de suelo rizosférico. Dichas cantidades pueden aplicarse en una sola administración o en varias administraciones.

- 45 El estado normal de prácticamente cualquier planta puede restaurarse de acuerdo con este método. A modo de ilustración, cualquier planta que tenga interés agrícola puede usarse para este método, incluyendo plantas de interés en la alimentación humana o animal, plantas de interés ornamental, plantas de interés forestal, plantas de interés energético, etcétera. Algunos ejemplos no limitantes incluyen avena, cebada, maíz, trigo, tomate, pimienta, pepino, fresa, moras, berenjena, césped, sorgo, rosales, geranios, margaritas, soja, cualquier árbol, tales como árboles frutales, roble, nogal, haya, pino, etc.

- 50 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se ha descrito que la formación de biopelículas por microorganismos promotores del crecimiento vegetal en las raíces de las plantas les proporciona una pantalla para bloquear la proliferación de fitopatógenos en las raíces (Rafique *et al.*, 2015. The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs., Capítulo: Bacterial biofilm formation and its role against agricultural pathogens, pp. 373-82. Editorial: Formatex Research Center, España, Ed.; A. Mendez Vil). Por otra parte, el secuestro de hierro insoluble del suelo por la producción de sideróforos limita su disponibilidad para otros fitopatógenos, que a su vez detiene su proliferación.

### 60 **3.3. Método para proteger una planta contra el estrés ambiental**

- Los presentes inventores han demostrado que el microorganismo de la invención es capaz de formar biopelículas tanto en superficies abióticas (Ejemplos 25 y 26) como en la superficie de raíces de plantas. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se ha descrito que la formación de biopelículas por parte de microorganismos promotores del crecimiento vegetal sobre las raíces de las plantas les proporciona una mayor protección frente a situaciones de estrés

abiótico tales como, por ejemplo, condiciones climáticas adversas, cambios de temperatura (por ejemplo, temperaturas altas o bajas), condiciones de alta salinidad y desecación o estrés hídrico (por ejemplo, sequía, etc.) (Tyerman *et al.*, 2012, Plant Cell & Environment 25:173-94; Mauch-Mani & Slusarenko, 1996, The Plant Cell 8:203-12, Chen, *et al.*, (2016), Physiologia plantarum, 158(1), 34-44 y Kasim, W. A., *et al.* (2016). Annals of Agricultural Sciences, 61(2), 217-227.).

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para restaurar el estado normal de una planta después de sufrir estrés ambiental, en lo sucesivo en el presente documento "el método para proteger una planta contra el estrés ambiental de la invención", que comprende la etapa de aplicar una cantidad eficaz del microorganismo de la invención.

Alternativamente, el método para proteger una planta contra el estrés ambiental de la invención puede comprender la etapa de aplicar el sobrenadante de la invención a la planta.

Se apreciará fácilmente que el microorganismo de la invención puede aplicarse de diferentes maneras, es decir, directamente al suelo, preferentemente al área de influencia radicular de la planta, o como parte de un fertilizante, o adherido a un sustrato o soporte sólido.

Alternativamente, el método para proteger una planta contra el estrés ambiental de la invención puede comprender la etapa de aplicar el fertilizante de la invención a la planta.

Alternativamente, el método para proteger una planta contra el estrés ambiental de la invención puede comprender la etapa de aplicar el sustrato de la invención a la planta.

Alternativamente, el método para proteger una planta contra el estrés ambiental de la invención puede comprender la etapa de aplicar el soporte sólido activo de la invención a la planta.

Alternativamente, la protección de una planta contra el estrés ambiental puede conseguirse mediante la adhesión del microorganismo de la invención a la semilla o cepellón de la planta a proteger. En consecuencia, el método para proteger una planta contra el estrés ambiental de la invención puede comprender la etapa de sembrar la semilla de la invención o el cepellón de la invención. La protección también puede conseguirse si la semilla o el cepellón de la invención se plantan cerca de la planta a proteger. Siempre que la semilla o el cepellón se planten lo suficientemente cerca del área de influencia radicular de la planta, el microorganismo de la invención se replicará y poblará áreas cercanas de la rizosfera.

Las expresiones "microorganismo de la invención", "sobrenadante de la invención", "fertilizante de la invención", "sustrato de la invención", "soporte sólido activo de la invención", "semilla de la invención" y "cepellón de la invención", se han descrito anteriormente en detalle y sus definiciones y realizaciones se incluyen aquí como referencia.

La expresión "estrés ambiental", como se usa en el presente documento, se refiere a situaciones abióticas que afectan a las condiciones óptimas para el crecimiento vegetal. Los ejemplos no limitantes de estrés ambiental incluyen condiciones climáticas adversas, tales como fríos intensos o heladas, cambios en la temperatura, incluyendo altas temperaturas o choque térmico, condiciones de desecación o estrés hídrico, salinidad, etc.

La expresión "cantidad eficaz", como se usa en el contexto de este aspecto de la invención, se refiere a la cantidad del microorganismo de la invención, independientemente de la forma de presentación que se requiera para obtener el efecto deseado de proteger una planta de una situación de estrés ambiental y con ello obtener resultados beneficiosos.

La cantidad eficaz de un microorganismo de acuerdo con este aspecto de la invención puede determinarse empíricamente mediante métodos que son convencionales en la técnica. Por ejemplo, diferentes cantidades del microorganismo de la invención, pueden aplicarse a diferentes plantas que se encuentran en la misma fase de desarrollo y han sufrido el mismo tipo de estrés ambiental. El crecimiento vegetal, es decir, el aumento en la biomasa, se monitoriza a lo largo del tiempo para determinar cuál de las cantidades probadas es eficaz.

La cantidad eficaz dependerá de la planta en particular, la fase de crecimiento y el área de influencia radicular, lo que puede traducirse como el tamaño de la planta, y también en el tipo particular de estrés ambiental que sufre la planta. La cantidad eficaz puede medirse en ufc totales del microorganismo de la invención, ufc del microorganismo de la invención por gramo de suelo rizosférico o cualquier otra unidad conveniente. La cantidad eficaz del microorganismo de la invención puede estar entre  $10^3$  y  $10^9$  ufc por gramo de suelo rizosférico. La cantidad eficaz del sobrenadante de la invención puede estar entre 1 ml y 100 l por m<sup>2</sup> de la superficie del suelo. La cantidad eficaz del fertilizante, del sustrato o del soporte sólido activo puede ser una cantidad que resulte entre  $10^3$  y  $10^9$  ufc por gramo de suelo rizosférico. Dichas cantidades pueden aplicarse en una sola administración o en varias administraciones.

Prácticamente cualquier planta puede protegerse contra el estrés ambiental mediante este método. A modo de ilustración, cualquier planta que tenga interés agrícola puede usarse para este método, incluyendo plantas de interés en la alimentación humana o animal, plantas de interés ornamental, plantas de interés forestal, plantas de interés energético, etcétera. Algunos ejemplos no limitantes incluyen avena, cebada, maíz, trigo, tomate, pimienta, pepino,

berenjena, césped, sorgo, rosales, geranios, margaritas, soja, cualquier árbol, tales como árboles frutales, roble, nogal, haya, pino, etc.

### 3.4. Métodos para solubilizar compuestos insolubles

#### 3.4.1. Método para solubilizar fosfatos insolubles en un sustrato sólido

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para solubilizar un fosfato insoluble en un sustrato sólido, en lo sucesivo en el presente documento "el método para solubilizar un fosfato insoluble en un sustrato sólido de la invención", que comprende la etapa de aplicar la cepa de acuerdo con la invención al sustrato sólido.

Alternativamente, el método para solubilizar un fosfato insoluble en un suelo de la invención comprende la etapa de aplicar el sobrenadante de la invención al suelo.

Se apreciará fácilmente que la cepa de la invención puede aplicarse de diferentes maneras, es decir, directamente al sustrato sólido por inyección, o como parte de un fertilizante, o adherida a un sustrato o soporte sólido.

Alternativamente, el método para solubilizar un fosfato insoluble en un sustrato sólido de la invención puede comprender la etapa de aplicar el fertilizante de la invención al sustrato sólido.

Alternativamente, el método para solubilizar un fosfato insoluble en un sustrato sólido de la invención puede comprender la etapa de aplicar el sustrato de la invención al sustrato sólido.

Alternativamente, el método para solubilizar un fosfato insoluble en un sustrato sólido de la invención puede comprender la etapa de aplicar el soporte sólido activo de la invención al sustrato sólido.

Las expresiones "sobrenadante de la invención", "fertilizante de la invención", "sustrato de la invención" y "soporte sólido activo de la invención", se han descrito anteriormente en detalle y sus definiciones y realizaciones se incluyen aquí como referencia.

El sustrato sólido puede contener al menos una fuente de fosfato insoluble. Prácticamente cualquier sustrato sólido que contenga un fosfato insoluble puede tratarse de acuerdo con este proceso para reducir total o parcialmente el contenido de fosfato insoluble; no obstante, en una realización particular, dicho sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble a tratar es roca fosfórica, tal como la roca fosfórica usada para producir fertilizantes fosfatados con contenido variable de fosfato insoluble.

Este proceso puede usarse para solubilizar todo o parte del fosfato insoluble presente en el sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble, por ejemplo, roca fosfórica usada para producir fertilizantes fosfatados, con el fin de reducir el contenido de fosfato insoluble presente en dichos fertilizantes fosfatados obtenidos a partir de dicha roca fosfórica.

El sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble a tratar puede mezclarse con un cultivo de la cepa variante de la invención, o con un sustrato de la invención, o con un soporte sólido activo de la invención, a una densidad de población bacteriana que puede variar dentro de un amplio intervalo. En una realización particular, se inoculan al menos 10 ufc por ml, al menos  $10^2$  ufc por ml, al menos  $10^3$  ufc por ml, al menos  $10^4$  ufc por ml, al menos  $10^5$  ufc por ml, al menos  $10^6$  ufc por ml, al menos  $10^7$  ufc por ml, al menos  $10^8$  ufc por ml, al menos  $10^9$  ufc por ml o más.

Después de la inoculación, la cepa de la invención se deja actuar durante al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 3 horas, al menos 4 horas, al menos 5 horas, al menos 10 horas, al menos 15 horas, al menos 20 horas, al menos 24 horas o más. La incubación se realiza preferentemente en condiciones aeróbicas. Si se desea, la cepa de la invención se elimina por métodos convencionales, tal como por medio de decantación, precipitación con electrolitos, centrifugación, etc. Si se desea, los microorganismos eliminados de la cepa de la invención pueden volver a usarse en un nuevo método de solubilización de un fosfato insoluble y/o hierro insoluble, en un sustrato sólido o en un suelo que contenga un fosfato insoluble y/o hierro insoluble.

Este proceso puede llevarse a cabo en un reactor, estanque o similar en el que se introduce el sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble a tratar, debidamente equipado con medios de suministro y drenaje de agua, sustrato sólido, inoculación de microorganismos de la invención y recuperación de los mismos. Si es necesario, la mezcla (sustrato sólido, agua y cepa de la invención formando opcionalmente parte de un fertilizante, sustrato o soporte sólido activo) se suplementa con una fuente de carbono y/o con una fuente de nitrógeno y/o nutrientes esenciales, con el fin de facilitar la supervivencia de la cepa variante de la invención. A modo de ilustración, pueden añadirse cantidades adecuadas de solución de micronutrientes junto con cantidades adecuadas de magnesio, cobalto y molibdeno, normalmente en el orden micromolar, para optimizar el proceso; no obstante, en cualquier caso, la elección y cantidad de nutrientes y micronutrientes a añadir dependerá de la composición del sustrato sólido que contiene un fosfato insoluble (por ejemplo, roca fosfórica) a tratar y de la demanda microbiológica.

### 3.4.2. Método para solubilizar fosfatos insolubles en un suelo

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para solubilizar un fosfato insoluble en un suelo, en lo sucesivo en el presente documento "el método para solubilizar un fosfato insoluble en un suelo de la invención", que comprende la etapa de aplicar la cepa de acuerdo con la invención sobre el suelo.

En otra realización, se aplica además al suelo una cantidad eficaz de diferentes cepas de interés agrícola.

Alternativamente, el método para solubilizar un fosfato insoluble en un suelo de la invención comprende la etapa de aplicar el sobrenadante de la invención al suelo. El experto en la materia apreciará que el tratamiento de solubilización del suelo que contiene fosfato insoluble puede llevarse a cabo de diversas formas. Por ejemplo, la etapa de aplicar la cepa de acuerdo con la invención sobre el suelo a tratar puede realizarse inyectando un cultivo de al menos una de las cepas de la invención en el suelo a tratar; o añadiendo a dicho suelo a tratar un fertilizante suplementado de la invención o mezclando en dicho suelo a tratar un soporte sólido activo de la invención; o sembrando una semilla de la invención o un cepellón de la invención en dicho suelo a tratar; o mezclando en dicho suelo a tratar un suelo de acuerdo con la invención.

Por lo tanto, el método para solubilizar un fosfato insoluble en un suelo puede comprender una etapa de aplicar el fertilizante de la invención al suelo.

Alternativamente, el método para solubilizar un fosfato insoluble en un suelo puede comprender una etapa de aplicar el sustrato de la invención al suelo.

Alternativamente, el método para solubilizar un fosfato insoluble en un suelo puede comprender una etapa de aplicar el soporte sólido activo de la invención al suelo.

Alternativamente, el método para solubilizar un fosfato insoluble en un suelo puede comprender una etapa de aplicar el suelo de la invención al suelo.

Alternativamente, el método para solubilizar un fosfato insoluble en un suelo puede comprender una etapa de sembrar una semilla de la invención o un cepellón de la invención en dicho suelo a tratar.

Alternativamente, el método para solubilizar un fosfato insoluble en un suelo puede comprender una etapa de sembrar un cepellón de la invención en dicho suelo a tratar.

Las expresiones "sobrenadante de la invención", "fertilizante de la invención", "sustrato de la invención", "soporte sólido activo de la invención", "semilla de la invención" y "cepellón de la invención", se han descrito anteriormente en detalle y sus definiciones y realizaciones se incluyen aquí como referencia.

El método para solubilizar un fosfato insoluble en un suelo puede llevarse a cabo en condiciones aeróbicas.

La cantidad particular de fosfato insoluble presente en el suelo puede hacer necesario volver a aplicar la cepa de la invención, independientemente de la forma de presentación. Por lo tanto, la etapa de aplicación de la deformación de acuerdo con la invención sobre el suelo puede llevarse a cabo una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más, hasta que se logre la solubilización parcial o completa del fosfato insoluble.

Prácticamente cualquier suelo que contenga un fosfato insoluble, tales como fosfato cálcico dibásico, fosfato cálcico tribásico o mezclas de diferentes fosfatos insolubles, puede tratarse de acuerdo con este método para reducir total o parcialmente el contenido de fosfato insoluble presente en el suelo. En una realización, dicho suelo es una capa superior del suelo agrícola, preferentemente una capa superior tratada, por ejemplo, con fertilizantes.

Si es necesario, el suelo a tratar se suplementa con una fuente de carbono y/o fuente de nitrógeno y/o nutrientes esenciales para facilitar la supervivencia de la cepa de la invención.

La inyección del microorganismo de la invención se realiza con el fin de lograr una alta densidad celular en el suelo a tratar, por ejemplo, de al menos  $10^3$  ufc por gramo de suelo a tratar, o de al menos  $10^4$  ufc por gramo de suelo a tratar, o de al menos  $10^5$  ufc por gramo de suelo a tratar, o de al menos  $10^6$  ufc por gramo de suelo a tratar, o de al menos  $10^7$  ufc por gramo de suelo a tratar.

En una realización particular, dicho método para la solubilización del fosfato insoluble presente en un suelo que contiene un fosfato insoluble se lleva a cabo mediante la adición a dicho suelo a tratar de un sustrato de la invención, que comprende la cepa de la invención. Las características de dicho sustrato de la invención se han descrito anteriormente. La cantidad de sustrato de la invención que se añade al suelo a tratar (suelo que contiene un fosfato insoluble) puede variar dentro de un amplio intervalo. No obstante, en una realización particular la cantidad de dicho sustrato de la invención que se añade al suelo a tratar es igual a o mayor que 0,01 kg de sustrato de la invención por

hectárea (ha) de suelo a tratar, normalmente igual a o mayor que 0,1 kg/ha, preferentemente igual a o mayor que 0,5 kg/ha de suelo a tratar, incluso más preferentemente igual a o mayor que 1 kg/ha de suelo a tratar, con el fin de facilitar la solubilización del fosfato insoluble.

5 En otra realización particular, dicho método para la solubilización del fosfato insoluble presente en un suelo que contiene un fosfato insoluble se lleva a cabo mediante la adición a dicho suelo a tratar de un soporte sólido activo de la invención, que comprende una cepa variante de la invención. Las características de dicho soporte sólido activo de la invención se han descrito anteriormente. La cantidad de soporte sólido activo de la invención que se añade al suelo a tratar (suelo que contiene un fosfato insoluble) puede variar dentro de un amplio intervalo. No obstante, en una  
10 realización particular la cantidad de dicho soporte sólido activo de la invención que se añade al suelo a tratar es igual a o mayor que 0,01 kg de soporte sólido activo de la invención por hectárea (ha) de suelo a tratar, normalmente igual a o mayor que 0,1 kg/ha, preferentemente igual a o mayor que 0,5 kg/ha de suelo a tratar, incluso más preferentemente igual a o mayor que 1 kg/ha de suelo a tratar, con el fin de facilitar la solubilización del fosfato insoluble.

15 En otra realización particular, dicho método para la solubilización del fosfato insoluble presente en un suelo que contiene un fosfato insoluble se lleva a cabo mediante la adición a dicho suelo a tratar de un fertilizante de la invención que comprende una cepa variante de la invención. Las características de dicho fertilizante de la invención se han descrito anteriormente. La cantidad de fertilizante de la invención que se añade al suelo a tratar (suelo que contiene un fosfato insoluble) puede variar dentro de un amplio intervalo, dependiendo de, entre otros factores, la cantidad de  
20 fosfato insoluble presente en el suelo a tratar y de la cantidad de cepa de la invención presente en el fertilizante de la invención.

En otra realización particular, el método para la solubilización del fosfato insoluble presente en un suelo que contiene fosfato insoluble se lleva a cabo mediante la siembra de dicho suelo a tratar con una semilla de la invención que  
25 comprende la cepa de la invención. Las características de dicha semilla de la invención se han descrito anteriormente. La cantidad de semillas suplementadas de la invención que se siembran en el suelo a tratar (suelo que contiene fosfato insoluble) puede variar dentro de un amplio intervalo, dependiendo de la densidad requerida por el agricultor.

En otra realización particular, el método para la solubilización del fosfato insoluble presente en un suelo que contiene  
30 fosfato insoluble se lleva a cabo mediante la siembra de dicho suelo a tratar con un cepellón de la invención que comprende la cepa de la invención. Las características de dicho cepellón de la invención se han descrito anteriormente. La cantidad de cepellones suplementados de la invención que se siembran en el suelo a tratar (suelo que contiene fosfato insoluble) puede variar dentro de un amplio intervalo, dependiendo de la densidad requerida por el agricultor.

35 Los métodos de solubilización de fosfatos insolubles descritos anteriormente proporcionan una serie de ventajas, incluyendo las siguientes:

- alta especificidad en la solubilización de fosfatos insolubles;
- funcionan en un amplio intervalo de concentraciones de fosfato, normalmente entre el 0,01 % y el 95 % (p/p) de  
40 fosfato; y
- son altamente versátiles ya que pueden usarse *in situ* para solubilizar dichos compuestos en suelos o en reactores para solubilizar fosfato, que puede usarse como fertilizante *per se* o en mezclas con otros compuestos.

### 3.4.3. Método para solubilizar hierro en un sustrato sólido

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para solubilizar hierro insoluble en un sustrato sólido, en lo sucesivo en el presente documento "el método para solubilizar hierro insoluble en un sustrato sólido de la invención", que comprende la etapa de aplicar al menos una cepa variante de acuerdo con la invención sobre el sustrato sólido.

50 En una realización, se aplica una cantidad eficaz de BIRD-6 al sustrato sólido.

Alternativamente, el método para solubilizar hierro insoluble en un sustrato sólido de la invención comprende la etapa de aplicar el sobrenadante de la invención al sustrato sólido.

55 Se apreciará fácilmente que la cepa de la invención puede aplicarse de diferentes maneras, es decir, directamente al sustrato sólido, o como parte de un fertilizante, adherida a un soporte sólido o como parte de un suelo.

60 Alternativamente, el método para solubilizar hierro insoluble en un sustrato sólido de la invención puede comprender la etapa de aplicar el fertilizante de la invención al sustrato sólido.

Alternativamente, el método para solubilizar hierro insoluble en un sustrato sólido de la invención puede comprender la etapa de aplicar el sustrato de la invención al sustrato sólido.

65 Alternativamente, el método para solubilizar hierro insoluble en un sustrato sólido de la invención puede comprender la etapa de aplicar el soporte sólido activo de la invención al sustrato sólido.

Alternativamente, el método para solubilizar hierro insoluble en un sustrato sólido de la invención puede comprender la etapa de aplicar el suelo de la invención al sustrato sólido.

- 5 Las expresiones "microorganismo de la invención", "sobrenadante de la invención", "fertilizante de la invención", "sustrato de la invención" y "soporte sólido activo de la invención", se han descrito anteriormente en detalle y sus definiciones y realizaciones se incluyen aquí como referencia.

- 10 El sustrato sólido puede contener al menos una fuente de hierro insoluble. Prácticamente cualquier sustrato sólido que contenga un hierro insoluble (por ejemplo, hierro insoluble del tipo óxido de hierro o cualquier otra forma de hierro) puede ser tratado de acuerdo con este método para reducir total o parcialmente el contenido de hierro insoluble. Los ejemplos no limitantes de sustratos sólidos que contienen hierro insoluble incluyen roca fosfórica, tal como la roca fosfórica usada para producir fertilizantes fosfatados con un contenido variable de fosfato insoluble, y un suelo, tal como una capa superior del suelo agrícola, una capa superior vegetal tratada con fertilizantes, etc.

- 15 El método puede comprender opcionalmente una etapa de eliminación de los microorganismos de la cepa de la invención.

- 20 Para llevar a cabo este método, el sustrato sólido que contiene hierro insoluble a tratar se mezcla con agua y la mezcla resultante se pone en contacto con un cultivo de la cepa de la invención, o con un fertilizante de la invención, o con un sustrato de la invención, o con un soporte sólido activo de la invención, a una densidad de población bacteriana que puede variar dentro de un amplio intervalo. En una realización particular, se inoculan al menos  $10^3$  ufc de la cepa de la invención por ml de agua. Después de la inoculación, se deja actuar la cepa de la invención, y al cabo de 1 a 24 horas, si se desea, dichos microorganismos se retiran por métodos convencionales, por ejemplo, mediante decantación, precipitación con electrolitos, centrifugación, etc. Si se desea, la cepa retirada de la invención puede volver a usarse en un nuevo método de solubilización microbiológica, en condiciones aeróbicas, de fosfato insoluble y/o hierro insoluble en un sustrato sólido o en un suelo que contenga fosfato insoluble y/o hierro insoluble.

- 30 Este método puede llevarse a cabo en un reactor, o piscina, en el cual se introduce el sustrato sólido que contiene hierro insoluble a tratar, y que está debidamente equipado con medios para el suministro y la descarga de agua, sustrato sólido, la inoculación de la cepa de la invención y la recuperación de la misma. Si es necesario, la mezcla (sustrato sólido, agua y cepa de la invención que opcionalmente forman parte de un sustrato o soporte sólido activo de la invención) se suplementa con una fuente de carbono y/o con una fuente de nitrógeno y/o nutrientes esenciales con el fin de facilitar la supervivencia de la cepa de la invención. A modo de ilustración, pueden añadirse cantidades adecuadas de una solución de micronutrientes junto con cantidades adecuadas de magnesio, cobalto y molibdeno, normalmente en el orden micromolar, para optimizar el método. No obstante, la selección y la cantidad de nutrientes y micronutrientes a añadir dependería, en cualquier caso, de la composición del sustrato sólido que contiene hierro insoluble a tratar y de la demanda microbiológica.

- 40 Este método puede usarse para solubilizar todo o parte del hierro insoluble presente en el sustrato sólido que contiene hierro insoluble con el fin de reducir el contenido de hierro insoluble presente en dicho sustrato sólido.

#### 3.4.4. Método para solubilizar hierro en un suelo

- 45 En otro aspecto, la invención se refiere a un proceso para la solubilización del hierro insoluble presente en un suelo que contiene hierro insoluble, en lo sucesivo en el presente documento "el método para solubilizar hierro insoluble en un suelo de la invención", que comprende poner en contacto dicho suelo que contiene hierro insoluble con la cepa de la invención.

- 50 En otra realización, se aplica además al suelo que contiene hierro insoluble una cantidad eficaz de diferentes cepas de interés agrícola.

- 55 Alternativamente, el método para solubilizar hierro insoluble en un suelo de la invención comprende la etapa de aplicar el sobrenadante de la invención al suelo que contiene hierro insoluble.

- 60 El experto en la materia apreciará que el tratamiento de solubilización del suelo que contiene hierro insoluble puede llevarse a cabo de diversas formas. Por ejemplo, la etapa de aplicar la cepa de acuerdo con la invención sobre el suelo a tratar puede realizarse inyectando un cultivo de al menos una de las cepas de la invención en el suelo a tratar; o añadiendo a dicho suelo a tratar un fertilizante suplementado de la invención o mezclando en dicho suelo a tratar un soporte sólido activo de la invención; o sembrando una semilla de la invención o un cepellón de la invención en dicho suelo a tratar; o mezclando en dicho suelo a tratar un suelo de acuerdo con la invención.

- 65 Alternativamente, el método para solubilizar hierro insoluble en un suelo de la invención puede comprender la etapa de aplicar el fertilizante de la invención al sustrato sólido. Alternativamente, el método para solubilizar hierro insoluble en un suelo de la invención puede comprender la etapa de aplicar el sustrato de la invención al sustrato sólido. Alternativamente, el método para solubilizar hierro insoluble en un suelo de la invención puede comprender la etapa

de aplicar el soporte sólido de la invención al sustrato sólido.

Alternativamente, el método para solubilizar un hierro insoluble en un suelo de la invención puede comprender una etapa de sembrar un cepellón de la invención en dicho suelo a tratar.

5 Las expresiones "sobrenadante de la invención", "fertilizante de la invención", "sustrato de la invención", "soporte sólido activo de la invención", "semilla de la invención" y "cepellón de la invención", se han descrito anteriormente en detalle y sus definiciones y realizaciones se incluyen aquí como referencia.

10 La cantidad particular de hierro insoluble presente en el suelo puede hacer necesario volver a aplicar la cepa de la invención, independientemente de la forma de presentación. Por lo tanto, la etapa de aplicación de la deformación de acuerdo con la invención sobre el suelo puede llevarse a cabo una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más, hasta que se logre la solubilización parcial o completa del hierro insoluble.

15 Prácticamente cualquier suelo que contenga hierro insoluble (por ejemplo, hierro insoluble del tipo óxido de hierro o cualquier otra forma de hierro) puede tratarse de acuerdo con este proceso para eliminar todo o parte del hierro insoluble para reducir total o parcialmente el contenido de hierro insoluble presente en el suelo a tratar; sin embargo, en una realización particular, dicho suelo que contiene hierro insoluble a tratar es un suelo, tal como una capa superior del suelo agrícola, una capa superior vegetal tratada con fertilizantes, etc. Si es necesario, el suelo a tratar se suplementa con una fuente de carbono y/o con una fuente de nitrógeno y/o con nutrientes esenciales para facilitar la supervivencia de los microorganismos de la cepa variante de la invención.

20 La inyección del microorganismo de la invención se realiza con el fin de lograr una alta densidad celular en el suelo a tratar, por ejemplo, de al menos  $10^3$  ufc por gramo de suelo a tratar, o de al menos  $10^4$  ufc por gramo de suelo a tratar, o de al menos  $10^5$  ufc por gramo de suelo a tratar, o de al menos  $10^6$  ufc por gramo de suelo a tratar, o de al menos  $10^7$  ufc por gramo de suelo a tratar.

25 En una realización particular, dicho método para la solubilización del hierro insoluble presente en un suelo que contiene un hierro insoluble se lleva a cabo mediante la adición a dicho suelo a tratar de un sustrato de la invención, que comprende la cepa de la invención.

30 Las características de dicho sustrato de la invención se han descrito anteriormente. La cantidad de sustrato de la invención que se añade al suelo a tratar (suelo que contiene un hierro insoluble) puede variar dentro de un amplio intervalo. No obstante, en una realización particular la cantidad de dicho sustrato de la invención que se añade al suelo a tratar es igual a o mayor que 0,01 kg de sustrato de la invención por hectárea (ha) de suelo a tratar, normalmente igual a o mayor que 0,1 kg/ha, preferentemente igual a o mayor que 0,5 kg/ha de suelo a tratar, incluso más preferentemente igual a o mayor que 1 kg/ha de suelo a tratar, con el fin de facilitar la solubilización del hierro insoluble.

35 En una realización particular, dicho método para la solubilización del hierro insoluble presente en un suelo que contiene un hierro insoluble se lleva a cabo mediante la adición a dicho suelo a tratar de un suelo suplementado de la invención, que comprende la cepa de la invención. Las características de dicho suelo de la invención se han descrito anteriormente. La cantidad de suelo de la invención que se añade al suelo a tratar (suelo que contiene un hierro insoluble) puede variar dentro de un amplio intervalo. No obstante, en una realización particular la cantidad de dicho suelo de la invención que se añade al suelo a tratar es igual a o mayor que 0,01 kg de soporte sólido activo de la invención por hectárea (Ha) de suelo a tratar, normalmente igual a o mayor que 0,1 kg/Ha, preferentemente igual a o mayor que 0,5 kg/Ha de suelo a tratar, incluso más preferentemente igual a o mayor que 1 kg/Ha de suelo a tratar, con el fin de facilitar la solubilización del hierro insoluble.

40 En otra realización particular, dicho método para la solubilización del hierro insoluble presente en un suelo que contiene hierro insoluble se lleva a cabo mediante la adición a dicho suelo a tratar de un fertilizante de la invención que comprende la cepa de la invención. Las características de dicho fertilizante de la invención se han descrito anteriormente. La cantidad de fertilizante de la invención que se añade al suelo a tratar (suelo que contiene un hierro insoluble) puede variar dentro de un amplio intervalo, dependiendo de, entre otros factores, la cantidad de hierro insoluble presente en el suelo a tratar y de la cantidad de cepa de la invención presente en el fertilizante de la invención.

45 En otra realización particular, el método para la solubilización del hierro insoluble presente en un suelo que contiene hierro insoluble se lleva a cabo mediante la siembra de dicho suelo a tratar con una semilla de la invención que comprende la cepa de la invención. Las características de dicha semilla de la invención se han descrito anteriormente. La cantidad de semillas suplementadas de la invención que se siembran en el suelo a tratar (suelo que contiene hierro insoluble) puede variar dentro de un amplio intervalo, dependiendo de la densidad requerida por el agricultor.

50 En otra realización particular, el método para la solubilización del hierro insoluble presente en un suelo que contiene hierro insoluble se lleva a cabo mediante la siembra de dicho suelo a tratar con un cepellón de la invención que comprende la cepa de la invención.

Las características de dicho cepellón de la invención se han descrito anteriormente. La cantidad de cepellones suplementados de la invención que se siembran en el suelo a tratar (suelo que contiene hierro insoluble) puede variar dentro de un amplio intervalo, dependiendo de la densidad requerida por el agricultor.

- 5 La solubilización del hierro, por ejemplo, mediante quelación por sideróforos, evita que el hierro esté disponible para los microorganismos patógenos, particularmente patógenos de plantas, ejerciendo de esta manera un control biológico sobre las poblaciones microbianas no deseadas en la agricultura. Esta ventaja puede obtenerse mediante el uso de la cepa de la invención.
- 10 La presente invención también contempla métodos para solubilizar fosfatos insolubles y hierro insoluble en un sustrato sólido o un suelo que comprende fosfatos insolubles y hierro, que comprende la etapa de aplicar la cepa variante de acuerdo con la invención al sustrato sólido o al suelo. El experto en la materia apreciará que este método es una combinación de los métodos para solubilizar fosfatos insolubles y los métodos para solubilizar hierro insoluble que se han descrito anteriormente.

#### 15 **4. Usos**

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del microorganismo de la invención, o del sobrenadante de la invención, o del fertilizante, de la semilla, del cepellón, del sustrato o del soporte sólido activo de acuerdo con la invención, para estimular el crecimiento vegetal.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del microorganismo de la invención, o del sobrenadante de la invención, o del fertilizante, de la semilla, del cepellón, del sustrato o del soporte sólido activo de acuerdo con la invención, para proteger una planta contra fitopatógenos.

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del microorganismo de la invención, o del sobrenadante de la invención, o del fertilizante, de la semilla, del cepellón, del sustrato o del soporte sólido activo de acuerdo con la invención, para proteger una planta contra el estrés ambiental.

30 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del microorganismo de la invención, o del sobrenadante de la invención, o del fertilizante, de la semilla, del cepellón, del sustrato o del soporte sólido activo de acuerdo con la invención, para solubilizar un fosfato insoluble en un sustrato sólido o un campo.

35 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del microorganismo de la invención, o del sobrenadante de la invención, o del fertilizante, de la semilla, del cepellón, del sustrato o del soporte sólido activo de acuerdo con la invención, para solubilizar hierro en un sustrato sólido o un campo.

40 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del microorganismo de la invención, o del sobrenadante de la invención, o del fertilizante, de la semilla, del cepellón, del sustrato o del soporte sólido activo de acuerdo con la invención, para solubilizar un fosfato y hierro insolubles en un sustrato sólido o un campo.

#### **5. Métodos para preparar un vehículo mineral y vehículos minerales que contienen los microorganismos de la invención**

45 En otra realización, la invención se refiere a un método para preparar un vehículo mineral que contiene un microorganismo que comprende poner en contacto un cultivo del microorganismo de acuerdo con la invención con un vehículo mineral en condiciones adecuadas para la unión del microorganismo al vehículo.

50 El término "vehículo", como se usa en el presente documento, se refiere a un soporte sólido, que es una estructura que tiene una superficie o superficies rígidas o semirrígidas que proporcionan un sustrato sobre el que pueden unirse los microorganismos

En una realización preferida, el vehículo es un vehículo mineral. En una realización más preferida. El vehículo mineral es una arcilla. En una realización aún más preferida, la arcilla es sepiolita o talco.

55 En otra realización, la invención se refiere a un vehículo mineral que comprende un microorganismo de acuerdo con la invención.

60 En una realización preferida, el vehículo es un vehículo mineral. En una realización más preferida. El vehículo mineral es una arcilla. En una realización aún más preferida, la arcilla es sepiolita o talco.

#### **DEPÓSITOS DE MATERIAL BIOLÓGICO**

65 La cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* se depositó en la Colección Española de Cultivos Tipo (en inglés, the Type Culture Spanish Collection, CECT) (Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino 9, 46980 Paterna, España) en las condiciones estipuladas en el Tratado de Budapest. Se depositó el 23 de octubre de

2018 y el número asignado a dicho depósito fue CECT 9748.

Estos aspectos de la invención explotan el uso de la cepa de acuerdo con la invención, o el sobrenadante de acuerdo con la invención, o el fertilizante, la semilla, el cepellón, el sustrato, el soporte sólido activo o el suelo de acuerdo con la invención en los métodos de la invención descritos anteriormente.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Aislamiento de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp.

Una muestra de suelo de 10 g obtenida de un jardín en Pinos Genii (Granada, España) se suspendió en medio de cultivo M9 (Abril *et al.*, 1989, J Bacteriology 171:6782-90), a 1:10 (p:v), la composición específica por litro de la cual era: 6,4 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,25 g de NaCl, 0,5 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 ml de  $\text{MgSO}_4$  1 M, 1 ml de citrato férrico al 6 % (p:v), 10 ml de benzoato sódico 1 M. Este enriquecimiento inicial se usó para inocular el cepellón de un limonero en maceta, el cual se colocó en un invernadero con humedad y temperatura del aire controladas durante más de un mes. Después de este tiempo, la raíz y el suelo adyacente se recogieron y se colocaron en un matraz Erlenmeyer estéril con medio M9 añadido y se agitaron en presencia de perlas de vidrio durante la noche. Después, se cultivaron diluciones en serie diluciones en serie en este medio de cultivo con glucosa o benzoato sódico como la fuente de carbono, lo que permitió el aislamiento de una amplia gama de microorganismos.

Se realizó una serie de ensayos para establecer cuál de las cepas tenía más propiedades para promover el crecimiento de las plantas y mejorar la resistencia contra los fitopatógenos. Las características que se consideraron más importantes son (i) la producción de compuestos capaces de hacer biodisponible el nitrógeno proteico, (ii) la producción de compuestos capaces de reciclar fuentes de carbono a partir de materia orgánica, (iii) la producción de compuestos capaces de proteger la planta contra fitopatógenos, (iv) la producción de precursores de fitohormonas, (v) solubilización de fosfato y (vi) solubilización de hierro.

La selección de cepas que tenían las características anteriores (i)-(vi) fue la siguiente:

- i) Para probar la producción de compuestos con actividad digestiva de nitrógeno orgánico (por ejemplo, proteínas y péptidos), tales como enzimas para hacer biodisponible el nitrógeno proteico (por ejemplo, proteasas), el medio usado fue medio sólido que contenía leche desnatada (Naik *et al.*, 2008, Microbial Ecology 56:492-504). Brevemente, la composición específica por litro de este medio de cultivo es peptona, 5 g; extracto de levadura, 2,5 g; glucosa, 1 g; 100 ml de solución de leche desnatada al 7 % (p:v); agar, 15 g. Aquellas colonias que exhibían un halo claro en los medios que rodeaban a la colonia se consideraron positivas.
- ii) Probar la producción de compuestos con actividad digestiva de materia orgánica como  $\beta$ -glucosidasas (enzimas que biodisponibles azúcares derivados de materia vegetal), el medio usado fue medio sólido que contenía agar LB, cuya composición específica por litro es: bacto-triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; 10 g de NaCl, modificado con esculina al 0,1 % (p:v) y citrato de hierro (III) amónico al 0,05 % (p:v) y agar al 1,5 % (Gong *et al.*, 2012, Notas de investigación de BMC 5:1). La presencia de un halo negro alrededor de las colonias denota una reacción positiva.
- iii) Para probar la producción de enzimas hidrolíticas con actividad biocontroladora tales como amilasas, lipasas y proteasas, se realizaron varios ensayos:
  - a. Para la actividad amilasa, el medio usado fue una placa de agar LB (como se describe en (ii)) modificada con un 2 % (p:v) de almidón soluble y, a continuación, después del crecimiento visible del microorganismo, se tiñó con el reactivo de Lugol (Tindall, B. J., Sikorski, J., Smibert, R. A., & Krieg, N. R., 2007. Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. En Methods for General and Molecular Microbiology, Tercera edición (pp. 330-93). American Society of Microbiology). La presencia de un halo transparente alrededor de las colonias denota una reacción positiva.
  - b. Para la actividad lipasa el medio usado fue peptona 4,3 g, peptona de caseína 4,3 g, NaCl 6,4 g y agar al 1,5 %, modificado con aceite de oliva al 3 % y rodamina B al 0,001 % (Kouker & Jaeger, 1987, Appl Environ Microbiol. 53:211-3). Después de la incubación, las placas se colocaron bajo luz ultravioleta (365 nm) y las colonias rodeadas de un halo naranja fluorescente se consideraron positivas.
  - c. Para la actividad proteasa, el ensayo se realizó como se describe en (i).
- iv) Para probar la producción de hormonas vegetales o sus agentes promotores, tales como ácido indolacético (IAA), el medio usado fue LB modificado (Naik *et al.*, 2008; como anteriormente), cuya composición específica por litro es: bacto-triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; NaCl 10 g; L-triptófano, 1,025 g; dodecilsulfato sódico (SDS) 600 mg; 10 ml de glicerol; y 15 g de agar. Se colocó un disco de papel Whatman n.º 1 sobre el medio con el microorganismo inoculado. Después de la incubación, se puso en contacto el disco de papel Whatman con reactivo de Salkowsky cuya composición específica por litro es del 2 % (v/v) de una solución de  $\text{FeCl}_3$  0,5 M en una solución de ácido perclórico al 35 % (v/v). Si aparece un color rojizo en el papel Whatman después de 1 h de incubación, la producción de IAA se consideró positiva.
- v) Para probar la solubilización de fosfato orgánico e inorgánico, se realizaron varios ensayos:

- 5 a. Para la solubilización de fosfato inorgánico, el medio usado fue Agar Pikovskaya (Naik *et al.*, 2008; como anteriormente), cuya composición específica por litro es:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5 g; KCl 0,2 g;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,1 g;  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  0,1 mg;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,1 mg y agar 15 g. Si se observa un halo transparente en el medio alrededor de la colonia, la producción de fosfatasa se considera positiva.
- 10 b. Para la solubilización de fosfato orgánico, el medio usado fue fitato sódico al 0,4 % (p:v), D-glucosa 10 g,  $\text{CaCl}_2$  2 g,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  5 g, KCl 0,5 g,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,01 g,  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  0,01 g y Agar 15 g (Housseinkhani *et al.*, 2009, African J Biotechnol 8:4229-32). Si se observa un halo transparente en el medio alrededor de la colonia, la producción de fitasa se considera positiva.
- 15 vi) Para probar la producción de sideróforos (sustancias quelantes del hierro que permiten la asimilación del hierro por las plantas), el medio usado fue CAS Agar (Alexander & Zuberer, 1991, Biology Fertility Soils 12:39), cuya composición específica por litro es de 50 ml de solución CAS (Cromo Azurol S) (1,21 mg/ml); 10 ml de  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (1 mM) diluido en HCl 10 mM; 40 ml de hexadeciltrimetamonio (HDTMA) (1,82 mg/ml); 30,24 g de piperazina-1,4-bis (PIPES); 0,3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5 g de NaCl; 1 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 2 g de glucosa; 2 g de manitol; 493 mg  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 12,5 mg de  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 1,17 mg de  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ; 1,4 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,04 mg de  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ; 1,2 mg de  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,08 mg de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  y 3 mg de casaminoácidos. Si se observa un halo amarillo en el medio que rodea la colonia del microorganismo, la producción de sideróforos se consideró positiva.
- 20 La colonia que produjo la mayor cantidad de características de biocontrol y promoción del crecimiento vegetal de todas las citadas anteriormente y que mostró la eficiencia más alta, es decir, produjo la reacción positiva más notable en el menor tiempo en todos los medios, era una cepa denominada BIRD-6. La cepa aislada exhibió forma bacilar y no
- 25 mostró pigmentación cuando se cultivó en medio LB mínimo o rico (Lennox E.S. 1955, Transduction of Linked Genetic Characters of the host by bacteriophage P1., Virology, 1:190). Cuando se cultivó en medio mínimo, la cepa fue capaz de usar o podría usar sacarosa, glucosa y otras fuentes de carbono y varios compuestos nitrogenados como fuente de nitrógeno.
- 30 Se confirmó que la cepa BIRD-6 pertenecía a la especie *Bacillus* mediante la secuenciación parcial del gen que codifica el ARNr 16S, usado como un marcador filogenético, usando cebadores GM3 (5'-AGAGTTTGATCCTGGC-3', SEQ ID NO: 1) y GM4 (5'-TACCTTGTACGACTT-3', SEQ ID NO: 2) en presencia de polimerasa Taq. Se amplificó y se secuenció un fragmento de ADN. La secuencia resultante exhibió una identidad del 99 % con diferentes cepas de la especie *Bacillus*. La secuencia obtenida tras secuenciar el producto de PCR usando el cebador GM3 fue como sigue: >BIRD6\_16SrRNA (SEQ ID NO:3)

CATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACG  
 GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC  
 GGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCT  
 TCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC  
 GGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG  
 GGA CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC  
 AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGAT  
 CGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTT  
 GACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT  
 ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGG  
 TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAAC  
 TGGGGA ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAAT  
 GCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA ACT  
 GACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC  
 CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGC  
 AGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAA  
 AGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCA  
 ACACGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACG  
 TCCCCTTCGGGGGCGAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTG  
 TGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGC  
 ATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG  
 ATGACGT

La cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. se depositó en la Colección Española de Cultivos Tipo (en inglés, the Type Culture Spanish Collection, CECT) con el número de registro CECT 9748.

La capacidad de *Bacillus* sp. BIRD-6 (CECT 9748) para producir compuestos que promueven el crecimiento de las plantas se probó en un ensayo de estimulación de la germinación de semillas. Brevemente, el ensayo consiste en sembrar semillas (cebada, maíz, césped, Avexill, etc.) en placas de Petri que contengan suelo apropiado mezclado con bacterias de *Bacillus* sp. BIRD-6 (CECT 9748) que tiene una densidad bacteriana del orden de  $10^6$  a  $10^7$  unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de suelo, seguido de incubación en condiciones que permitan la germinación de las semillas (20 °C y oscuridad). El porcentaje de germinación de semillas se determinó como en los Ejemplos 14-20 (por favor véase a continuación).

#### **Ejemplo 2: Hidrólisis de proteínas por *Bacillus* sp. BIRD-6 (CECT 9748)**

Para probar la producción de compuestos con actividad digestiva de nitrógeno orgánico y péptidos, es decir, enzimas que hacen que el nitrógeno proteico esté biodisponible, el medio usado fue medio sólido que contenía leche desnatada (Naik *et al.*, 2008, como anteriormente). Brevemente, la composición específica por litro de este medio de cultivo es peptona, 5 g; extracto de levadura, 2,5 g; glucosa, 1 g; 100 ml de solución de leche desnatada al 7 % (p:v); agar, 15 g. Las colonias BIRD-6 produjeron un halo transparente, indicando la producción de proteasas.

#### **Ejemplo 3: Degradación de la materia orgánica por *Bacillus* sp. BIRD-6 (CECT 9748)**

Probar la producción de enzimas con actividad digestiva de materia orgánica como  $\beta$ -glucosidasas, es decir, enzimas que hacen que los azúcares derivados de materia vegetal estén biodisponibles, el medio usado fue medio sólido que contenía agar LB, cuya composición específica por litro es: bacto-triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; 10 g de NaCl, modificado con esculina al 0,1 % (p:v) y citrato de hierro (III) amónico al 0,05 % (p:v) y agar al 1,5 % (Gong *et*

*al.*, 2012; como anteriormente). Las colonias BIRD-6 produjeron un halo negro, indicando la producción de  $\beta$ -glucosidasas.

#### **Ejemplo 4: Hidrólisis del almidón en azúcares por *Bacillus* sp. BIRD-6 (CECT 9748)**

Para la actividad amilasa, el medio usado fue una placa de agar LB (como se describe en (ii)) modificada con un 2 % (p:v) de almidón soluble y, a continuación, después del crecimiento visible del microorganismo, se tiñó con el reactivo de Lugol (Tindall *et al.*, 2007; como anteriormente). Las colonias BIRD-6 produjeron un halo transparente, indicando la degradación del almidón.

#### **Ejemplo 5: Hidrólisis de grasas por *Bacillus* sp. BIRD-6 (CECT 9748)**

Para la actividad lipasa el medio usado fue peptona 4,3 g, peptona de caseína 4,3 g, NaCl 6,4 g y agar al 1,5 %, modificado con aceite de oliva al 3 % y rodamina B al 0,001 % (Kouker & Jaeger, 1987; como anteriormente). Después de la incubación, las placas se colocaron bajo luz UV (365 nm) y las colonias de la cepa BIRD-6 mostraron un halo fluorescente naranja, indicando la capacidad para degradar las grasas.

#### **Ejemplo 6: Producción de fitohormonas por *Bacillus* sp. BIRD-6 (CECT 9748)**

Para probar la producción de hormonas vegetales o sus agentes promotores, tales como ácido indolacético (IAA), el medio usado fue LB modificado (Naik *et al.*, 2008; como anteriormente), cuya composición específica por litro es: bacto-triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; NaCl 10 g; L-triptófano, 1,025 g; dodecilsulfato sódico (SDS) 600 mg; 10 ml de glicerol; y 15 g de agar. Se colocó un disco de papel Whatman n.º 1 sobre el medio con el microorganismo inoculado. Después de la incubación, se puso en contacto el disco de papel Whatman con reactivo de Salkowsky cuya composición específica por litro es del 2 % (v/v) de una solución de  $\text{FeCl}_3$  0,5 M en una solución de ácido perclórico al 35 % (v/v). Las colonias de la cepa BIRD-6 produjeron un color rojizo en el papel Whatman después de 1 h de incubación, indicando que la producción de IAA se consideró positiva para esta cepa.

#### **Ejemplo 7: Solubilización de fosfato inorgánico por *Bacillus* sp. BIRD-6 (CECT 9748)**

Para la solubilización de fosfato inorgánico, el medio usado fue Agar Pikovskaya (Naik *et al.*, 2008; como anteriormente), cuya composición específica por litro es:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5 g; 0,2 g de KCl; 0,1 g de  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 mg de  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 mg de  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  y 15 g de agar. Las colonias BIRD-6 produjeron un halo transparente, indicando la degradación del fosfato inorgánico insoluble.

#### **Ejemplo 8: Solubilización de fosfato orgánico por *Bacillus* sp. BIRD-6 (CECT 9748)**

Para la solubilización de fosfato orgánico, el medio usado fue fitato sódico al 0,4 % (p:v), D-glucosa 10 g,  $\text{CaCl}_2$  2 g,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  5 g, KCl 0,5 g,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,01 g,  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  0,01 g y Agar 15 g (Housseinkhani *et al.*, 2009; como anteriormente). Las colonias BIRD-6 produjeron un halo transparente, indicando la degradación del fosfato orgánico insoluble.

#### **Ejemplo 9: Solubilización del hierro por *Bacillus* sp. BIRD-6 (CECT 9748)**

Para probar la capacidad de solubilizar el hierro mediante la producción de sideróforos (sustancias quelantes del hierro que permiten la asimilación del hierro por las plantas), el medio usado fue CAS Agar (Alexander & Zuberer, 1991; como anteriormente), cuya composición específica por litro es de 50 ml de solución CAS (Cromo Azurol S) (1,21 mg/ml); 10 ml de  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (1 mM) diluido en HCl 10 mM; 40 ml de hexadeciltrimetiamonio (HDTMA) (1,82 mg/ml); 30,24 g de piperazina-1,4-bis (PIPES); 0,3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5 g de NaCl; 1 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 2 g de glucosa; 2 g de manitol; 493 mg  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 12,5 mg de  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1,17 mg de  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ; 1,4 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,04 mg de  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ; 1,2 mg de  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,08 mg de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  y 3 mg de casaminoácidos. Las colonias BIRD-6 produjeron un halo amarillo, indicando la degradación del fosfato orgánico insoluble.

#### **Ejemplo 10: Uso de fosfato de calcio tribásico como fuente de fósforo por la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp.**

Un cultivo de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. se inoculó con  $10^3$  ufc/ml de microorganismos en medio MA modificado (composición específica por litro:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 267 mg;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 410 mg; KCl, 300 mg; NaCl, 200 mg; y 1 ml de una solución acuosa de citrato de hierro (6 g/l) y 2,5 ml de la solución de micronutrientes, como se describe por Abril *et al.*, 1989 (como arriba) que contiene un intervalo entre el 0,1 y el 5 % (p:v) de fosfato de calcio tribásico como fuente de fosfato y sacarosa como una fuente de carbono. El cultivo se incubó con agitación (entre 50 y 200 rpm) en una incubadora orbital Kuhner y se controló el crecimiento en el tiempo. Durante la fase de crecimiento exponencial, las bacterias se duplicaron cada 3 a 3,5 horas y los cultivos alcanzaron más de  $2 \times 10^9$  UFC/ml después de 24-48 horas de incubación.

#### **Ejemplo 11: Uso de fosfato insoluble como una fuente de fósforo por la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus***

**sp. en condiciones aeróbicas**

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 10 pero usando roca fosfórica moldeada que contenía del 15 al 30 % de  $P_2O_5$  cuyo tamaño de grano era inferior a 3 mm, como la fuente de fosfato. Se añadió una cantidad entre el 0,1 y el 5 % (p:v) de roca fosfórica observando que la duplicación se producía en unas 4 horas. Los cultivos alcanzaron densidades celulares entre  $10^8$  y  $10^9$  ufc/ml. Este resultado indica que la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* puede usar fosfato insoluble como una fuente de fosfato.

**Ejemplo 12: Solubilización de fósforo a partir de roca fosfórica**

Diez gramos de roca fosfórica que contiene un 27 % de  $P_2O_5$  se introdujeron en un cubo que contenía 100 ml de agua y se suplementó con los nutrientes descritos en el ejemplo 10 y la solución de micronutrientes descrita por Abril *et al.* (Abril *et al.*, 1989; como anteriormente) y un 1 % (p/v) de sacarosa. La solución se inoculó con un cultivo que tenía al menos  $10^3$  bacterias de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* El cultivo se incubó a 30 °C y se aireó mediante agitación. La concentración de fósforo se determinó cada 24 horas. Se observó que entre el 0,1 % y el 0,5 % del fósforo se solubilizaba después de 24 h y que la cantidad de fósforo solubilizado aumentaba del 2 al 5 % después de 96 horas.

Estos resultados indican que la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* puede solubilizar el fosfato de la roca fosfórica.

**Ejemplo 13: Uso de trazas de hierro de roca fosfórica como fuente de hierro por la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* en condiciones aeróbicas**

La CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* se inoculó a  $10^3$  ufc en medio M9 (Abril *et al.*, 1989; como anteriormente), modificado con un 1 % (p:v) de roca fosfórica moldeada que contiene del 15 al 30 % de  $P_2O_5$  cuyo tamaño de grano fue menor a 3 mm, y sin hierro suplementado. El cultivo se incubó a 30 °C con agitación (entre 50 y 200 rpm) en una incubadora orbital tipo Kuhner. Las células viables se contaron en diferentes momentos observando que la densidad de población se duplicaba cada 6 horas aproximadamente, hasta que se alcanzaron densidades celulares altas del orden de  $10^8$  a  $10^9$  ufc/ml. Este resultado indica que la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* puede usar pequeñas cantidades de hierro de la roca fosfórica como fuente de hierro.

**Ejemplo 14: Promotor del crecimiento vegetal: Estimulación de la germinación de semillas de plantas hortícolas**

Semillas de diferentes plantas hortícolas de interés comercial en agricultura (diferentes tipos de pimiento, pepino, tomate y maíz) y se mezclaron con un cultivo puro de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* sin agitación. Se sembraron al menos 100 semillas de cada una de las plantas seleccionadas tratadas con dicho microorganismo en placas de Petri que contenían 30 g de suelo agrícola. Los controles se realizaron usando el mismo número de semillas de cada una de las plantas que se trataron solo con agua.

Las placas se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente (18-22 °C aproximadamente). Tres días más tarde, se contaron las semillas germinadas para determinar el porcentaje de germinación. Se obtuvieron los siguientes resultados:

- porcentaje de germinación de semillas no tratadas: igual a o menos del 65 %;
- porcentaje de germinación de semillas tratadas con la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.*: igual o superior al 95 %.

Este ejemplo ilustra que la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* estimula la germinación de semillas de plantas hortícolas y, por tanto, promueve el crecimiento de tales plantas.

**Ejemplo 15: Estimulación de la germinación de semillas de cebada**

Se sembraron doscientas cincuenta semillas de cebada en cajas Petri que contenían 40 g de suelo agrícola, con un pH de 7,5, que se había mezclado previamente con la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* a  $10^6$  ufc/g suelo. Como un control, se sembraron 250 semillas de cebada en cajas Petri con el mismo suelo agrícola (pH 7) sin adición del microorganismo.

El porcentaje de germinación de semillas se determinó después de 4 días de incubación a 20 °C en la oscuridad. Se observó que el porcentaje de germinación de semillas de cebada en suelo agrícola sin bacterias fue del 80 %, mientras que la tasa de germinación de semillas alcanzó el 98,6 % en suelo tratado con *Bacillus sp.* BIRD-6 (CECT 9748).

**Ejemplo 16: Estimulación de la germinación de semillas de césped**

Se repitió el ensayo descrito en el Ejemplo 15 usando semillas de césped en lugar de cebada. Se observó que el porcentaje de germinación de semillas de césped en suelo sin bacterias fue del 92 %, mientras que alcanzó una tasa

del 100 % en suelo suplementado con la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* Además, se observó que el sistema radicular de las plántulas era entre 1,2x y 1,5x más grueso que el de los controles.

#### **Ejemplo 17: Estimulación de la germinación de semillas de maíz**

Se repitió el ensayo descrito en el Ejemplo 15 usando semillas de maíz en lugar de semillas de cebada. Se observó que el porcentaje de germinación de semillas de maíz en suelo sin bacterias el 93 %, mientras que alcanzó el 100 % en suelo tratado con la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.*

#### **Ejemplo 18: Promoción del crecimiento vegetal: Estimulación del crecimiento de plantas hortícolas**

El potencial fitoestimulante de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* se probó en un sustrato orgánico del suelo (turba). Brevemente, un cultivo puro o una suspensión acuosa de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* se mezcló con turba obteniendo un sustrato sólido activo (turba + microorganismos). Después este sustrato sólido se mezcló con semillas de diferentes plantas hortícolas de interés agrícola (pimiento, pepino, tomate y maíz). Las mezclas resultantes se plantaron en suelo agrícola y con el tiempo (dependiendo de la planta), los porcentajes de germinación de semillas, la longitud del tallo y la raíz y las épocas de floración y cosecha se determinaron. Como un control, el mismo número de semillas se sembró sobre soportes sólidos que fueron tratados con agua solamente.

El porcentaje de germinación de las semillas tratadas con la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* fue igual o superior al 95 %.

A lo largo de cosechas sucesivas se observó que las plantas que habían sido tratadas con la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* aumentaron la longitud de sus tallos en al menos un 5 % y, con el maíz, las raíces secundarias aumentaron considerablemente hasta un 10 % a un 50 % del peso fresco.

En cuanto a la floración y los frutos, se observaron cosechas tempranas, en algunos casos incluso tan pronto como 10 a 15 días antes en plantas tratadas con la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.*

De nuevo, este ejemplo demuestra que la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* favorece la longitud del tallo y aumenta el número de raíces secundarias durante las primeras semanas de desarrollo de las plantas hortícolas y herbáceas y acelera los cultivos. Puede concluirse que la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* favorece el crecimiento de las plantas anteriormente mencionadas.

#### **Ejemplo 19: Estimulación del crecimiento temprano de las plantas de maíz**

Para determinar el potencial fitoestimulante de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* sobre un soporte sólido (sepiolita), se llevaron a cabo una serie de ensayos de invernadero en los que se mezcló un suelo agrícola con arena de sílice y sepiolita a los que los microorganismos CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* se adhirieron hasta una densidad final de al menos  $10^5$  microorganismos por gramo de mezcla, en mezclas 2:1:1; 2:1:0,1 y 2:1:0,01 (suelo agrícola: arena de sílice: sepiolita con *Bacillus sp.* BIRD-6). Se sembraron semillas de maíz en esas mezclas bien homogeneizadas y se determinó el porcentaje de germinación y la longitud del tallo a lo largo del tiempo después de la siembra. Los controles se realizaron con sepiolita sin tratar.

Se observó que el tallo de plantas de maíz en cultivos con *Bacillus sp.* BIRD-6 fueron entre un 7 % y un 10 % más altos que los tallos de plantas de maíz sembradas en suelos sin *Bacillus sp.* BIRD-6, aunque después de 20 días de crecimiento la longitud del tallo de las plantas de maíz tendió a ser igual.

#### **Ejemplo 20: Suplemento para semillas**

Microorganismos de *Bacillus sp.* BIRD-6 (CECT 9748) se adhirieron a un polímero orgánico tal como alginato y gel de carbopol (una mezcla de mucílago mucoso (CARBOPOL 940) y trietanolamina) y la mezcla se puso en contacto con diferentes semillas de interés tanto agronómico como ambiental, tales como berenjena, calabacín, judías, habas, melón, tomate, etc. y petunia y crisantemo. La concentración de *Bacillus sp.* BIRD-6 (CECT 9748) tenía al menos  $10^5$  ufc por gramo de semilla. Las semillas se sembraron y se evaluaron después de un período de tiempo apropiado para cada tipo de planta. Los controles implicaron la siembra de semillas no tratadas.

Se obtuvieron resultados satisfactorios en todos los casos con adelantamiento en la germinación y al menos un 10 % de aumento en el tamaño de la raíz y el avance del estado fenológico de la planta.

#### **Ejemplo 21: Protección contra la proliferación de fitopatógenos fúngicos**

Los ensayos se realizaron con la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* (Ejemplo 1) para determinar su capacidad para prevenir el crecimiento de hongos tales como *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phythyum ultimum*, etc. Una sección de micelio activo de los hongos a probar, se colocó en una placa de Petri en Agar Dextrosa de Patata, que es un medio de crecimiento específico para hongos que tiene una

composición específica por litro es de 4 g de almidón de patata; 20 g de dextrosa y 15 g de agar (Masago *et al.*, 1976, *Phytopathology* 67:425). Cuatro gotas de 20 µl del cultivo de la *Bacillus sp.* BIRD-6 (CECT 9748) se colocaron frente a 20 volúmenes de un microorganismo de control que no ejerció ningún efecto sobre el crecimiento de los hongos probados, por ejemplo, *Pseudomonas putida* KT2440.

Después de un período de incubación de no menos de una semana a temperatura ambiente, se observó que la cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* (CECT 9748) inhibió el crecimiento de hongos entre un 50 % y un 75 %. Este ejemplo muestra la capacidad de *Bacillus sp.* BIRD-6 (CECT 9748) para actuar como retardante del crecimiento de hongos.

#### **Ejemplo 22: Efecto del caldo de cultivo de *Bacillus sp.* BIRD-6 (CECT 9748) sobre el crecimiento de hongos**

La CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* se cultivó en medio mínimo M9 (Abril *et al.*, 1989; como anteriormente), cuya composición específica por litro es: 6,4 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,25 g de NaCl; 0,5 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 1 ml de  $\text{MgSO}_4$  1 M; 1 ml de citrato férrico al 6 ‰ (p/p) con 20 g/l de sacarosa como una fuente de carbono. La suspensión bacteriana se incubó a una temperatura entre 15 °C y 40 °C con agitación hasta que se alcanzó una densidad celular igual o superior a  $10^9$  ufc/ml. Después de ese período, las células se centrifugaron y el caldo de cultivo se filtró a través de una malla de 0,22 µm de tamaño de poro. Se usaron veinte microlitros del caldo de cultivo filtrado en un ensayo con *Fusarium oxysporum* y *Phyium ultimum*, como se describe en el Ejemplo 21.

El retraso en el crecimiento de hongos duró más de una semana después de colocar el caldo de cultivo en el centro de la placa. Este ejemplo ilustra la capacidad del sobrenadante de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* para actuar como agente retardante contra la proliferación de hongos.

#### **Ejemplo 23: Protección contra la proliferación de fitopatógenos bacterianos**

Los ensayos se realizaron con la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* para determinar su capacidad para prevenir el crecimiento de bacterias fitopatógenas tales como *Erwinia carotovora*. La CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* se cultivó en medio mínimo M9 (Abril *et al.*, 1989; como anteriormente), cuya composición específica por litro es: 6,4 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,25 g de NaCl; 0,5 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 1 ml de  $\text{MgSO}_4$  1 M; 1 ml de citrato férrico al 6 ‰ (p/p) con 20 g/l de sacarosa como una fuente de carbono. La suspensión bacteriana se incubó a una temperatura entre 15 °C y 40 °C con agitación hasta que se alcanzó una densidad celular igual o superior a  $10^9$  ufc/ml. Una gota de 20 µl del cultivo de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* se colocó en una placa de Petri en Agar LB. Una vez seca la gota, se vertió en la placa una capa de medio agar LB 0,7 % inoculado con  $10^5$  ufc/ml de *Erwinia carotovora*. Después de un período de incubación de 24 horas a 30 °C, se observó que la cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* (CECT 9748) inhibió el crecimiento de la bacteria observando un halo sin crecimiento de *E. carotovora* alrededor de la colonia bacteriana de *Bacillus* BIRD-6. Este ejemplo muestra la capacidad de *Bacillus sp.* BIRD-6 (CECT 9748) para actuar como un retardante del crecimiento de *E. carotovora*.

#### **Ejemplo 24: Efecto del caldo de cultivo de *Bacillus sp.* BIRD-6 (CECT 9748) sobre el crecimiento de bacterias patógenas**

La CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* se cultivó en medio mínimo M9 (Abril *et al.*, 1989; como anteriormente), cuya composición específica por litro es: 6,4 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,25 g de NaCl; 0,5 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 1 ml de  $\text{MgSO}_4$  1 M; 1 ml de citrato férrico al 6 ‰ (p/p) con 20 g/l de sacarosa como una fuente de carbono. La suspensión bacteriana se incubó a una temperatura entre 15 °C y 40 °C con agitación hasta que se alcanzó una densidad celular igual o superior a  $10^9$  ufc/ml. Después de ese período, las células se centrifugaron y el caldo de cultivo se filtró a través de una malla de 0,22 µm de tamaño de poro. Se usaron diez microlitros del caldo de cultivo filtrado en un ensayo con *E. carotovora*, como se describe en el Ejemplo 23.

Después de la incubación, se observó que la cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* (CECT 9748) inhibió el crecimiento de la bacteria observando un halo sin crecimiento de *E. carotovora* alrededor de la colonia bacteriana de *Bacillus sp.* BIRD-6. Este ejemplo ilustra la capacidad del sobrenadante de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* para actuar como agente retardante contra la proliferación de bacterias fitopatógenas.

#### **Ejemplo 25: Capacidad de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* para formar biopelículas en superficies abióticas**

Se probó la capacidad de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus sp.* para formar biopelículas en diferentes superficies. Se realizó una serie de pruebas *in vitro* para las cuales los cultivos se incubaron durante 12 h y después se inocularon (1:20) en 50 ml de medio mínimo LB o M9, suplementado con glucosa, en placas de microtitulación de poliestireno. Después de 4 h de incubación a 30 °C, los pocillos se lavaron con agua desionizada y se añadieron a cada pocillo 100 µl de una solución de cristal violeta al 1 % (p/v). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Pasado ese tiempo, los pocillos se lavaron minuciosamente y se contó la formación de biopelícula. Para tal fin, el residuo teñido de azul se solubilizó añadiendo 200 µl de etanol dos veces a cada pocillo. Esta solución se transfirió a un tubo Eppendorf y se añadieron 600 µl de agua destilada. Después se midió la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700. Los resultados mostraron que los microorganismos de la CECT 9748 cepa

BIRD-6 *Bacillus* sp. formó biopelículas que alcanzaron densidades de al menos  $10^8$  ufc/cm<sup>2</sup>.

Se realizaron ensayos similares para probar la formación de biopelículas en otras superficies tales como polipropileno (tubos Eppendorf de 1,5 ml) y borosilicato (tubos de vidrio), todo con resultados positivos. El microorganismo formó

**Ejemplo 26: Capacidad de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. para formar biopelículas en la superficie de las raíces de las plantas**

Para verificar la formación de biopelículas por la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. sobre raíces de plantas de interés agrícola (tomate y maíz), semillas previamente esterilizadas en superficie se sumergieron durante 30 min en un cultivo de  $10^8$  ufc/ml de la cepa BIRD-6. Después de ese tiempo, las semillas se lavaron con agua destilada y se colocaron en cajas Petri con medio MS (Murashige & Skoog, 1962, *Physiologia Plantarum* 15:473-97) y se incubaron a 25 °C con intervalos de luz de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, hasta alcanzar una longitud máxima de 3 cm. Después, las semillas en germinación se observaron con un microscopio electrónico de barrido. En todos los casos se observó formación de biopelícula.

Las diez plántulas se trasplantaron después en bandejas de plántulas a las que un sustrato orgánico, es decir, turba, se había añadido anteriormente. Se observó el crecimiento de las plantas tratadas frente al de las plantas de control no tratadas durante al menos 15 días más. Después de este tiempo, se observó un aumento de al menos el 15 % al 30 % en el peso fresco de las plantas que habían sido previamente inoculadas con *Bacillus* sp. BIRD-6 (CECT 9748). Para comprobar la formación de biopelículas, las raíces se lavaron y las células adheridas se separaron de las raíces mediante sometimiento a ultrasonidos en un limpiador ultrasónico. Se recuperaron al menos  $10^9$  ufc por cm<sup>2</sup> de raíz.

Estos resultados indican que la formación y el mantenimiento de la biopelícula en la raíz formada por *Bacillus* sp. BIRD-6 (CECT 9748) ocupa el nicho ecológico por completo. Esta biopelícula evita de esta manera la colonización de otro tipo de microorganismos rizosféricos que pueden resultar perjudiciales para el desarrollo de la planta. Por otra parte, se ha descrito que el desarrollo de biopelículas en las raíces por parte de microorganismos promotores del crecimiento de las plantas otorga a la planta una mayor protección frente al ataque de fitopatógenos y frente al estrés abiótico (altas o bajas temperaturas, sequía, etc.) (Seneviratne *et al.*, 2011, *Soil Biol. Biochem* 43:1059-62; Velmourougane *et al.*, 2017, *J Basic Microbiol* 57:548-73; Triveni *et al.*, 2012, *Annals Microbiol.* 63:1147-56; Lucas *et al.*, 2014, *Plant Physiol. Biochem.* 62:44-53).

**Ejemplo 27: Protección de las plantas contra el estrés ambiental a través de la formación de biopelículas**

Con el fin de verificar la capacidad de proteger las plantas del estrés ambiental por la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. a través de la formación de biopelículas sobre las raíces de plantas de interés agrícola (tomate y maíz), semillas previamente esterilizadas en superficie se sumergieron durante 30 min en un cultivo de  $10^8$  ufc/ml de la cepa BIRD-6, como se indica en el ejemplo 20. Después de ese tiempo, las semillas se lavaron con agua destilada y se colocaron en cajas Petri con medio MS (Murashige & Skoog, 1962, *Physiologia Plantarum* 15:473-97) y se incubaron a 25 °C con intervalos de luz de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, hasta alcanzar una longitud máxima de 3 cm. Paralelamente, también se germinaron semillas esterilizadas no inoculadas.

Después, las plantas no inoculadas se sembraron después en macetas que contenían turba esterilizada en autoclave con adición de NaCl 100 mM para establecer el tratamiento control y las semillas inoculadas se sembraron en macetas que contenían turba esterilizada en autoclave con adición de NaCl 100 mM, con el fin de evaluar la capacidad de BIRD-6 para proteger a las plantas del estrés por salinidad.

Un mes después del inicio del ensayo, las plantas se cosecharon y se midieron, las plantas inoculadas con BIRD-6 mostraron un aumento en la longitud de brotes y raíces en, al menos, un 10 % a un 50 %.

**Ejemplo 28: Supervivencia de BIRD-6 en mezclas de fertilizantes**

Un cultivo puro o una suspensión acuosa de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. se mezcló con diferentes formulaciones de fertilizantes líquidos, tales como Herofulvat®, Herocotton®, Estarter o Herovital® y similares suministrados por la empresa productora Herogra. La concentración de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. fue, en todos los casos, al menos  $10^5$  ufc/ml. Una vez hechas las mezclas, cada mezcla se mantuvo a temperatura ambiente y se comprobó la viabilidad del microorganismo a lo largo del tiempo diluyendo 1 ml de la mezcla en agua y después contando las células después de diluciones en serie. Después de tres meses, todas las mezclas presentaron el mismo número de microorganismos viables independientemente de los fertilizantes líquidos usados en la mezcla, mostrando una concentración de aproximadamente  $10^8$  UFC/ml. De esta prueba puede afirmarse que la cepa BIRD-6 es viable en mezclas con fertilizantes químicos.

**Ejemplo 29: Supervivencia de BIRD-6 en una mezcla sólida hecha con un material mineral inerte.**

La formulación más común en agricultura para el desarrollo de productos biológicos sólidos es la denominada

formulación en forma de polvos humectables. Para realizar esto, se fabrica una mezcla del cultivo puro del microorganismo de interés con un soporte sólido inerte de fácil unión como son los minerales pertenecientes al grupo de las arcillas. Las arcillas más usadas para la fabricación de formulaciones sólidas aplicables en agricultura son las denominadas montmorillonita, talco, sepiolita y zeolita. Este tipo de compuestos tienen una alta capacidad de adsorción por lo que la capacidad de retención de microorganismos es muy alta.

Para determinar la supervivencia de *Bacillus* sp BIRD-6 en una mezcla mineral sólida, se mezcló un cultivo puro de la cepa CECT 9748 con tres tipos de arcillas previamente esterilizadas y en diferente relación v:v. Se probaron dos proporciones de volumen del cultivo de microorganismos: arcilla v (2:10 y 3:10), usando sepiolita, talco y montmorillonita como soporte sólido inerte. Una vez hechas las mezclas, cada mezcla se mantuvo a temperatura ambiente y se comprobó la viabilidad del microorganismo a lo largo del tiempo disolviendo 1 ml de la mezcla sólida en agua y después contando las células después por dilución en serie.

La montmorillonita sólida inerte se descartó porque no pudo mezclarse adecuadamente (debido a la formación de grumos), mientras que la sepiolita y el talco dieron lugar a mezclas homogéneas que podían disolverse fácilmente en agua. Después de un año, todas las mezclas sólidas elaboradas con talco y sepiolita presentaron el mismo número de microorganismos viables independientemente de la proporción de cultivo usada en la mezcla, mostrando una concentración de aproximadamente  $10^8$  UFC/ml. De esta prueba puede afirmarse que la cepa BIRD-6 es viable en una mezcla sólida generada con arcilla después de un año desde su preparación.

#### **Demostración de la seguridad del producto**

Se han realizado las siguientes series de pruebas para evaluar el potencial de supervivencia de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. en el medio ambiente, así como determinar su inocuidad tanto para el medio ambiente como para los microbios.

#### **Ejemplo 30: Inocuidad de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. con respecto a otros microorganismos promotores del crecimiento vegetal**

Estas pruebas se realizaron mediante siembra cruzada de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. y microorganismos con potencial promotor del crecimiento vegetal tales como *Pseudomonas putida* BIRD-1 y *Pseudomonas fluorescens* BIRD-5. Todas las cepas crecen en medio LB. Brevemente, se sembraron microorganismos de una cepa en una línea usando una lanceta; esa línea se cortó perpendicularmente sembrando con microorganismos de otra cepa. Si los microorganismos son inocuos entre ellos, el crecimiento a lo largo de las líneas de siembra es homogéneo. Si, sin embargo, uno de ellos ejerce un efecto perjudicial sobre el resto, entonces se observa un área de inhibición.

Los resultados revelaron que la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. es inocua para BIRD-1 y BIRD-5. Lo mismo se aplica a las cepas BIRD-1 y BIRD-5 entre ellas o con respecto a BIRD-6. Por lo tanto, puede concluirse que las cepas analizadas no son antagónicas.

#### **Ejemplo 31: Inocuidad de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. con respecto a otros microorganismos del suelo heterótrofos**

El maíz se sembró sobre fluvisol que se había suplementado con  $10^6$  ufc de la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. por gramo de suelo. Los controles no contenían la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. Las semillas se incubaron a temperatura ambiente con un intervalo luz-oscuridad de 8 h de luz y 8 h de oscuridad. El número de microorganismos heterótrofos en el sistema radicular se determinó contando el número de microorganismos que:

- 1) Usaron nitrato como una fuente de N. Con este fin, un medio M9 modificado, como se ha descrito anteriormente, se usó en el cual  $\text{NH}_4\text{Cl}$  fue reemplazado por  $\text{KNO}_3$  10 mM.
- 2) El número de microorganismos que usaron benzoato como fuente de C en la rizosfera. Para ello se usó medio mínimo M9 y benzoato sódico 10 mM como la única fuente de carbono.

Los recuentos realizados después de 15 días revelaron que el número de usuarios de nitrato era de alrededor de  $10^7$  ufc/g de suelo tanto en la rizosfera de las plantas que crecen en el suelo tratado como en las plantas control. El número de microorganismos que usaron benzoato alcanzó valores cercanos a  $10^8$  ufc por gramo de suelo tanto en suelos inoculados con *Bacillus* sp. BIRD-6 como en suelos no inoculados.

A partir de estos ensayos puede concluirse que la CECT 9748 cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. no ejerce un efecto negativo sobre la supervivencia de los microorganismos naturales del suelo.

## LISTA DE SECUENCIAS

&lt;110&gt; BIO-ILIBERIS RESEARCH &amp; DEVELOPMENT S.L.

5 &lt;120&gt; MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y ENZIMAS PARA LOS CICLOS BIOGÉNICOS DEL SUELO

&lt;130&gt; P16621EP00

10 &lt;160&gt; 3

&lt;170&gt; PatentIn versión 3.5

15 <210> 1  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> *Bacillus* sp. BIRD-6

20 &lt;400&gt; 1

agagtttgat cctggc 16

25 <210> 2  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> *Bacillus* sp. BIRD-6

&lt;400&gt; 2

30 taccttggtta cgactt 16

35 <210> 3  
<211> 1148  
<212> ADN  
<213> *Bacillus* sp. BIRD-6

&lt;400&gt; 3

catgcaagtc gagcggacag atgggagctt gctccctgat gttagcggcg gacgggtgag 60  
taacacgtgg gtaacctgcc tgtaagactg ggataactcc gggaaaccgg ggctaatacc 120  
ggatggttgt ttgaaccgca tgggtcaaac ataaaagggtg gcttcggcta ccacttacag 180  
atggacccgc ggcgcattag ctagttggtg aggtaacggc tcaccaaggc gacgatgcgt 240  
agccgacctg agaggggtgat cggccacact gggactgaga cacggcccag actcctacgg 300  
gaggcagcag tagggaatct tccgcaatgg acgaaagtct gacggagcaa cgccgcgtga 360  
gtgatgaagg ttttcggatc gtaaagctct gttgttaggg aagaacaagt accgttcgaa 420  
tagggcggta ccttgacggg acctaaccag aaagccacgg ctaactacgt gccagcagcc 480  
gcggtaatac gtaggtggca agcgttgtcc ggaattattg ggcgtaaagg gctcgcaggc 540  
ggtttcttaa gtctgatgtg aaagcccccg gctcaaccgg ggaggggtcat tggaaactgg 600  
ggaacttgag tgcagaagag gagagtggaa ttccacgtgt agcggtgaaa tgcgtagaga 660  
tgtggaggaa caccagtggc gaaggcgact ctctgggtctg taactgacgc tgaggagcga 720  
aagcgtgggg agcgaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgagtgc 780

40

# ES 2 940 245 T3

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| taagtgttag ggggtttccg ccccttagtg ctgcagctaa cgcattaagc actccgcctg  | 840  |
| gggagtacgg tcgcaagact gaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgca caagcgggtgg | 900  |
| agcatgtggt ttaattcgaa gcaacacgaa gaaccttacc aggtcttgac atcctctgac  | 960  |
| aatcctagag ataggacgtc cccttcgggg gcagagtgc aggtggtgca tggttgtcgt   | 1020 |
| cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct tgatcttagt  | 1080 |
| tgccagcatt cagttgggca ctctaaggtg actgccggtg acaaaccgga ggaaggtggg  | 1140 |
| gatgacgt                                                           | 1148 |

## REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo de la cepa BIRD-6 de *Bacillus* sp. con número de registro CECT 9748.
- 5 2. Un sobrenadante de un cultivo del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Un fertilizante, una semilla, un cepellón, un sustrato o un soporte sólido activo, que comprende al menos un microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1 o un sobrenadante de acuerdo con la reivindicación 2.
- 10 4. Método para estimular el crecimiento vegetal, que comprende una etapa de aplicación de una cantidad eficaz de al menos un microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1 o un sobrenadante de acuerdo con la reivindicación 2 o un fertilizante, un sustrato o un soporte sólido activo de acuerdo con la reivindicación 3, a la planta o, alternativamente, una etapa de plantar una semilla o un cepellón de acuerdo con la reivindicación 3.
- 15 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4 en donde la estimulación del crecimiento vegetal está provocada por una estimulación de la germinación de semillas o por una estimulación del crecimiento temprano.
6. Método para proteger una planta contra fitopatógenos, que comprende una etapa de aplicación de una cantidad eficaz de un microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1 o un sobrenadante de acuerdo con la reivindicación 2 o un fertilizante, un sustrato o un soporte sólido activo de acuerdo con la reivindicación 3, a la planta o, alternativamente, una etapa de plantar una semilla o un cepellón de acuerdo con la reivindicación 3.
- 20 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6 en donde el fitopatógeno es un hongo y/o una bacteria.
- 25 8. Método para proteger una planta contra el estrés ambiental, que comprende la etapa de aplicación de una cantidad eficaz de al menos un microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1 o un sobrenadante de acuerdo con la reivindicación 2 o un fertilizante, un sustrato o un soporte sólido activo de acuerdo con la reivindicación 3, a la planta o, alternativamente, la etapa de plantar una semilla o un cepellón de acuerdo con la reivindicación 3.
- 30 9. Método para solubilizar un fosfato insoluble y/o hierro insoluble en un sustrato sólido o suelo, que comprende la etapa de aplicación de al menos un microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1 o un sobrenadante de acuerdo con la reivindicación 2 o un fertilizante, un sustrato o un soporte sólido activo de acuerdo con la reivindicación 3, al sustrato sólido o campo o, alternativamente, la etapa de plantar una semilla o un cepellón de acuerdo con la reivindicación 3 sobre el sustrato sólido o el suelo.
- 35 10. Método para preparar un vehículo mineral que contiene un microorganismo que comprende poner en contacto un cultivo del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1 con un vehículo mineral en condiciones adecuadas para la unión del microorganismo al vehículo.
- 40 11. Un vehículo mineral que comprende un microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 10 o el vehículo mineral de acuerdo con la reivindicación 11 en donde el vehículo mineral es una arcilla.
- 45 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12 en donde la arcilla es sepiolita o talco.