

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 942 990**

51 Int. Cl.:

<b>A01N 37/44</b>	(2006.01)	<b>A61K 35/00</b>	(2006.01)
<b>A01N 63/20</b>	(2010.01)	<b>A61K 35/742</b>	(2015.01)
<b>A01N 63/22</b>	(2010.01)	<b>B09C 1/10</b>	(2006.01)
<b>A01N 63/28</b>	(2010.01)	<b>C02F 11/04</b>	(2006.01)
<b>A01N 63/00</b>	(2010.01)	<b>C05F 11/08</b>	(2006.01)
<b>A01P 21/00</b>	(2006.01)	<b>C09K 8/582</b>	(2006.01)
<b>A23K 10/12</b>	(2006.01)	<b>C11D 3/38</b>	(2006.01)
<b>A23K 10/18</b>	(2006.01)	<b>C12N 1/20</b>	(2006.01)
<b>A23K 50/75</b>	(2006.01)	<b>C12P 5/02</b>	(2006.01)
<b>A23K 50/80</b>	(2006.01)	<b>A01N 25/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2015 PCT/US2015/043979**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16022779**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2015 E 15830591 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2023 EP 3177149**

54 Título: **Composiciones de esporas bacterianas para usos industriales**

30 Prioridad:

**06.08.2014 US 201462033825 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.06.2023**

73 Titular/es:

**ENVERA LIC, LLC (100.0%)  
220 Garfield Avenue  
West Chester, PA 19380, US**

72 Inventor/es:

**HASHMAN, TOMMIE EUGENE y  
MATHENY, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**Observaciones:**

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

ES 2 942 990 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

Composiciones de esporas bacterianas para usos industriales

## Referencia cruzada a aplicaciones relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio prioritario de la solicitud provisional de EE. UU. n.º de serie 62/033 825, presentada el 6 de agosto de 2014; la solicitud de EE. UU. n.º de serie 14/819 577, presentada el 6 de agosto de 2015; y la solicitud de EE. UU. n.º de serie 14/819 583, presentada el 6 de agosto de 2015.

## Campo de la invención

10 La presente invención se refiere, en general, a composiciones de esporas bacterianas para usos industriales, tales como agricultura, remediación medioambiental, compostaje, producción de metano, productos de limpieza, recuperación de petróleo y probióticos.

## Antecedentes de la invención

15 Las especies bacterianas formadoras de esporas tienen una amplia gama de aplicaciones industriales que incluyen usos en agricultura, remediación medioambiental, compostaje, producción de metano, recuperación de petróleo y suministros de limpieza. En función de la especie bacteriana concreta empleada, las composiciones que comprenden bacterias pueden ser adecuadas para usos agrícolas, hortícolas, medioambientales, probióticos, acuáticos, industriales y sanitarios, entre otros. Varias especies de bacterias formadoras de esporas tienen utilidad en muchas industrias. Por ejemplo, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* se utilizan como fungicidas agrícolas y en el tratamiento de aguas residuales, productos de limpieza y probióticos.

20 En cuanto a las aplicaciones agrícolas, el uso de bacterias formadoras de esporas para mejorar la salud de las plantas es bien conocido en la técnica. Por ejemplo, Zhang *et al.* (2009, Plant J., 58: 568-577) indican que la bacteria estimulante del crecimiento vegetal *Bacillus subtilis* GB03 aumenta la adquisición de hierro por las plantas y la capacidad fotosintética. Xie *et al.* (2009, Plant Signaling and Behavior, 4(10): 948-953) indican que los compuestos volátiles producidos por esta misma cepa de *Bacillus subtilis* aumentan el crecimiento de las plantas y el número de semillas. Han *et al.* (2014, Frontiers in Plant Science, 5(525): 1-8) señalan que las plantas de trébol blanco cultivadas en suelo inoculado con *Bacillus subtilis* GB03 eran significativamente más grandes que los controles no inoculados en lo que respecta a la altura de los brotes, la longitud de las raíces, la biomasa de la planta, el área foliar y el contenido de clorofila. Las esporas de dichas bacterias también pueden recubrir semillas u otro material de propagación vegetal, de forma que una vez sembradas o plantadas se pueda establecer un entorno mejorado que favorezca la germinación de la semilla, la estimulación del crecimiento de la planta o la protección biológica de la semilla y de la planta resultante. Por ejemplo, las bacterias simbióticas, tales como las de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, que permiten la fijación del nitrógeno en las leguminosas, pueden utilizarse para inocular leguminosas con el fin de ayudar a la formación de nódulos. La inoculación puede realizarse recubriendo las semillas, espolvoreando las semillas o los cultivos en la explotación o colocando el inoculante en el surco en el momento de la siembra.

35 Las bacterias formadoras de esporas también pueden utilizarse en procedimientos de remediación medioambiental, tal como la biorremediación. La biorremediación implica el uso de microorganismos para convertir compuestos químicos en otros compuestos químicos inocuos o menos dañinos. Las tecnologías de biorremediación suelen tener costes más bajos que las tecnologías físicas competidoras y pueden adaptarse a una gama más amplia de problemas de contaminación y variaciones en las condiciones del terreno. Véase el documento US 2002/0090697.

40 Los medios contaminados pueden tratarse con bacterias para estimular la biodegradación de contaminantes orgánicos en el agua, el suelo y los residuos industriales. Por ejemplo, Lupton *et al.* (patente de EE. UU. n.º 5 062 956) analizan un procedimiento de eliminación de Cr(VI) soluble que utiliza bacterias anaerobias para reducir el Cr(VI) a Cr(III) e inmovilizar el Cr(III) como un hidróxido insoluble que se sedimenta como un sólido. Lupton *et al.* también describen el tratamiento de residuos acuosos que contienen cantidades indeseables de Cr(VI) en un biorreactor continuo. Turick *et al.* (patente de EE. UU. n.º 5 681 739) describen un procedimiento de reducción de la concentración de Cr(VI) en un residuo acuoso líquido que comprende las etapas de proporcionar bacterias reductoras de Cr(Vi), mezclar el residuo acuoso líquido con un medio nutriente (por ejemplo, melaza, ácido acético, aminoácidos, casaminoácidos, urea), y poner en contacto la mezcla con las bacterias anaerobias para potenciar la reducción de Cr(VI) a Cr(III). Este proceso puede utilizarse para la biorremediación de suelos y/o aguas subterráneas contaminados con cromo hexavalente.

50 Una dificultad asociada con el uso de tales bacterias es que, si bien deben estar en estado vegetativo para proporcionar tales beneficios, es difícil formular especies de *Bacillus* y otras bacterias formadoras de esporas en su forma vegetativa de manera que posean una vida útil adecuada. Además, las especies de *Bacillus* en su forma vegetativa pueden no ser capaces de sobrevivir a las duras condiciones necesarias para los usos industriales, tales como las condiciones a las que se someten las semillas u otros materiales de propagación vegetal antes de que se den las condiciones adecuadas para la germinación de las semillas. En cambio, las formulaciones de dichas especies en su forma de esporas son mucho más adecuadas para su uso comercial y práctico. Por ejemplo, tal como señalan Cartman *et al.* (2008, Applied and Environmental Microbiology, agosto, págs. 5254-5258) "las esporas bacterianas son especialmente

adecuadas para su uso como productos microbianos vivos, ya que están metabólicamente latentes y muy resistentes al estrés ambiental. Estas propiedades intrínsecas son muy deseables desde un punto de vista comercial y significan que los productos basados en esporas tienen una larga vida útil y conservan su viabilidad durante la distribución y el almacenamiento".

5 En la bibliografía se ha descrito el uso de ciertos compuestos, en concreto, ciertos L-aminoácidos, para estimular la germinación de esporas de *Bacillus*. Por ejemplo, Foerster *et al.* (1996, Journal of Bacteriology, 91(3): 1168-1177) indican que la adición de L-alanina a suspensiones de esporas en soluciones acuosas provoca la germinación de varias especies de *Bacillus*. El documento WO 2014/193746, una solicitud presentada con anterioridad a la presente solicitud, pero publicada con posterioridad a la fecha de prioridad de la presente solicitud, describe composiciones que comprenden uno o más microorganismos y uno o más germinantes. Se describen diversos germinantes, incluidos determinados aminoácidos. El documento WO 02/00035 describe un pienso para animales acuáticos que incorpora probióticos seleccionados en forma de esporas en el pienso y comprende medios para activarlos y germinarlos cuando se suministran a los animales o se añaden al agua de tanques o estanques. El documento WO 2014/106776 describe una composición para aumentar el rendimiento de las plantas que comprende al menos dos componentes, el primero es una mezcla que incluye quitosano, glucosamina y aminoácidos, y el segundo es un control biológico. Sin embargo, uno de los retos a la hora de utilizar combinaciones de esporas bacterianas y compuestos germinativos en usos industriales es mantener la espora en una forma inactiva en presencia del compuesto germinativo hasta que se requiera la germinación de las esporas. Por ejemplo, un material de propagación vegetal, tal como una semilla tratada con una composición de esporas bacterianas, puede someterse a un periodo de almacenamiento de varios meses antes de la siembra. Por lo tanto, existe la necesidad de formulaciones de esporas bacterianas que puedan estimular la germinación rápida de las esporas bacterianas en condiciones favorables, pero que también eviten la germinación prematura de las esporas hasta que se requiera la germinación de la espora.

Además, las bacterias para un uso agrícola o industrial pueden estar expuestas a una serie de condiciones ambientales, tales como un pH bajo del suelo, altas concentraciones de sales (por ejemplo, NaCl) y altas concentraciones de metales (por ejemplo, cobre y aluminio) que son desfavorables para la germinación de las esporas bacterianas. Así pues, es necesario desarrollar formulaciones de esporas bacterianas capaces de germinar en estas condiciones adversas.

### Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención se dirige a un material de propagación vegetal recubierto con una composición que comprende una espora bacteriana y un compuesto germinativo como se describe en las reivindicaciones. La espora y el compuesto germinativo se mantienen en una forma inactiva, de modo que el compuesto germinativo no inducirá la germinación de la espora hasta que la composición se someta a un entorno de activación. La composición puede comprender además una sustancia que impide que la espora bacteriana y el compuesto germinativo interactúen hasta que la composición se someta a un entorno de activación. En determinadas realizaciones, la sustancia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo, un agente secuestrante, un plastificante, un colorante, un tinte, un abrillantador, un emulsionante, un agente de flujo, un agente coalescente, un agente antiespumante, un espesante, una cera, un bactericida, una carga, un polímero, un agente humectante y un agente anticongelante. La composición comprende una mezcla íntima de la espora bacteriana y el compuesto germinativo, en la que la espora bacteriana y el compuesto germinativo se mantienen en posición próxima hasta que alcanzan un entorno propicio para la germinación.

En determinadas realizaciones, el material de propagación vegetal se selecciona del grupo que consiste en una flor, una semilla, una raíz, un fruto, un tubérculo, un bulbo, un rizoma, un brote, un retoño, una semilla, una hoja, una plántula y un trasplante. En una realización concreta, el material de propagación vegetal es una semilla. El material de propagación vegetal puede trasplantarse tras la germinación o tras emerger del suelo.

En determinadas realizaciones de los materiales de propagación vegetal mencionados anteriormente, la espora bacteriana se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus agri*, *Bacillus aizawai*, *Bacillus albolactis*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus butanolivorans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus endoparasiticus*, *Bacillus endorhythmos*, *Bacillus firmus*, *Bacillus kurstaki*, *Bacillus lacticola*, *Bacillus lactimorbus*, *Bacillus lactis*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus medusa*, *Bacillus metiens*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus natto*, *Bacillus nigrificans*, *Bacillus popillae*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus simplex*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus spp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus unifagellatus*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae* y una especie del género *Streptomyces*.

El compuesto germinativo se selecciona del grupo que consiste en L-alanina, L-valina, L-prolina, L-leucina, L-cisteína, L-treonina, L-glutamina, L-asparagina y L-fenilalanina. En determinadas realizaciones, la espora bacteriana se selecciona del grupo que consiste en *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* y *B. pumilus*; y el compuesto germinativo se selecciona del grupo que consiste en L-alanina, L-valina y L-asparagina. La composición puede comprender además un polímero de recubrimiento de semillas. En determinadas realizaciones, la composición comprende además una sustancia seleccionada del grupo que consiste en un tensioactivo, un agente

secuestrante, un plastificante, un colorante, un tinte, un abrillantador, un emulsionante, un agente de flujo, un agente coalescente, un agente antiespumante, un espesante, una cera, un bactericida, una carga, un polímero, un agente humectante y un agente anticongelante.

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento, tal como se define en las reivindicaciones, para mejorar el crecimiento o el rendimiento de un material de propagación vegetal que comprende el recubrimiento del material de propagación vegetal con una composición que comprende una espora bacteriana y un compuesto germinativo, en el que el crecimiento o el rendimiento del material de propagación vegetal se mejora en relación con el crecimiento o el rendimiento de un material de propagación vegetal correspondiente que no está recubierto con dicha composición. La espora y el compuesto germinativo se mantienen en una forma inactiva, de modo que el compuesto germinativo no inducirá la germinación de la espora hasta que la composición se someta a un entorno de activación. En algunas realizaciones, la composición comprende además una sustancia que impide que la espora bacteriana y el compuesto germinativo interactúen hasta que la composición se someta a un entorno de activación. En algunas realizaciones, la sustancia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo, un agente secuestrante, un plastificante, un colorante, un tinte, un abrillantador, un emulsionante, un agente de flujo, un agente coalescente, un agente antiespumante, un espesante, una cera, un bactericida, una carga, un polímero, un agente humectante y un agente anticongelante.

20 En los procedimientos mencionados, la composición comprende una mezcla íntima de la espora bacteriana y el compuesto germinativo, en la que la espora bacteriana y el compuesto germinativo se mantienen en posición próxima hasta que alcanzan un entorno propicio para la germinación. En algunas realizaciones, el material de propagación vegetal se selecciona del grupo que consiste en una flor, una semilla, una raíz, un fruto, un tubérculo, un bulbo, un rizoma, un brote, un retoño, una semilla, una hoja, una plántula y un trasplante. En determinadas realizaciones, el material de propagación vegetal es una semilla. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden además el trasplante del material de propagación vegetal tras la germinación o tras emerger del suelo.

25 En determinadas realizaciones, la espora bacteriana utilizada en los procedimientos mencionados se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus agri*, *Bacillus aizawai*, *Bacillus albolactis*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus butanolivorans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus endoparasiticus*, *Bacillus endorhythmos*, *Bacillus firmus*, *Bacillus kurstaki*, *Bacillus lacticola*, *Bacillus lactimorbus*, *Bacillus lactis*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus medusa*, *Bacillus metiens*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus natto*, *Bacillus nigrificans*, *Bacillus popillae*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus simplex*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus spp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus unifagellatus*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae* y especies de *Streptomyces*.

35 En los procedimientos mencionados, el compuesto germinativo se selecciona del grupo que consiste en L-alanina, L-valina, L-prolina, L-leucina, L-cisteína, L-treonina, L-glutamina, L-asparagina y L-fenilalanina. En algunas realizaciones, la espora bacteriana se selecciona del grupo que consiste en *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* y *B. pumilus*; y el compuesto germinativo se selecciona del grupo que consiste en L-alanina, L-valina y L-asparagina. La composición utilizada en los procedimientos mencionados puede comprender además un polímero de recubrimiento de semillas. En una realización concreta, la composición comprende uno o varios miembros del grupo que consiste en un tensioactivo, un agente secuestrante, un plastificante, un colorante, un tinte, un abrillantador, un emulsionante, un agente de flujo, un agente coalescente, un agente antiespumante, un espesante, una cera, un bactericida, una carga, un polímero, un agente humectante y un agente anticongelante.

45 En determinadas realizaciones de los procedimientos mencionados, la planta o parte de la planta es un material de propagación vegetal. En determinadas realizaciones, la planta o parte de la planta es una semilla. En determinadas realizaciones, la planta o parte de la planta se selecciona del grupo que consiste en una flor, una semilla, una raíz, un fruto, un tubérculo, un bulbo, un rizoma, un brote, un retoño, una semilla, una hoja, una plántula y un trasplante. En determinadas realizaciones, el procedimiento comprende el tratamiento de la planta o parte de la planta con la composición tras la germinación o tras emerger del suelo. En determinadas realizaciones, el procedimiento comprende tratar la planta o parte de la planta con la composición antes de la germinación o antes de emerger del suelo.

50 En determinadas realizaciones, la espora bacteriana se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus agri*, *Bacillus aizawai*, *Bacillus albolactis*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus butanolivorans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus endoparasiticus*, *Bacillus endorhythmos*, *Bacillus firmus*, *Bacillus kurstaki*, *Bacillus lacticola*, *Bacillus lactimorbus*, *Bacillus lactis*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus medusa*, *Bacillus metiens*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus natto*, *Bacillus nigrificans*, *Bacillus popillae*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus simplex*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus spp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus unifagellatus*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae* y especies de *Streptomyces*.

55 El compuesto germinativo se selecciona del grupo que consiste en fructosa, glucosa, potasio, L-alanina, L-valina, L-prolina, L-leucina, L-cisteína, L-treonina, L-glutamina, L-asparagina y L-fenilalanina.

5 En determinadas realizaciones, la espora bacteriana se selecciona del grupo que consiste en *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* y *B. pumilus*; y el compuesto germinativo se selecciona del grupo que consiste en L-alanina, L-valina y L-asparagina. En determinadas realizaciones, la composición comprende además un polímero de recubrimiento de semillas. En determinadas realizaciones, la composición

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento no terapéutico para alimentar a un animal en un sistema de acuicultura, que comprende administrar un pienso que comprende una composición que comprende una espora bacteriana y un compuesto germinativo al animal en el sistema de acuicultura.

15 En determinadas realizaciones de los procedimientos mencionados, el animal se selecciona del grupo que consiste en peces, gambas o moluscos. En determinadas realizaciones, el sistema de acuicultura comprende un patógeno seleccionado del grupo que consiste en una especie de *Vibrio*, una especie de *Aeromonas* y una especie de *Flavobacterium*. En determinadas realizaciones, el crecimiento del animal aumenta en relación con un animal en un sistema de acuicultura que no se trata con la composición. En determinadas realizaciones, la composición se presenta en forma de gránulos, briquetas, granza, comprimidos o cápsulas.

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento no terapéutico para alimentar a un animal que comprende administrar a un animal una composición que comprende una espora bacteriana y un compuesto germinativo. En determinadas realizaciones, el animal se selecciona del grupo que consiste en aves de corral, rumiantes, terneros, cerdos, conejos, caballos, crustáceos, moluscos, peces y animales de compañía.

En los procedimientos mencionados, la composición comprende una mezcla íntima de la espora bacteriana y el compuesto germinativo, en la que la espora bacteriana y el compuesto germinativo se mantienen en posición próxima hasta que alcanzan un entorno propicio para la germinación.

25 En determinadas realizaciones de cualquiera de los procedimientos mencionados, la espora bacteriana se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus agri*, *Bacillus aizawai*, *Bacillus albolactis*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus butanolivorans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus endoparasiticus*, *Bacillus endorhythmos*, *Bacillus firmus*, *Bacillus kurstaki*, *Bacillus lacticola*, *Bacillus lactimorbus*, *Bacillus lactis*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus medusa*, *Bacillus metiens*,  
30 *Bacillus mojavensis*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus natto*, *Bacillus nigrificans*, *Bacillus popillae*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus simplex*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus spp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus unifagellatus*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae* y especies de *Streptomyces*.

35 El compuesto germinativo se selecciona del grupo que consiste en fructosa, glucosa, potasio, L-alanina, L-valina, L-prolina, L-leucina, L-cisteína, L-treonina, L-glutamina, L-asparagina y L-fenilalanina.

En determinadas realizaciones de cualquiera de los procedimientos mencionados, la espora bacteriana se selecciona del grupo que consiste en *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* y *B. pumilus*; y el compuesto germinativo se selecciona del grupo que consiste en L-alanina, L-valina y L-asparagina.

40 En determinadas realizaciones de cualquiera de los procedimientos mencionados, la composición se presenta en forma de polvo seco.

### Descripción detallada de la invención

45 En un aspecto, las mezclas de la invención se componen de una espora bacteriana y un L-aminoácido, en las que la composición comprende una mezcla íntima seca de la espora bacteriana y el L-aminoácido, en las que el L-aminoácido se adsorbe sobre la espora bacteriana o es absorbido por la misma, y el L-aminoácido se selecciona entre L-alanina, L-valina, L-prolina, L-leucina, L-cisteína, L-treonina, L-glutamina, L-asparagina y L-fenilalanina. La especie bacteriana empleada puede ser cualquier especie que forme esporas y suele ser una especie que presenta actividad probiótica deseable en humanos o animales. Sin embargo, también pueden emplearse especies bacterianas que tengan otras aplicaciones industriales, incluidas las especies útiles en la agricultura, la recuperación medioambiental, el compostaje o la producción de metano, los productos de limpieza y similares. Por ejemplo, debido a su capacidad para sintetizar  
50 múltiples enzimas, así como a su aceptabilidad medioambiental, las especies de *Bacillus* se emplean en multitud de aplicaciones comerciales. En función de la especie bacteriana concreta empleada, las composiciones de bacterias pueden ser adecuadas para usos agrícolas, hortícolas, medioambientales, probióticos, acuáticos, industriales y sanitarios, entre otros. La composición concreta empleada para cualquier mezcla íntima de espora/compuesto germinativo concreta dependerá del uso al que se destine dicha mezcla.

55 En determinadas realizaciones, la presente invención se dirige a una planta o parte de una planta recubierta con una composición que comprende: (a) una espora bacteriana y (b) un compuesto germinativo que es un L-aminoácido, en la que la composición comprende una mezcla íntima seca de la espora bacteriana y el L-aminoácido, en la que el L-

aminoácido se adsorbe sobre la espora bacteriana o es absorbido por la misma, y el L-aminoácido se selecciona entre L-alanina, L-valina, L-prolina, L-leucina, L-cisteína, L-treonina, L-glutamina, L-asparagina y L-fenilalanina. Las esporas bacterianas incluyen especies que mejoran el crecimiento de una planta, normalmente actuando como plaguicida (por ejemplo, un fungicida, un nematocida o un insecticida); o mejorando el entorno alrededor del material de propagación para el crecimiento (por ejemplo, aumentando la cantidad de nutrientes disponibles, tales como el nitrógeno). El compuesto germinativo ayuda a la rápida transformación de la bacteria desde su estado de espora a su estado vegetativo, lo que permite a la bacteria potenciar más rápidamente el crecimiento de la planta.

Las partes de la planta incluyen, entre otras, hojas, tallos, raíces, flores, brotes, frutos, semillas, tubérculos, bulbos y rizomas.

En determinadas realizaciones, la planta o parte de la planta es un material de propagación vegetal. Tal como se emplea en el presente documento, la expresión "material de propagación vegetal" pretende incluir todas las partes generativas de la planta, tales como semillas y material vegetal vegetativo, como esquejes y tubérculos (por ejemplo, patatas), que pueden utilizarse para la multiplicación de la planta. Esto incluye semillas, raíces, frutos, tubérculos, bulbos, rizomas, brotes, retoños, plántulas y trasplantes, es decir, plantas jóvenes que se van a trasplantar tras la germinación o tras emerger del suelo. Estos trasplantes también pueden protegerse antes del trasplante mediante un tratamiento total o parcial por inmersión o vertido. Preferentemente, el material de propagación vegetal es una semilla.

Las plantas que son particularmente útiles en la presente invención incluyen plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, incluidas, entre otras, leguminosas forrajeras o para piensos, plantas ornamentales, cultivos alimentarios, árboles o arbustos seleccionados de *Acer* spp., *Allium* spp., *Amaranthus* spp., *Ananas comosus*, *Apium graveolens*, *Arachis* spp., *Asparagus officinalis*, *Beta vulgaris*, *Brassica* spp. (por ejemplo, *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [colza oleaginosa, colza nabina]), *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis sativa*, *Capsicum* spp., *Castanea* spp., *Cichorium endivia*, *Citrullus lanatus*, *Citrus* spp., *Cocos* spp., *Coffea* spp., *Coriandrum sativum*, *Corylus* spp., *Crataegus* spp., *Cucurbita* spp., *Cucumis* spp., *Daucus carota*, *Fagus* spp., *Ficus carica*, *Fragaria* spp., *Ginkgo biloba*, *Glycine* spp. (por ejemplo, *Glycine max*, *Soja hispida* o *Soja max*), *Gossypium hirsutum*, *Helianthus* spp. (por ejemplo, *Helianthus annuus*), *Hibiscus* spp., *Hordeum* spp. (por ejemplo, *Hordeum vulgare*), *Ipomoea batatas*, *Juglans* spp., *Lactuca sativa*, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, *Lotus* spp., *Luffa acutangula*, *Lupinus* spp., *Lycopersicon* spp. (por ejemplo, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme*), *Malus* spp., *Medicago sativa*, *Mentha* spp., *Miscanthus sinensis*, *Morus nigra*, *Musa* spp., *Nicotiana* spp., *Olea* spp., *Oryza* spp. (por ejemplo, *Oryza sativa*, *Oryza latifolia*), *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Petroselinum crispum*, *Phaseolus* spp., *Pinus* spp., *Pistacia vera*, *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus* spp., *Prunus* spp., *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes* spp., *Ricinus communis*, *Rubus* spp., *Saccharum* spp., *Salix* sp., *Sambucus* spp., *Secale cereale*, *Sesamum* spp., *Sinapis* sp., *Solanum* spp. (por ejemplo, *Solanum tuberosum*, *Solanum integrifolium* o *Solanum lycopersicum*), *Sorghum bicolor*, *Sorghum halepense*, *Spinacia* spp., *Tamarindus indica*, *Theobroma cacao*, *Trifolium* spp., *Triticosecale rimpai*, *Triticum* spp. (por ejemplo, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum* o *Triticum vulgare*), *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vigna* spp., *Viola odorata*, *Vitis* spp. y *Zea mays*. Se prefieren especialmente el arroz, la colza, la canola, la soja, el maíz, el algodón, la caña de azúcar, la alfalfa, el sorgo y el trigo.

La bacteria empleada en la composición de esta invención incluye cualquier bacteria formadora de esporas con un uso industrial, tal como la mejora del crecimiento de plantas, la remediación medioambiental, el tratamiento de aguas residuales o el uso en sistemas de acuicultura. Por ejemplo, la mejora del crecimiento de la planta puede consistir en poner más recursos a disposición de la planta en crecimiento, tales como aumentar la disponibilidad de nitrógeno, por ejemplo, proporcionado por una bacteria colonizadora de raíces (tal como una rizobacteria) o proporcionar materiales estimulantes del crecimiento vegetal, tales como aminoácidos, ácidos orgánicos u hormonas. Como alternativa, la bacteria puede proporcionar a la planta (por ejemplo, al material de propagación vegetal) protección frente a los efectos nocivos de hongos o bacterias patógenos para las plantas y/o animales que habitan en el suelo, tales como los pertenecientes al filo *Nematoda* o *Aschelminthes*. La protección contra los nematodos parásitos de las plantas y los microorganismos parásitos puede producirse a través de actividades quitinolíticas, proteolíticas, colagenolíticas u otras actividades perjudiciales para estos animales que habitan en el suelo y/o perjudiciales para las poblaciones microbianas. Las bacterias que presentan estas propiedades nematocidas, fungicidas y bactericidas pueden incluir, entre otras, especies que incluyen miembros del filo *Firmicutes* que forman esporas y miembros del filo *Actinobacteria* que forman esporas, tal como se enumeran en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey, segunda edición (2009). Las especies ilustrativas incluyen *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus alvei*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus aneurinolyticus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus aquaemaris*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus boronophilus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus caldolyticus*, *Bacillus centrosporus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus flavothermus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus globigii*, *Bacillus infernus*, *Bacillus larvae*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus mucilaginosus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus natto*, *Bacillus pantothenicus*, *Bacillus popilliae*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus pseudoanthracis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus schlegelii*, *Bacillus simplex*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus sporothermodurans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thermoglucosidasius*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus vulgatus*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* y *Clostridium butyricum*. Las especies preferidas son *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus*

*megaterium*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus simplex*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Clostridium butyricum*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae* y especies de *Streptomyces*.

5 Las especies bacterianas especialmente preferidas incluyen *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* y *B. pumilus*.

Entre los compuestos germinativos preferidos se encuentran la L-alanina, la L-valina y la L-asparagina. Más preferentemente, dicho compuesto germinativo es la L-alanina.

10 En determinadas realizaciones, también pueden utilizarse otros compuestos germinativos además de los L-aminoácidos para optimizar la germinación y la respuesta de crecimiento de las esporas bacterianas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las composiciones comprenden al menos un L-aminoácido y otro compuesto germinativo seleccionado del grupo que consiste en fructosa, glucosa e iones potasio.

15 Las combinaciones especialmente preferidas de *Bacillus*/compuesto germinativo incluyen L-alanina + *Bacillus subtilis*, L-alanina + *Bacillus licheniformis*, L-alanina + *Bacillus pumilus*, L-alanina + *Bacillus amyloliquefaciens*, L-alanina + *Bacillus coagulans*, L-alanina + *Bacillus cereus*, L-alanina + *Bacillus clausii*, L-alanina + *Clostridium butyricum*, L-valina + *Bacillus subtilis*, L-valina + *Bacillus licheniformis*, L-valina + *Bacillus pumilus*, L-valina + *Bacillus amyloliquefaciens*, L-valina + *Bacillus coagulans*, L-valina + *Bacillus cereus*, L-valina + *Bacillus clausii*, L-valina + *Clostridium butyricum*, L-alanina + glucosa+fructosa+iones potasio (GFK) + *Bacillus subtilis*, L-alanina + glucosa+fructosa+iones potasio (GFK) + *Bacillus licheniformis*, L-alanina + glucosa+fructosa+iones potasio (GFK) + *Bacillus pumilus*, L-alanina + glucosa+fructosa+iones potasio (GFK) + *Bacillus amyloliquefaciens*, L-alanina + glucosa+fructosa+iones potasio (GFK) + *Bacillus coagulans*, L-alanina + glucosa+fructosa+iones potasio (GFK) + *Bacillus cereus*, L-alanina + glucosa+fructosa+iones potasio (GFK) + *Bacillus clausii*, L-alanina + glucosa+fructosa+iones potasio (GFK) + *Clostridium butyricum*, L-asparagina + glucosa+fructosa+iones potasio (GFK) + *Bacillus subtilis*, L-asparagina + glucosa+fructosa+iones potasio (GFK) + *Bacillus licheniformis*, L-asparagina + glucosa+fructosa+iones potasio (GFK) + *Bacillus pumilus*, L-asparagina + glucosa+fructosa+iones potasio (GFK) + *Bacillus amyloliquefaciens*, L-asparagina + glucosa+fructosa+iones potasio (GFK) + *Bacillus coagulans*, L-asparagina + glucosa+fructosa+iones potasio (GFK) + *Bacillus cereus*, L-asparagina + glucosa+fructosa+iones potasio (GFK) + *Bacillus clausii*, L-asparagina + glucosa + fructosa + iones potasio (GFK) + *Clostridium butyricum*, L-alanina + inosina + *Bacillus subtilis*, L-alanina + inosina + *Bacillus licheniformis*, L-alanina + inosina + *Bacillus pumilus*, L-alanina + inosina + *Bacillus amyloliquefaciens*, L-alanina + inosina + *Bacillus coagulans*, L-alanina + inosina + *Bacillus cereus*, L-alanina + inosina + *Bacillus clausii*, L-alanina + inosina + *Clostridium butyricum*, L-prolina + glucosa + *Bacillus megaterium*, L-prolina + *Bacillus megaterium*, L-lactato + *Clostridium butyricum*.

35 El compuesto germinativo está presente en una cantidad suficiente para hacer germinar la espora bacteriana empleada. Aunque esto puede determinarse con facilidad para cualquier mezcla concreta de espora bacteriana/compuesto germinativo mediante la experimentación habitual, tales compuestos germinativos se suelen formular, antes del secado, en concentraciones de 0,0001 mg/ml a 170 mg/ml. En algunas realizaciones, los compuestos germinativos se formulan, antes del secado, en concentraciones de 0,0003 mg/ml a 170 mg/ml, de 0,0003 mg/ml a 30 mg/ml, de 0,001 mg/ml a 100 mg/ml, o de 0,001 mg/ml a 10 mg/ml. En una realización preferida, el compuesto germinativo se formula, antes del secado, en concentraciones de 0,001 mg/ml a 1 mg/ml.

40 Para mejorar aún más la germinación, se prefiere que la espora sea sometida a choque. Las esporas pueden someterse a choque mediante diversos procedimientos convencionales, por ejemplo, choque osmótico, choque térmico, choque de presión, privación de nutrientes y/o exposición a determinados ácidos. El choque térmico consiste en calentar las esporas durante un periodo de tiempo suficiente a una temperatura suficiente para inducir la producción de proteínas de choque térmico. Los procedimientos de choque de esporas bacterianas son conocidos en la técnica. Por ejemplo, Atluri *et al.* (2006, Journal of Bacteriology, 188(1): 28-36) describen uno de estos tratamientos de choque térmico para *Bacillus subtilis*.

50 Las composiciones utilizadas en esta invención comprenden (a) una espora bacteriana y (b) un compuesto germinativo que es un L-aminoácido, en las que la composición comprende una mezcla íntima seca de la espora bacteriana y el L-aminoácido y en las que el L-aminoácido se adsorbe sobre la espora bacteriana o es absorbido por la misma, y el L-aminoácido se selecciona entre L-alanina, L-valina, L-prolina, L-leucina, L-cisteína, L-treonina, L-glutamina, L-asparagina y L-fenilalanina; caracterizadas porque dicha espora y el compuesto germinativo se mantienen en una forma inactiva de modo que el compuesto germinativo no inducirá la germinación de la espora hasta que dicha composición se someta a un entorno de activación. Dichas composiciones son útiles para la producción de la planta o parte de la planta recubierta (por ejemplo, material de propagación vegetal) de la presente invención, así como para los otros usos descritos en el presente documento, tales como la remediación medioambiental, el tratamiento de aguas residuales, la prevención o el tratamiento de enfermedades, la recuperación de petróleo o el uso en sistemas de acuicultura.

- 5 Tal como se emplea en el presente documento, la expresión "entorno de activación" se refiere a un entorno que permite que el compuesto germinativo y la espora interactúen, de tal manera que la espora es inducida a entrar en un estado vegetativo. Dicho entorno de activación puede implicar la adición de agua (a través de la lluvia, de la humedad del suelo o del agua añadida al material de propagación vegetal recubierto antes de la siembra), o puede requerir una combinación de factores, tales como la temperatura, la humedad, el pH o la salinidad.
- 10 En consecuencia, tales composiciones comprenden mezclas secas de la espora y el compuesto germinativo; otros materiales que pueden ser utilizados en la composición para evitar que la espora y el compuesto germinativo interactúen incluyen, entre otros, tensioactivos, agentes secuestrantes, plastificantes, colorantes y tintes, abrillantadores, emulsionantes, agentes de flujo, agentes coalescentes, agentes antiespumantes, espesantes, ceras, cargas, polímeros, agentes humectantes y agentes anticongelantes.
- 15 En la presente invención, la espora y el compuesto germinativo, a saber, el L-aminoácido, están en mezcla íntima entre sí.
- 20 Tal como se emplea en el presente documento, la expresión "mezcla íntima" se refiere a una mezcla en la que las esporas y los compuestos germinativos se mantienen en posición próxima hasta que alcanzan un entorno propicio para la germinación, es decir, un entorno de activación.
- 25 Dicha mezcla íntima puede conseguirse empleando procesos, tales como el secado por pulverización, el liofilizado, el secado al aire o el secado en tambor. En una realización preferida, la mezcla íntima se produce por secado por pulverización o liofilización. Al formar tales mezclas íntimas, es importante que la espora y el compuesto germinativo no se mezclen en condiciones que permitan que el compuesto germinativo haga germinar la espora, ya que esto podría causar una germinación prematura con un efecto adverso sobre la conservación de la mezcla. Esto puede evitarse empleando corrientes separadas en un pulverizador-secador, ya sea utilizando dos boquillas o una boquilla única que permita la pulverización simultánea de dos corrientes separadas; o liofilizando en condiciones (por ejemplo, de temperatura) que no favorezcan la germinación. La germinación prematura también puede evitarse introduciendo la masa de esporas en una solución que contenga el compuesto germinativo inmediatamente antes del secado.
- 30 En una realización preferida, el compuesto germinativo se adsorbe sobre la espora bacteriana o es absorbido por la misma en la mezcla íntima. En otra realización, la espora bacteriana y el compuesto germinativo están finamente dispersos en la mezcla íntima. En otra realización, la espora bacteriana y el compuesto germinativo están microscópicamente dispersos en la mezcla íntima, de modo que las partículas individuales que consisten fundamentalmente en esporas bacterianas y las partículas individuales que consisten fundamentalmente en compuestos germinativos no son visibles a simple vista.
- 35 En una realización, la mezcla íntima se prepara combinando la espora bacteriana y el compuesto germinativo en una solución antes del secado. Preferentemente, la espora bacteriana y el compuesto germinativo se combinan en una solución inmediatamente antes del secado.
- 40 Aunque sin querer ceñirse a ninguna teoría, se cree que la formación de una mezcla íntima coloca al compuesto germinativo en una posición próxima donde puede unirse más preferentemente a los sitios iniciadores de la germinación de la espora cuando la mezcla alcanza un entorno apropiado para la germinación. Esta posición próxima permite que el compuesto germinativo supere a los compuestos que interfieren en la germinación (tales como los D-aminoácidos) que puedan estar presentes, con el resultado de que germinará un mayor porcentaje de esporas. Debido al crecimiento logarítmico de las bacterias una vez que entran en la fase vegetativa, un porcentaje tan elevado puede dar lugar rápidamente a un aumento en varias cifras de escala logarítmica en la formación de cultivos.
- 45 Tales composiciones pueden comprender además otros componentes, que incluyen cogermiñantes, nutrientes y coadyuvantes de formulación, siempre que tales aditivos no induzcan a la espora y al compuesto germinativo a interactuar prematuramente.
- 50 La planta o parte de la planta (por ejemplo, el material de propagación vegetal) que se va a recubrir según la invención puede ser de cualquier especie vegetal que pueda beneficiarse de la presencia de un inoculante o de un microbio estimulante del crecimiento de la planta o plaguicida.
- 55 La planta o parte de la planta (por ejemplo, material de propagación vegetal) puede recubrirse con la bacteria y el compuesto germinativo por cualquier medio convencional empleado generalmente para recubrir material vegetal (por ejemplo, semillas u otro material germinativo), siempre que dicho medio no afecte negativamente a la viabilidad de las esporas y que dicho medio no provoque que el compuesto germinativo cambie prematuramente la bacteria a su estado vegetativo. Los medios convencionales que pueden emplearse incluyen el tratamiento por pulverización, el tratamiento por goteo, el tratamiento por empapado, el tratamiento por pintura, el tratamiento por recubrimiento de película, el tratamiento por recubrimiento de gránulos y similares. Los procedimientos de recubrimiento de semillas son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7 989 391 y la patente de EE. UU. n.º 5 849 320.
- En determinadas realizaciones, la planta o parte de la planta (por ejemplo, una semilla) se recubre con la composición antes de la germinación o antes de emerger del medio de crecimiento en el que se planta (por ejemplo, el suelo). En otras realizaciones, la planta o parte de la planta se recubre con la composición tras de la germinación o tras emerger

del medio de crecimiento en el que se planta (por ejemplo, el suelo), por ejemplo, mediante la pulverización de la composición sobre una planta que crece en un campo o en invernadero.

Al aplicar dicho recubrimiento, es importante que la espora y el compuesto germinativo no se mezclen en condiciones que permitan que el compuesto germinativo haga germinar la espora, ya que esto podría causar una germinación prematura con un efecto adverso sobre la conservación de la mezcla. Una forma de evitarlo es emplear corrientes separadas en un secador por pulverización, ya sea utilizando dos boquillas o una única boquilla que permita la pulverización simultánea de dos corrientes separadas; o liofilizando en condiciones (por ejemplo, de temperatura) que no favorezcan la germinación.

Además de los ingredientes biológicamente activos, las composiciones de recubrimiento de semillas pueden incluir muchos materiales y aditivos que forman parte de las formulaciones del ingrediente activo o que contribuyen a las cualidades de manipulación del recubrimiento de semillas o a su funcionalidad y durabilidad sobre la semilla. Un ejemplo de aditivo de recubrimiento es un polímero de recubrimiento que une los ingredientes activos a la semilla. Los polímeros de recubrimiento de semillas pueden incluir, por ejemplo, entre otros, proteínas, polisacáridos, poliésteres, poliuretanos, polímeros preparados a partir de monómeros insaturados y combinaciones de los mismos.

Otros aditivos que contribuyen a las cualidades de manipulación del recubrimiento de semillas o a su funcionalidad y durabilidad sobre la semilla incluyen, entre otros, tensioactivos, agentes secuestrantes, plastificantes, colorantes y tintes, abrillantadores, emulsionantes, agentes de flujo, agentes coalescentes, agentes antiespumantes, espesantes, ceras, bactericidas, cargas, polímeros, agentes humectantes y agentes anticongelantes. La naturaleza y la acción de estos aditivos son bien conocidas por los expertos en el arte de la formulación. Los aditivos no deben interferir en la acción de la bacteria.

Los aglutinantes que son útiles en la presente invención comprenden preferentemente un polímero adhesivo que puede ser natural o sintético y que no tiene efecto fitotóxico sobre la semilla a recubrir. El aglutinante puede seleccionarse entre poli(acetatos de vinilo); copolímeros de poli(acetato de vinilo); copolímeros de etileno-acetato de vinilo (EVA); poli(alcoholes vinílicos); copolímeros de poli(alcohol vinílico); celulosas, incluidas etilcelulosas, metilcelulosas, hidroximetilcelulosas, hidroxipropilcelulosas y carboximetilcelulosa; polivinilpirrolidonas; polisacáridos, incluidos almidón, almidón modificado, dextrinas, maltodextrinas, alginato y quitosanos; grasas; aceites; proteínas, incluidas gelatina y zeínas; goma arábiga; goma laca; cloruro de vinilideno y copolímeros de cloruro de vinilideno; lignosulfonatos de calcio; copolímeros acrílicos; poli(acrilatos de vinilo); poli(óxido de etileno); polímeros y copolímeros de acrilamida; poli(acrilato de hidroxietilo), monómeros de metilacrilamida; y policloropreno.

La cantidad de aglutinante en el recubrimiento puede variar, pero estará en el intervalo de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 25 % del peso de la semilla, más preferentemente de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 15 %, y aún más preferentemente de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 10 %.

El revestimiento del material de propagación puede incluir opcionalmente una carga. La carga puede ser un absorbente o una carga inerte, tales como las conocidas en la técnica, y puede incluir harinas de madera, arcillas, carbono activado, azúcares, tierra de diatomeas, harinas de cereales, sólidos inorgánicos de grano fino, carbonato de calcio y similares. Entre las arcillas y los sólidos inorgánicos que pueden utilizarse figuran la bentonita de calcio, el caolín, el caolín de China, el talco, la perlita, la mica, la vermiculita, las sílices, el polvo de cuarzo, la montmorillonita y sus mezclas. Los azúcares, que pueden ser útiles, incluyen la dextrina y la maltodextrina. Las harinas de cereales incluyen la harina de trigo, la harina de avena y la harina de cebada.

La carga se selecciona de manera que proporcione un microclima adecuado para la semilla, por ejemplo, la carga se utiliza para aumentar la tasa de carga de los ingredientes activos y para ajustar el control de liberación de los ingredientes activos. La carga puede ayudar en la producción o en el proceso de recubrimiento de la semilla. La cantidad de carga puede variar, pero generalmente el peso de los componentes de carga estará en el intervalo de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 75 % del peso de la semilla, más preferentemente de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 50 %, y aún más preferentemente de aproximadamente el 0,5 % al 15 %.

Opcionalmente, puede utilizarse un plastificante en la formulación del revestimiento. Los plastificantes se utilizan normalmente para hacer más flexible la película formada por la capa de recubrimiento, para mejorar la adherencia y la capacidad de extensión, y para mejorar la velocidad de procesamiento. La mejora de la flexibilidad del film es importante para minimizar el astillado, la rotura o el descascarillado durante el almacenamiento, la manipulación o los procesos de siembra. Pueden utilizarse muchos plastificantes, aunque los plastificantes útiles incluyen el polietilenglicol, el glicerol, el butilbencilftalato, los benzoatos de glicol y compuestos relacionados. El plastificante en la capa de recubrimiento estará en el intervalo de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 20 % en peso.

Las semillas tratadas también pueden ser envueltas con un recubrimiento de película para proteger el recubrimiento de los componentes activos. Dichos recubrimientos son conocidos en la técnica y pueden aplicarse utilizando técnicas convencionales de recubrimiento con película con tambor y lecho fluidizado.

La invención también se refiere a un procedimiento para potenciar un rasgo relacionado con el rendimiento de una planta o parte de una planta (por ejemplo, un material de propagación vegetal) que comprende el recubrimiento de la

planta con una composición que comprende: a) una espora bacteriana; y b) un compuesto germinativo, en el que el rasgo relacionado con el rendimiento de la planta se potencia en relación con el rasgo relacionado con el rendimiento de una planta correspondiente que no está recubierta con dicha composición.

- 5 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "rasgo relacionado con el rendimiento" se refiere a cualquier rasgo que pueda contribuir a aumentar el rendimiento de una planta. Los rasgos relacionados con el rendimiento que pueden potenciarse mediante los procedimientos de la invención incluyen, entre otros, la germinación total de las semillas, el índice de germinación de las semillas (por ejemplo, el número de días necesarios para la germinación de las semillas), la biomasa de la planta, la tolerancia a enfermedades, la tolerancia a los insectos, la tolerancia a la sequía, la tolerancia al calor, la tolerancia al frío, la tolerancia a la salinidad, la tolerancia a metales pesados, el
- 10 rendimiento total, el rendimiento de semillas, el momento de la floración (por ejemplo, floración precoz), el crecimiento de las raíces, el vigor precoz, la biomasa de la planta, el tamaño de la planta, el peso seco total de la planta, el peso seco de las partes aéreas, el peso fresco de las partes aéreas, la superficie foliar, el volumen del tallo, la altura de la planta, el diámetro de la roseta, la longitud de la hoja, la longitud de la raíz, la masa radicular, el número de vástagos y el número de hojas.
- 15 En determinadas realizaciones, el rasgo relacionado con el rendimiento se selecciona del grupo que consiste en el rendimiento total, la germinación total de las semillas, el índice de germinación de las semillas, la biomasa de la planta, la tolerancia a los insectos, la floración temprana y la tolerancia a la sequía.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "germinación total de las semillas" se refiere al porcentaje de semillas que germinan tras la siembra.

- 20 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "biomasa" se refiere al peso total de una planta. Dentro de la definición de biomasa, se puede distinguir entre la biomasa de una o más partes de una planta, que puede incluir una o más de las siguientes: partes aéreas, incluidas, entre otras, biomasa de brotes, biomasa de semillas, biomasa de hojas; partes aéreas cosechables, incluidas, entre otras, biomasa de brotes, biomasa de semillas, biomasa de hojas; partes subterráneas, incluidas, entre otras, biomasa de raíces, tubérculos, bulbos; partes subterráneas cosechables,
- 25 incluidas, entre otras, biomasa de raíces, tubérculos, bulbos; partes cosechables parcialmente subterráneas, incluidas, entre otras, remolachas y otras zonas de hipocótilo de una planta, rizomas, estolones o tallos de raíces rastreras; biomasa vegetativa, incluidas, entre otras, la biomasa de raíces, la biomasa de brotes; órganos reproductores; y propágulos, incluidos, entre otros, semillas.

- 30 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "floración temprana" se refiere a una planta que comienza a florecer antes que una planta de control. Por tanto, esta expresión se refiere a las plantas que muestran un inicio de floración más temprano. El tiempo de floración de las plantas puede evaluarse contando el número de días ("tiempo hasta florecer") transcurridos entre la siembra y la aparición de una primera inflorescencia. El "tiempo de floración" de una planta puede determinarse, por ejemplo, utilizando el procedimiento descrito en el documento WO07/093444.

- 35 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "condiciones de sequía" hace referencia a cualquier estrés que provoque una falta de contenido de agua en las plantas, una falta de disponibilidad de agua para las plantas, una falta de potencial de absorción de agua en las plantas o una reducción del suministro de agua a las plantas. Concretamente, una "sequía" se refiere a una deficiencia de precipitaciones resultante de un patrón meteorológico a corto o largo plazo. Los expertos en la materia determinan con facilidad las condiciones de sequía. Por ejemplo, el índice Palmer de gravedad de la sequía ("Palmer Drought Severity Index", PDSI), que es una medida de la humedad del suelo, el índice de humedad de los cultivos ("Crop Moisture Index", CMI) y el índice Z pueden utilizarse para
- 40 determinar las condiciones de sequía.

- Los rasgos relacionados con el rendimiento pueden potenciarse utilizando los procedimientos de la presente invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones, cualquiera de los rasgos relacionados con el rendimiento descritos en el presente documento puede potenciarse en al menos aproximadamente un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 100 %, un 150 %, un 200 %, un 300 %, un 400 %, un 500 %, un 600 %, un 700 %, un 800 %, un 900 % o un 1000 % en una planta (por ejemplo, un material de propagación vegetal al que se ha aplicado una composición de la invención en relación con un material de propagación vegetal de control al que no se ha aplicado una composición de la invención).
- 45

- 50 Por ejemplo, en algunas realizaciones, la germinación total de las semillas puede incrementarse en al menos aproximadamente un 1 %, un 2 %, un 3 %, un 4 %, un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 % en un material de propagación vegetal (por ejemplo, una semilla) al que se ha aplicado una composición de la invención en relación con un material de propagación vegetal de control (por ejemplo, una semilla) al que no se ha aplicado una composición de la invención. Cualquiera de estos valores puede utilizarse para definir un intervalo para el aumento de la germinación total de las semillas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la germinación de las semillas puede incrementarse en un 5 % a un 10 %, en un 5 % a un 20 % o en un 5 % a un 50 %. En otra realización, el número de días necesarios para la germinación de las semillas puede disminuir en 1 día en un material de propagación vegetal (por ejemplo, una semilla) al que se ha aplicado una composición de la invención, en comparación
- 55

- 5 con un material de propagación vegetal de control (por ejemplo, una semilla) al que no se ha aplicado una composición de la invención. En una realización, los días necesarios para la germinación de las semillas pueden disminuir en 0,5 días, 1 día, 1,5 días, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días o 14 días en un material de propagación vegetal (por ejemplo, una semilla) al que se ha aplicado una composición de la invención y agua, en comparación con un material de propagación vegetal de control (por ejemplo, una semilla) al que no se ha aplicado una composición de la invención. Cualquiera de estos valores puede utilizarse para definir un intervalo para la disminución del número de días necesarios para la germinación de las semillas. Por ejemplo, los días necesarios para la germinación de las semillas pueden reducirse en 1 a 2 días, en 1 a 5 días o en 2 a 5 días.
- 10 En otra realización, la biomasa de la planta puede mejorarse en al menos aproximadamente un 1 %, un 2 %, un 3 %, un 4 %, un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 % en una planta (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que se ha aplicado una composición de la invención, en comparación con una planta de control (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que no se ha aplicado una composición de la invención. Cualquiera de estos valores puede utilizarse para definir un intervalo para el aumento de la biomasa vegetal.
- 15 Por ejemplo, en algunas realizaciones, la biomasa vegetal se incrementa en un 5 % a un 10 %, en un 5 % a un 20 %, o en un 5 a un 50 %.
- 20 En algunas realizaciones, la tolerancia a los insectos puede potenciarse en al menos aproximadamente un 1 %, un 2 %, un 3 %, un 4 %, un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 % en una planta (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que se ha aplicado una composición de la invención, en comparación con una planta de control (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que no se ha aplicado una composición de la invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la tolerancia a los insectos se incrementa en un 5 % a un 10 %, en un 5 a un 20 % o en un 5% a un 30 %.
- 25 La tolerancia a los insectos, la tolerancia a enfermedades y la tolerancia al estrés ambiental (por ejemplo, tolerancia a la sequía) pueden medirse midiendo cualquiera de los rasgos relacionados con el rendimiento descritos en el presente documento en condiciones de estrés biótico o abiótico. Por ejemplo, la tolerancia a la sequía puede determinarse midiendo el porcentaje de germinación, el índice de germinación, la biomasa de la planta, el rendimiento o el rendimiento de semillas en condiciones de sequía. La tolerancia a los insectos, a enfermedades o al estrés medioambiental pueden cuantificarse midiendo el rasgo relacionado con el rendimiento en las condiciones adecuadas.
- 30 Por ejemplo, se determinaría que una planta (por ejemplo, un material de propagación vegetal) tratada con una composición de la invención que presentase un aumento del 10 % en el rendimiento en relación con un material de propagación vegetal que no hubiera sido tratado con la composición presenta un aumento del 10 % en la tolerancia a la sequía. Como otro ejemplo, se determinaría que una planta (por ejemplo, un material de propagación vegetal) tratada con una composición de la invención que presentase un aumento del 10 % en el índice de caída de hojas, en comparación con una planta (por ejemplo, un material de propagación vegetal) que no fue hubiera sido tratada con la composición presenta un aumento del 10 % en la tolerancia a los insectos. Una planta con un mayor índice de caída de hojas es más resistente a la infestación o al ataque de insectos.
- 35 En algunas realizaciones, la tolerancia a enfermedades o la tolerancia a herbívoros puede incrementarse en al menos aproximadamente un 1 %, un 2 %, un 3 %, un 4 %, un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 % en una planta (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que se ha aplicado una composición de la invención en relación con una planta de control (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que no se ha aplicado una composición de la invención. En algunas realizaciones, la tolerancia a la sequía puede incrementarse en al menos aproximadamente un 1 %, un 2 %, un 3 %, un 4 %, un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 % en una planta (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que se ha aplicado una composición de la invención en relación con una planta de control (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que no se ha aplicado una composición de la invención. Cualquiera de estos valores puede utilizarse para definir un intervalo para el aumento de la tolerancia a enfermedades o a herbívoros. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el aumento de la tolerancia a enfermedades o a herbívoros es del 5 % al 10 %, del 5 % al 20 % o del 5 % al 30 %.
- 40 En algunas realizaciones, la tolerancia al calor o al frío puede incrementarse en al menos aproximadamente un 1 %, un 2 %, un 3 %, un 4 %, un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 % en una planta (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que se ha aplicado una composición de la invención en relación con una planta de control (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que no se ha aplicado una composición de la invención. Cualquiera de estos valores puede utilizarse para definir un intervalo para el aumento de la tolerancia al calor o al frío. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el aumento de la tolerancia al calor o al frío es del 5 % al 10 %, del 5 % al 20 % o del 5 % al 30 %.
- 45 En algunas realizaciones, la tolerancia a la salinidad o la tolerancia a metales pesados puede incrementarse en al menos aproximadamente un 1 %, un 2 %, un 3 %, un 4 %, un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 % en una planta (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que se ha aplicado una composición de la invención en relación con una planta de control (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que no se ha aplicado una composición de la invención. Cualquiera de estos valores puede utilizarse para definir un intervalo para el aumento de la tolerancia a la salinidad o a metales pesados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el aumento de la tolerancia a la salinidad o a metales pesados es del 5 % al 10 %, del 5 % al 20 % o del 5 % al 30 %.
- 50 En algunas realizaciones, la tolerancia a la salinidad o la tolerancia a metales pesados puede incrementarse en al menos aproximadamente un 1 %, un 2 %, un 3 %, un 4 %, un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 % en una planta (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que se ha aplicado una composición de la invención en relación con una planta de control (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que no se ha aplicado una composición de la invención. Cualquiera de estos valores puede utilizarse para definir un intervalo para el aumento de la tolerancia a la salinidad o a metales pesados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el aumento de la tolerancia a la salinidad o a metales pesados es del 5 % al 10 %, del 5 % al 20 % o del 5 % al 30 %.
- 55 En algunas realizaciones, la tolerancia a la salinidad o la tolerancia a metales pesados puede incrementarse en al menos aproximadamente un 1 %, un 2 %, un 3 %, un 4 %, un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 % en una planta (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que se ha aplicado una composición de la invención en relación con una planta de control (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que no se ha aplicado una composición de la invención. Cualquiera de estos valores puede utilizarse para definir un intervalo para el aumento de la tolerancia a la salinidad o a metales pesados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el aumento de la tolerancia a la salinidad o a metales pesados es del 5 % al 10 %, del 5 % al 20 % o del 5 % al 30 %.
- 60 En algunas realizaciones, la tolerancia a la salinidad o la tolerancia a metales pesados puede incrementarse en al menos aproximadamente un 1 %, un 2 %, un 3 %, un 4 %, un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 % en una planta (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que se ha aplicado una composición de la invención en relación con una planta de control (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que no se ha aplicado una composición de la invención. Cualquiera de estos valores puede utilizarse para definir un intervalo para el aumento de la tolerancia a la salinidad o a metales pesados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el aumento de la tolerancia a la salinidad o a metales pesados es del 5 % al 10 %, del 5 % al 20 % o del 5 % al 30 %.

5 95 % o un 100 % en una planta (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que se ha aplicado una composición de la invención en relación con una planta de control (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que no se ha aplicado una composición de la invención. La tolerancia a la salinidad o a metales pesados puede determinarse mediante procedimientos habituales en la técnica. Por ejemplo, la salinidad puede determinarse midiendo el intercambio de cationes, por ejemplo, de cálcicos a sódicos. Cualquiera de estos valores puede utilizarse para definir un intervalo de aumento de la tolerancia a la salinidad o a metales pesados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el aumento de la tolerancia a la salinidad o a metales pesados puede ser del 5 % al 10 %, del 5 % al 20 % o del 5 % al 30 %.

10 En algunas realizaciones, el rendimiento total puede incrementarse en al menos aproximadamente un 1 %, un 2 %, un 3 %, un 4 %, un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 % en una planta (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que se ha aplicado una composición de la invención en relación con una planta de control (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que no se ha aplicado una composición de la invención. Cualquiera de estos valores puede utilizarse para definir un intervalo para el aumento del rendimiento total. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el rendimiento total se incrementa en un 1 % a un 5 %, en un 1 a un 10 % o en un 1 % a un 15 %.

15 En algunas realizaciones, el crecimiento radicular, el vigor temprano, el tamaño de la planta, el peso seco total de la planta, el peso seco de las partes aéreas, el peso fresco de las partes aéreas, el área foliar, el volumen del tallo, la altura de la planta, el diámetro de la roseta, la longitud de la hoja, la longitud de la raíz, la masa radicular, el número de vástagos o el número de hojas pueden incrementarse en al menos aproximadamente un 1 %, un 2 %, un 3 %, un 4 %, un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 % en una planta (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que se ha aplicado una composición de la invención en relación con una planta de control (por ejemplo, un material de propagación vegetal) a la que no se ha aplicado una composición de la invención. Cualquiera de estos valores puede utilizarse para definir un intervalo para el aumento del crecimiento radicular, el vigor temprano, el tamaño de la planta, el peso seco total de la planta, el peso seco de las partes aéreas, el peso fresco de las partes aéreas, la superficie foliar, el volumen del tallo, la altura de la planta, el diámetro de la roseta, la longitud de la hoja, la longitud de la raíz, la masa radicular, el número de vástagos o el número de hojas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el crecimiento radicular, el vigor temprano, el tamaño de la planta, el peso seco total de la planta, el peso seco de las partes aéreas, el peso fresco de las partes aéreas, el área foliar, el volumen del tallo, la altura de la planta, el diámetro de la roseta, la longitud de la hoja, la longitud de la raíz, la masa radicular, el número de vástagos o el número de hojas pueden incrementarse en un 1 % a un 5 %, en un 5 % a un 10 % o en un 5 % a un 20 %.

20 Generalmente, un "rasgo potenciado relacionado con el rendimiento" o la "potenciación de un rasgo relacionado con el rendimiento" se refiere a un nivel del rasgo en una planta de ensayo (por ejemplo, un material de propagación vegetal) que es mayor que el error estándar del ensayo empleado para evaluar el nivel del rasgo, y es preferentemente al menos dos veces, y más preferentemente tres, cuatro, cinco o diez veces el nivel del rasgo en una muestra de control (por ejemplo, una muestra de un material de propagación vegetal que no ha entrado en contacto con la composición de la invención) y, preferentemente, el nivel de expresión promedio del rasgo en varias muestras de control.

25 También se pretende que los valores e intervalos incluidos y/o intermedios dentro de los intervalos expuestos en el presente documento estén dentro del alcance de la presente divulgación. También se pretende que los intervalos con valores indicados en el presente documento como límite superior o inferior se incluyan en el alcance de la presente divulgación.

30 La invención también describe un procedimiento para alimentar a un animal en un sistema de acuicultura, que comprende la administración de un pienso que comprende cualquiera de las composiciones antes mencionadas que comprenden una espora bacteriana y un compuesto germinativo al animal en el sistema de acuicultura. En determinadas realizaciones, el animal se selecciona del grupo que consiste en peces, gambas o moluscos. En determinadas realizaciones, el crecimiento (por ejemplo, el peso corporal) del animal en el sistema de acuicultura aumenta en relación con un animal de control al que se le administra un pienso que no contiene la composición. En determinadas realizaciones, el animal está infectado con al menos uno de los patógenos proporcionados en la tabla 1A que aparece a continuación.

35 Por ejemplo, en algunas realizaciones, el peso corporal puede aumentar en al menos aproximadamente un 1 %, un 2 %, un 3 %, un 4 %, un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 % en un animal al que se ha administrado un pienso que comprende una composición de la invención en relación con un animal de control al que no se ha administrado un pienso que comprende una composición de la invención. Cualquiera de estos valores puede utilizarse para definir un intervalo para el aumento del peso corporal. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el peso corporal puede incrementarse en un 5 % a un 10 %, en un 5 % a un 20 % o en un 5 % a un 50 %.

40 En determinadas realizaciones de los procedimientos mencionados, la espora bacteriana se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus*.

- En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento no terapéutico para alimentar a un animal que comprende administrar a un animal una composición que comprende una espora bacteriana y un compuesto germinativo como se describe en el presente documento. En determinadas realizaciones, el pienso puede administrarse al animal junto con otros ingredientes de piensos. El animal puede ser cualquier animal de interés. En determinadas realizaciones, el animal es un animal seleccionado del grupo que consiste en aves de corral, rumiantes, terneros, cerdos, conejos, caballos, peces y animales de compañía. Las composiciones pueden administrarse a una dosis de al menos  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  o  $10^9$  unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias por gramo de pienso. Las composiciones también pueden administrarse al animal añadiendo la composición al agua de bebida del animal, pulverizando la composición sobre los animales o aplicándola mediante pasta, gel o píldora grande.
- La invención también se refiere a un procedimiento de preparación de ensilado que comprende aplicar una composición que comprende una espora bacteriana y un L-aminoácido al ensilado, en el que la composición comprende una mezcla íntima seca de la espora bacteriana y el L-aminoácido, y en el que el L-aminoácido se adsorbe sobre la espora bacteriana o es absorbido por la misma, y el L-aminoácido se selecciona entre L-alanina, L-valina, L-prolina, L-leucina, L-cisteína, L-treonina, L-glutamina, L-asparagina y L-fenilalanina.
- El ensilado es un tipo de pienso producido por la fermentación de biomasa vegetal, tal como hierba, heno, cereales o maíz en silos u otros depósitos cerrados. En el tratamiento de materias primas agrícolas para la producción de ensilado, la biomasa vegetal, tal como hierba o maíz, se mezcla con bacterias lácticas para formar el ensilado. La producción de ensilado es un procedimiento bien conocido para aumentar la estabilidad de los piensos y mejorar las propiedades de las materias primas. Para la producción de ensilados, el maíz y las gramíneas, el mijo, los cereales con o sin grano y las leguminosas son materias primas adecuadas. Para producir ensilados, se utilizan con frecuencia coadyuvantes de ensilado, denominados iniciadores del ensilado, que comprenden tanto aditivos químicos como microbianos. También pueden añadirse aditivos microbianos al ensilado, por ejemplo, para inhibir el crecimiento de organismos contaminantes, para reducir las micotoxinas o para reducir las emisiones de metano de los rumiantes. Los procedimientos para preparar ensilado que contiene aditivos microbianos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento US 2011/0142991.
- En determinadas realizaciones, el ensilado comprende al menos aproximadamente  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  o  $1 \times 10^9$  UFC de la bacteria por gramo de ensilado. Cualquiera de estos valores puede utilizarse para definir un intervalo de concentración de la cepa bacteriana en el ensilado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ensilado comprende al menos de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7$  CFU, de  $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$  CFU o de  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  UFC de la cepa bacteriana por gramo de ensilado.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar principios de la invención.

En los siguientes ejemplos, los términos "GOSD" ("Germination Optimized Spray Drying", secado por pulverización optimizado para la germinación) y "GO+" se refieren a composiciones en las que un optimizador germinativo (L-alanina, a menos que se especifique lo contrario) fue secado por pulverización con la especie concreta de *Bacillus* indicada. Las esporas de especies de *Bacillus* se secaron por pulverización, introduciendo L-alanina en la masa de esporas inmediatamente antes del secado por pulverización como una solución que contenía 0,044 gramos de alanina por mililitro de agua destilada.

El término "GO-" se refiere a composiciones en las que la especie de *Bacillus* se secó por pulverización de manera similar sin que estuviera presente un compuesto germinativo.

Además, se empleó el siguiente procedimiento para determinar la germinación de las esporas en los ejemplos, a menos que se indique lo contrario. Cuando las esporas se colocan en soluciones nutritivas y comienzan a germinar, liberan ácido dipicolínico e iones, lo que provoca un oscurecimiento. Este indicador de la germinación se traduce en una disminución de la extinción óptica de la luz visible por la suspensión de esporas. El índice de germinación se determinó, por tanto, contando la proporción de esporas de fase oscura/brillante y controlando la disminución de la densidad óptica a 600 nm (D.O. 600) de suspensiones de esporas en germinación en un espectrofotómetro de UV-visible. A continuación, esta proporción se convirtió en porcentaje de germinación.

Ejemplo 1: Aumento de la germinación de *B. subtilis* ENV 923 en una mezcla íntima con L-alanina

Para comparar el índice de germinación de las esporas de mezclas íntimas de esta invención con la de las esporas empleadas convencionalmente en ausencia de un germinante, se realizaron los siguientes tratamientos:

5 A. Formación de una mezcla íntima: Las esporas de *B. subtilis* ENV 923 se secaron por pulverización, introduciendo L-alanina en la masa de esporas inmediatamente antes del secado por pulverización como una solución que contenía 0,044 gramos de alanina por mililitro de agua destilada. La mezcla íntima producida se germinó mediante su posterior introducción en una solución consistente en tampón fosfato 0,01 M en agua destilada con pH 7 resultante.

10 B. Mezcla convencional de esporas con un germinante: Las esporas de *B. subtilis* ENV 923 se secaron por pulverización y posteriormente se introdujeron en una solución consistente en tampón fosfato 0,01 M en agua destilada con pH 7 resultante. Tales esporas fueron germinadas por la introducción en una solución que consiste en tampón fosfato 0,01 M en agua destilada con pH 7 resultante, más 0,0001 gramos de alanina por mililitro de solución.

C. Germinación de esporas solas: Las esporas de *B. subtilis* ENV 923 se secaron por pulverización y posteriormente se introdujeron en una solución consistente en tampón fosfato 0,01 M en agua destilada con pH 7 resultante.

15 Se realizaron dos repeticiones de cada tratamiento. La siguiente tabla 1B muestra los resultados promedio de dichos tratamientos que afectan a la germinación de *B. subtilis* ENV 923, medidos por el descenso porcentual de la densidad óptica. Un descenso de la densidad óptica indica el avance de la germinación. La densidad óptica (DO) se midió a una longitud de onda de 600 nm con un espectrofotómetro de intervalo visible Jenway modelo 6320D. La L-alanina utilizada tenía una pureza del 99 % y procedía de Alfa Aesar; Heysham, Lancashire, Reino Unido.

20 Tabla 1B. Porcentaje de reducción de la DO (600 nm) de referencia a lo largo del tiempo.

Tiempo de muestreo (minutos)	0	5	10	15	20
Mezcla íntima	0 %	2,7 %	17,7 %	34,3 %	41,2 %
Mezcla convencional	0 %	0,5 %	18,8 %	31,9 %	33,7 %
Esporas solas	0 %	1,3 %	3,2 %	4,1 %	7,5 %

25 Los resultados anteriores demuestran que las esporas que se formulan en una mezcla íntima con un compuesto germinativo mediante procesos, tales como el secado por pulverización, germinan más rápidamente que las esporas que se mezclan de modo convencional con el mismo germinante. Así, el material de propagación de plantas recubierto con la composición de esta invención recibirá más rápida y eficientemente los beneficios asociados con la bacteria concreta con la que están recubiertos, ya que dicha bacteria estará presente en cantidades muy aumentadas.

Ejemplo 2: Aumento de la germinación de la cepa ENV923 de *Bacillus subtilis* tratada con GOSD

30 Las esporas de *Bacillus subtilis* se trataron con GOSD ("Germination Optimized Spray Drying", secado por pulverización optimizado para la germinación) mediante secado por pulverización de esporas en presencia de una solución de L-alanina, y los niveles de germinación se determinaron mediante lecturas de densidad óptica (DO).

*Tampón fosfato de potasio 0,01 M, pH 7*

35 El tampón fosfato de potasio 0,01 M se preparó utilizando soluciones de  $K_2HPO_4$  1 M (87,09 g disueltos en 0,5 l de agua destilada) y  $KH_2PO_4$  1 M (68,045 g disueltos en 0,5 l de agua destilada). Mediante la combinación de 61,5 ml de  $K_2HPO_4$  1 M con 38,5 ml de  $KH_2PO_4$  1 M y la dilución hasta 1000 ml con agua destilada se preparó tampón fosfato de potasio 0,1 M a pH 7,0. Mediante la dilución posterior del tampón fosfato de potasio 0,1 M con agua destilada en la proporción de 1:10, se obtuvo el tampón fosfato de potasio 0,01 M, pH 7,0. El tampón se esterilizó en autoclave a 121 °C durante sesenta (60) minutos.

40 Se prepararon suspensiones de esporas de *Bacillus subtilis* en una concentración de  $1,7 \times 10^8$  ufc/ml en tampón fosfato de potasio 0,01 M, pH 7,0, se incubaron en un baño de agua precalentado a 37 °C y se evaluó el porcentaje de germinación en intervalos de 5 minutos durante un período de 45 minutos.

Tabla 2.

Porcentaje de germinación de <i>Bacillus subtilis</i> ENV923 a 37 °C con y sin tratamiento GOSD										
Minutos	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
<i>B. subtilis</i> GOSD	0	13 %	45 %	63 %	64 %	75 %	76 %	80 %	81 %	83 %
<i>B. subtilis</i> de control	0	7 %	9 %	10 %	11 %	14 %	14 %	16 %	18 %	19 %

Conclusión: El tratamiento con GOSD aumentó significativamente el porcentaje de germinación y la velocidad de germinación de las esporas de *Bacillus subtilis* .

Ejemplo 3: Aumento de la germinación de la cepa ENV100 de *Bacillus licheniformis* tratada con GOSD

5 Las esporas de *Bacillus licheniformis* se trataron con GOSD mediante secado por pulverización de las esporas en presencia de 0,044 gramos de L-alanina por ml de agua destilada como se describe en el ejemplo 1. Los niveles de germinación se determinaron mediante lecturas de densidad óptica (DO), como se ha descrito anteriormente, utilizando tampón fosfato de potasio 0,01 M, pH 7,0, para la preparación de la suspensión de esporas.

10 Se prepararon suspensiones de esporas de *Bacillus licheniformis* en una concentración de  $1,29 \times 10^8$  ufc/ml en tampón fosfato de potasio 0,01 M, pH 7,0, se incubaron en el baño de agua precalentado a 37 °C y se evaluó el porcentaje de germinación en intervalos de cinco (5) minutos durante un período de cuarenta y cinco (45) minutos.

Tabla 3.

Porcentaje de germinación de suspensiones de esporas de <i>Bacillus licheniformis</i> tratadas y no tratadas										
Minutos	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
<i>B. licheniformis</i> , control	0	1 %	5 %	3 %	10 %	11 %	10 %	10 %	10 %	10 %
<i>B. licheniformis</i> , GOSD	0	4 %	5 %	39 %	60 %	81 %	85 %	88 %	91 %	91 %

Conclusión: El tratamiento con GOSD aumentó significativamente el porcentaje de germinación y la velocidad de germinación de las esporas de *Bacillus licheniformis* .

Ejemplo 4: Aumento de la germinación en diversos niveles de pH para la cepa ENV923 de *Bacillus subtilis* tratada con GOSD

15 Las esporas GO+ y GO- de la cepa ENV923 de *Bacillus subtilis* se prepararon como se ha descrito anteriormente y se resuspendieron en tampón fosfato de potasio 0,01 M a diversos niveles de pH. Las mediciones de DO<sub>600</sub> se realizaron como se ha descrito anteriormente.

*Tampones fosfato de potasio 0,01 M a pH 3,0 a 7,0*

Se preparó un tampón fosfato de potasio 0,01 M, pH 7,0, como se describe en el ejemplo 1.

20 • Para preparar tampones fosfato de potasio 0,01 M con un intervalo de pH de 3,0 a 6,0 como tampón base se utilizó tampón fosfato de potasio 0,1 M, pH 6,0 preparado mezclando 13,2 ml de soluciones de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 M y 86,8 ml de soluciones de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M (descritas en el ejemplo 1) y llevando el volumen a 1 l con agua destilada.

25 • Para obtener tampones fosfato de potasio 0,01 M con pH 5,0 a pH 3,0, se diluyó un tampón fosfato de potasio 0,1 M, pH 6,0, con agua destilada, se redujo el pH de los tampones hasta pH 5,0, pH 4,0 y pH 3,0 utilizando H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M y se completó el volumen final con agua destilada, manteniendo la proporción de tampón 0,1 M a agua destilada 1:10.

Los tampones preparados se conservaron a 4 °C y, antes de cada experimento, se reajustó el pH de los tampones usando NaOH 1 M o H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M.

Tabla 4. Resultados de la germinación con GOSD (GO+) y sin GOSD (GO-) en distintos niveles de pH; la tabla muestra el porcentaje de germinación medido a intervalos de 5 minutos.

Minutos	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
GO + pH 7	0	8 %	48 %	69 %	80 %	84 %	88 %	90 %	91 %	92 %
GO - pH 7	0	3 %	3 %	8 %	10 %	11 %	13 %	14 %	16 %	16 %
GO + pH 6	0	4 %	40 %	58 %	69 %	75 %	77 %	78 %	81 %	82 %
GO - pH 6	0	1 %	4 %	5 %	9 %	8 %	11 %	13 %	12 %	12 %
GO + pH 5	0	7 %	24 %	34 %	39 %	41 %	43 %	45 %	46 %	46 %
GO - pH 5	0	4 %	4 %	5 %	5 %	6 %	6 %	7 %	7 %	7 %
GO + pH 4	0	5 %	23 %	28 %	30 %	31 %	33 %	32 %	33 %	34 %
GO - pH 4	0	3 %	4 %	5 %	4 %	4 %	5 %	3 %	4 %	4 %
GO + pH 3,5	0	5 %	11 %	16 %	18 %	18 %	18 %	18 %	20 %	20 %
GO - pH 3,5	0	2 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	2 %	0 %	1 %
GO + pH 3	0	11 %	16 %	19 %	19 %	22 %	21 %	22 %	21 %	22 %
GO - pH 3	0	4 %	4 %	4 %	5 %	2 %	3 %	4 %	2 %	4 %

Conclusión: El tratamiento con GOSD permite que las esporas de *Bacillus subtilis* germinen más rápidamente y superen los efectos de los niveles más bajos de pH.

5 Ejemplo 5: Aumento de la germinación de la cepa ENV923 de *Bacillus subtilis* tratada con GOSD Respuesta de germinación de las esporas en función de distintos niveles de temperatura. La tabla muestra el porcentaje de germinación medido a intervalos de 10 minutos.

10 Las esporas de *Bacillus subtilis* cepa ENV 923 GOSD y control se prepararon como se ha descrito anteriormente. La germinación de las esporas se comprobó mediante mediciones de la densidad óptica (DO), tal como se ha descrito anteriormente. Se prepararon suspensiones de esporas para las mediciones de DO<sub>600</sub> y se enfriaron hasta 4 °C en tampón fosfato de potasio 0,01 M, pH 7,0 (preparación de tampón fosfato, pH 7,0) a una concentración de 1,7 × 10<sup>8</sup> ufc/ml. Para cada suspensión de esporas se prepararon 3 tubos de cultivo llenos a 3 ml de volumen. Tras la agitación y la medición inicial de la DO<sub>600</sub>, los tubos se incubaron en baños de agua precalentados hasta 25 °C, 30 °C y 37 °C durante 120 minutos. Los tubos se agitaron a intervalos de 10 minutos tubos y se realizaron mediciones de DO<sub>600</sub>.

15 Tabla 5. Porcentaje de germinación de *Bacillus subtilis* con GO- y GO+ a 37 °C, 30 °C y 25 °C

Minutos	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
GO+, 37 °C	0	36 %	58 %	63 %	68 %	70 %	70 %	71 %	70 %	70 %	70 %	70 %	70 %
GO+, 30 °C	0	12 %	32 %	45 %	52 %	55 %	58 %	59 %	58 %	60 %	60 %	60 %	60 %
GO+, 25 °C	0	1 %	9 %	16 %	23 %	28 %	32 %	33 %	35 %	37 %	36 %	35 %	35 %

Minutos	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
GO-, 37 °C	0	1 %	4 %	6 %	7 %	9 %	9 %	9 %	9 %	9 %	9 %	9 %	9 %
GO-, 30 °C	0	0 %	2 %	3 %	4 %	6 %	6 %	7 %	7 %	8 %	9 %	8 %	7 %
GO-, 25 °C	0	0 %	2 %	3 %	4 %	5 %	7 %	8 %	8 %	9 %	10 %	10 %	10 %

Conclusión: El tratamiento con GOSD (GO+) permite que las esporas de *Bacillus subtilis* germinen más rápidamente y superen los efectos de los regímenes de temperatura más bajos.

Ejemplo 6: Porcentaje de germinación de *Bacillus licheniformis* con y sin GOSD en presencia de diferentes soluciones molares de NaCl

*Medio:*

- 5 El medio fue un caldo de soja tréptico diluido (mTSB) (BD, 211822). El medio se preparó suspendiendo 50 mg de polvo de caldo de soja tréptico en 1 l de agua con calor y agitación hasta su completa disolución. A continuación, se formaron partes alícuotas en botellas y se esterilizó en autoclave durante 30 minutos a 121 °C. Según el contenido en polvo indicado por el fabricante, el medio mTSB contenía por litro:

Digestión pancreática de la caseína: 28,3 mg

- 10 Digestión pánica de soja: 5,0 mg

Dextrosa: 4,2 mg

Cloruro de sodio: 8,3 mg

Fosfato de dipotasio: 4,2 mg

- 15 Se añadió cloruro de sodio (Amresco X190) para inducir el estrés osmótico cuando fue apropiado, de modo que las concentraciones finales fueran 0,5 M o 1,5 M (29,22 g/l y 87,66 g/l, respectivamente) antes de calentar el medio y esterilizarlo en autoclave.

*Suspensiones de esporas:*

- 20 Las esporas en polvo de *Bacillus licheniformis* cepa ENV 100 tratadas o no tratadas con GOSD se suspendieron en agua estéril con Octosol SLS al 0,1 % (FT-SLS-246DRUM, Tiarco Chemical, Dalton, GA) dentro de un vaso de batidora estéril. Las esporas se suspendieron mezclándolas durante intervalos de 5 segundos durante un total de al menos 15 segundos o hasta que las esporas se suspendieron completamente, comprobándose de modo visual. Esto se realizó de forma que la concentración final en el vaso de la batidora fuera de  $2 \times 10^{10}$  ufc/ml. De esta suspensión de esporas, se transfirieron 250  $\mu$ l a tubos que contenían 4,75 ml de mTSB para obtener una concentración final de  $5 \times 10^8$  ufc/ml. Estas concentraciones se determinan mediante optimizaciones realizadas en cada lote de esporas para alcanzar una DO600 inicial de aproximadamente 0,6.

*Ensayo de germinación con DO:*

- Los tubos que contenían las esporas en suspensión se agitaron inmediatamente en vórtice, se midió la DO600 para el punto temporal cero y se incubaron en un baño de agua a 37 °C. A los intervalos de tiempo respectivos, se registró el tiempo, se retiraron los tubos, se agitaron en vórtice, se midió la DO600 y se devolvieron al baño de agua.
- 30 El porcentaje de disminución de la DO600 se determinó restando el valor medido del punto de tiempo cero, dividido por el punto de tiempo cero y multiplicado por 100 %. Anteriormente se había documentado que la germinación completa correspondía a una disminución del porcentaje de DO600 del 60 %. Por lo tanto, el porcentaje de germinación se determinó multiplicando el porcentaje de disminución de DO600 por 1,67.

Tabla 6. Porcentaje de germinación de esporas de *Bacillus licheniformis* durante una hora con GOSD (GO+) y sin GOSD (GO-) en presencia de soluciones 0 molar, 0,5 molar y 1,5 molar de NaCl

Tiempo	GO+ 0 M	GO- 0 M	GO+ 0,5 M	GO- 0,5 M	GO+ 1,5 M	GO- 1,5 M
0:00	0	0	0	0	0	0
0:11	7 %	0 %	29 %	1 %	15 %	2 %
0:16	23 %	0 %	49 %	0 %	30 %	0 %
0:22	44 %	3 %	61 %	0 %	44 %	0 %
0:27	53 %	0 %	67 %	0 %	48 %	0 %
0:32	59 %	0 %	70 %	1 %	53 %	0 %
0:38	64 %	0 %	74 %	1 %	56 %	0 %
0:43	68 %	0 %	75 %	0 %	58 %	0 %
0:49	71 %	0 %	77 %	0 %	61 %	0 %
0:55	72 %	0 %	77 %	2 %	63 %	0 %
1:01	75 %	0 %	78 %	2 %	66 %	0 %

Conclusión: El tratamiento con GOSD permite que las esporas de *Bacillus licheniformis* germinen más rápidamente y superen los efectos del estrés osmótico de diversos niveles de sales (NaCl).

5 Ejemplo 7: Porcentaje de germinación de *Bacillus licheniformis* con y sin GOSD en presencia de diferentes soluciones de cobre en partes por millón

*Medio:*

10 El medio mTSB se preparó como se indicó anteriormente, pero se suplementó con NaCl a una concentración final de 50 mM para crear un medio osmóticamente equilibrado. Se preparó una solución madre de  $1 \times 10^5$  ppm de nitrato de cobre(II) hemi(pentahidratado) (Alfa Aesar 12523) suspendiendo 2 g en 20 ml de agua y filtrando a  $0,22 \mu\text{m}$ . Esto se añadió a partes alícuotas de mTSB para obtener concentraciones finales de 0, 50, 100 y 200 ppm.

*Suspensiones de esporas:*

15 Las esporas en polvo de *Bacillus licheniformis* cepa ENV100 tratadas o no tratadas con GOSD se suspendieron en agua estéril con Octosol SLS al 0,1 % (FT-SLS-246DRUM, Tiarco Chemical, Dalton, GA) dentro de un vaso de batidora estéril. Las esporas se suspendieron mezclándolas durante intervalos de 5 segundos durante un total de al menos 15 segundos o hasta que las esporas se suspendieron completamente, comprobándose de modo visual. Esto se realizó de forma que la concentración final en el vaso de la batidora fuera de  $2 \times 10^9$  ufc/ml. De esta suspensión de esporas, se transfirieron 250  $\mu\text{l}$  a tubos que contenían 4,75 ml de mTSB para obtener una concentración final de  $5 \times 10^8$  ufc/ml. Estas concentraciones se determinan mediante optimizaciones realizadas en cada lote de esporas para alcanzar una DO600 inicial de aproximadamente 0,6.

20 *Ensayo de germinación con DO:*

Realizado y calculado como se indica en el ejemplo 6.

Tabla 7. Porcentaje de germinación de esporas de *Bacillus licheniformis* durante una hora con GOSD (GO+) y sin GOSD (GO-) en presencia de soluciones de 0, 50 ppm, 100 ppm y 200 ppm de iones cobre.

Tiempo	GO+ 0 ppm	GO- 0 ppm	GO+ 50 ppm	GO- 50 ppm	GO+ 100 ppm	GO- 100 ppm	GO+ 200 ppm	GO- 200 ppm
0:00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0:05	3,1 %	0,6 %	7,7 %	1,5 %	7,8 %	1,4 %	5,0 %	2,8 %
0:11	19,8 %	1,1 %	14,3 %	2,0 %	12,5 %	1,9 %	9,0 %	4,6 %
0:16	34,1 %	2,2 %	25,2 %	2,0 %	16,7 %	3,3 %	11,5 %	4,6 %
0:21	40,9 %	4,4 %	30,7 %	1,5 %	19,3 %	5,1 %	14,0 %	4,6 %
0:26	47,7 %	4,4 %	34,0 %	2,0 %	18,2 %	5,1 %	15,0 %	6,5 %
0:31	50,2 %	4,4 %	38,4 %	1,5 %	21,9 %	5,6 %	15,0 %	5,6 %
0:36	50,8 %	4,4 %	38,9 %	0,5 %	20,8 %	6,1 %	17,0 %	6,0 %
0:41	52,0 %	3,3 %	40,6 %	1,5 %	21,4 %	6,5 %	18,0 %	5,6 %
0:47	55,8 %	3,9 %	45,0 %	3,0 %	26,0 %	7,5 %	20,0 %	6,0 %
0:53	57,0 %	2,8 %	44,4 %	2,5 %	25,5 %	8,4 %	19,5 %	6,0 %
0:58	57,6 %	3,9 %	45,5 %	3,0 %	25,0 %	8,4 %	20,5 %	6,9 %
1:04	60,1 %	4,4 %	45,0 %	1,0 %	24,5 %	8,4 %	21,0 %	4,6 %
Conclusión: El tratamiento con GOSD permite que las esporas de <i>Bacillus licheniformis</i> germinen más rápidamente y superen los efectos de estrés de diversos niveles de iones cobre.								

5 Ejemplo 8: Porcentaje de germinación de *Bacillus licheniformis* con y sin GOSD en presencia de diferentes soluciones de aluminio en partes por millón

*Medio:*

10 El medio mTSB se preparó como se indicó anteriormente, pero se suplementó con NaCl a una concentración final de 50 mM para crear un medio osmóticamente equilibrado. Se preparó una solución madre de 1000 ppm de  $Al^{3+}$  suspendiendo 0,62 g de  $Al_2(SO_4)_3 \cdot 14 H_2O$  (Alfa Aesar 12362) en 50 ml de agua, y se filtró a 0,22  $\mu m$ . Esto se añadió a partes alícuotas de mTSB para obtener concentraciones finales de 0, 0,25, 0,50 y 1,0 ppm. A continuación, el pH del medio se redujo a pH 4,5 mediante la adición de HCl para permitir la separación completa del ion  $Al^{3+}$ .

*Suspensiones de esporas:*

15 Las esporas en polvo de *Bacillus licheniformis* cepa ENV100 tratadas o no tratadas con GOSD se suspendieron en agua estéril con Octosol SLS al 0,1 % (FT-SLS-246DRUM, Tiarco Chemical, Dalton, GA) dentro de un vaso de batidora estéril. Las esporas se suspendieron mezclándolas durante intervalos de 5 segundos durante un total de al menos 15 segundos o hasta que las esporas se suspendieron completamente, comprobándose de modo visual. Esto se realizó de forma que la concentración final en el vaso de la batidora fuera de  $2 \times 10^{10}$  ufc/ml. De esta suspensión de esporas, se transfirieron 250  $\mu l$  a tubos que contenían 4,75 ml de mTSB para obtener una concentración final de  $5 \times 10^8$  ufc/ml. Estas concentraciones se determinan mediante optimizaciones realizadas en cada lote de esporas para alcanzar una DO600 inicial de aproximadamente 0,6.

20

**Ensayo de germinación con DO:**

Realizado y calculado como en el ejemplo 6.

Tabla 8. Porcentaje de germinación de esporas de *Bacillus licheniformis* durante una hora con GOSD (GO+) y sin GOSD (GO-) en presencia de soluciones de 0, 0,25 ppm, 0,50 ppm y 1,0 ppm de iones aluminio.

5

Tiempo	GO+ 0 ppm	GO- 0 ppm	GO+ 0,25 ppm	GO- 0,25 ppm	GO+ 0,50 ppm	GO- 0,50 ppm	GO+ 1,00 ppm	GO- 1,00 ppm
0:00	0	0	0	0	0	0	0	0
0:07	21 %	2 %	9 %	1 %	26 %	2 %	30 %	3 %
0:14	48 %	3 %	47 %	4 %	50 %	4 %	52 %	3 %
0:22	62 %	3 %	60 %	5 %	63 %	4 %	63 %	4 %
0:30	67 %	2 %	66 %	4 %	67 %	4 %	67 %	3 %
0:37	70 %	3 %	68 %	5 %	70 %	4 %	70 %	3 %
0:44	71 %	3 %	69 %	4 %	71 %	4 %	71 %	3 %
0:52	72 %	3 %	70 %	4 %	72 %	5 %	71 %	3 %
0:59	72 %	3 %	70 %	5 %	74 %	6 %	73 %	4 %
1:07	72 %	3 %	72 %	5 %	74 %	5 %	72 %	4 %

Conclusión: El tratamiento con GOSD permite que las esporas de *Bacillus licheniformis* germinen más rápidamente y superen los efectos de estrés de diversos niveles de iones aluminio.

Ejemplo 9: Porcentaje de germinación de *Bacillus licheniformis* con y sin GOSD en presencia de diferentes soluciones milimolares de sales biliares

**Medio:**

10 El medio mTSB se preparó como se indicó anteriormente, pero se suplementó con NaCl a una concentración final de 50 mM para crear un medio osmóticamente equilibrado. Se preparó una solución madre de sales biliares 80 mM suspendiendo 2,5 g de taurodesoxicolato de sodio (Sigma T0875), 1,1 g de glucodesoxicolato de sodio (Sigma G9910) y 0,346 g de desoxicolato de sodio (Sigma D5670) en 100 ml de agua y filtrando a 0,22 µm. Esto se añadió a parte alícuotas de mTSB para obtener concentraciones finales de 0, 4, 6 y 8 mM.

15 **Suspensiones de esporas:**

Las esporas en polvo de *Bacillus licheniformis* cepa ENV100 tratadas o no tratadas con GOSD se suspendieron en agua estéril con Octosol SLS al 0,1 % (FT-SLS-246DRUM, Tiarco Chemical, Dalton, GA) dentro de un vaso de batidora estéril. Las esporas se suspendieron mezclándolas durante intervalos de 5 segundos durante un total de al menos 15 segundos o hasta que las esporas se suspendieron completamente, comprobándose de modo visual. Esto se realizó de forma que la concentración final en el vaso de la batidora fuera de  $2 \times 10^{10}$  ufc/ml. De esta suspensión de esporas, se transfirieron 250 µl a tubos que contenían 4,75 ml de mTSB para obtener una concentración final de  $5 \times 10^8$  ufc/ml. Estas concentraciones se determinan mediante optimizaciones realizadas en cada lote de esporas para alcanzar una DO600 inicial de aproximadamente 0,6.

**Ensayo de germinación con DO:**

25 Realizado y calculado como se indicó anteriormente.

Tabla 9. Porcentaje de germinación de esporas de *Bacillus licheniformis* durante una hora con GOSD (GO+) y sin GOSD (GO-) en presencia de soluciones de 0, 4 mM, 6 mM y 8 mM ppm de sales biliares.

Tiempo	GO+ 0 mM	GO - 0 mM	GO+ 4 mM	GO- 4 mM	GO+ 6 mM	GO- 6 mM	GO+ 8 mM	GO - 8 mM
0:00	0	0	0	0	0	0	0	0
0:05	13 %	4 %	17 %	1 %	22 %	1 %	29 %	7 %
0:10	44 %	5 %	44 %	1 %	50 %	2 %	56 %	10 %
0:15	61 %	5 %	61 %	1 %	62 %	1 %	67 %	9 %
0:20	70 %	5 %	69 %	2 %	70 %	3 %	73 %	11 %
0:26	76 %	5 %	73 %	2 %	75 %	2 %	77 %	11 %
0:31	78 %	5 %	77 %	3 %	78 %	3 %	81 %	11 %
0:36	81 %	5 %	80 %	2 %	80 %	3 %	83 %	11 %
0:41	83 %	6 %	82 %	3 %	82 %	2 %	84 %	11 %
0:46	85 %	7 %	83 %	2 %	84 %	2 %	86 %	11 %
0:51	86 %	6 %	85 %	2 %	86 %	3 %	87 %	11 %
0:56	86 %	6 %	85 %	2 %	87 %	3 %	88 %	11 %
1:01	87 %	6 %	87 %	2 %	88 %	3 %	90 %	11 %
1:06	88 %	7 %	89 %	3 %	89 %	3 %	90 %	11 %

Conclusión: El tratamiento con GOSD permite que las esporas de *Bacillus licheniformis* germinen más rápidamente y superen los efectos de estrés de distintos niveles de sales biliares que pueden encontrarse en el tracto gastrointestinal.

5 Ejemplo 10: Crecimiento promedio de tres réplicas de *Bacillus licheniformis* con o sin GOSD en medio definido de fosfato de potasio y glucosa al 2 %

Las esporas de *Bacillus licheniformis* cepa ENV 431 GO+ se trataron con GOSD (procedimiento descrito anteriormente). Como control se utilizaron esporas GO- del mismo cultivo que se secaron por atomización sin utilizar GOSD. El ensayo de crecimiento se realizó en un medio mínimo de sales suplementado con glucosa al 2 %.

#### Medio

10 El medio se preparó disolviendo (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,26 g/l), MgCl<sub>2</sub> (0,81 g/l), CaCl<sub>2</sub> (0,15 g/l), NaCl (0,05 g/l) en agua destilada y añadiendo 1ml/l 1000× mezcla de oligoelementos (MnSO<sub>4</sub> (0,85 g/50 ml), ZnSO<sub>4</sub> (0,15 g/50 ml), FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O (0,15 g/50 ml), tiaminoclorhidrato (0,05 g/50 ml). La solución preparada se vertió en matraces (90 ml/matraz) y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 40 minutos. Antes de la inoculación, el medio se suplementó con 4 ml de solución esterilizada por filtración de 25× fosfato de potasio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3,44 g/50 ml), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,81 g/50 ml)) y 2 ml de 50×(100 g/200 ml) glucosa hasta una concentración final del 2 %.

#### Crecimiento de células de *Bacillus licheniformis*

20 La cantidad de esporas utilizadas para la inoculación se determinó mediante recuentos de polvo de esporas GO- y GO+. Se prepararon suspensiones concentradas (1000×) de esporas de *Bacillus licheniformis* cepa ENV 431 mezclando las esporas en los vasos de batidora estériles con agua estéril y se añadieron a los matraces con medio a las concentraciones indicadas en la tabla siguiente a las 0 h. Los recuentos del cultivo inicial se obtuvieron realizando

diluciones y recuentos en placa de las suspensiones de esporas mezcladas. Se prepararon 3 matraces para cada muestra de esporas.

Los matraces se incubaron a 30 °C, 150 rpm y se cultivaron durante 48 h. Se tomaron las muestras y se realizaron recuentos en placa a las 24 h y a las 48 h.

5

Tabla 10. Crecimiento promedio de tres réplicas de *Bacillus licheniformis* con GOSD (GO+) o sin GOSD (GO-) en medio mínimo de fosfato de potasio y glucosa al 2 %. Los datos se expresan en ufc/ml.

	0 hora	24 horas	48 horas
<b><i>B. licheniformis</i> GO-</b>	1,88 × 10 <sup>3</sup>	2,20 × 10 <sup>4</sup>	9,4 × 10 <sup>4</sup>
<b><i>B. licheniformis</i> GO+</b>	1,46 × 10 <sup>3</sup>	7,95 × 10 <sup>4</sup>	3,65 × 10 <sup>5</sup>
Conclusión: El tratamiento con GOSD mejoró significativamente la germinación y el índice de crecimiento de <i>Bacillus licheniformis</i> .			

10 Ejemplo 11: Crecimiento de *Bacillus licheniformis* durante un periodo de dos días; comparación de tratamientos con o sin GOSD en presencia de diferentes concentraciones de NaCl

*Medio:*

15 El mTSB se preparó como se indicó anteriormente, pero se añadió cloruro de sodio (Amresco X190) para inducir el estrés osmótico cuando fue apropiado, de tal manera que las concentraciones finales fueron de 0, 0,5, 1,0 o 1,5 M (0 g/l, 29,22 g/l, 58,44 g/l o 87,66 g/l, respectivamente). El medio se calentó, se introdujeron partes alícuotas en matraces y se esterilizó en autoclave.

El agar para recuento en placa ("Plate Count Agar", PCA) (BD 247910) se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante: Se suspenden 23,5 g de polvo en 1 l de agua, se lleva a ebullición con agitación frecuente, se introducen partes alícuotas en frascos de vidrio y se esteriliza en autoclave. Los frascos de medios se enfriaron en un baño de agua a 45 °C hasta que se necesitaron. El fabricante del polvo informa del siguiente contenido de PCA por litro:

- 20 Digestión pancreática de la caseína: 5,0 g
- Extracto de levadura: 2,5 g
- Dextrosa: 1,0 g
- Agar: 15,0 g

*Suspensiones de esporas:*

25 Las esporas en polvo de *Bacillus licheniformis* cepa ENV100 tratadas o no tratadas con GOSD se suspendieron en agua estéril con Octosol SLS al 0,1 % (FT-SLS-246DRUM, Tiarco Chemical, Dalton, GA) dentro de un vaso de batidora estéril. Las esporas se suspendieron mezclándolas durante intervalos de 5 segundos durante un total de al menos 15 segundos o hasta que las esporas estuvieran completamente suspendidas, comprobándose de modo visual, seguido de diluciones en serie en agua estéril. Esto se realizó de forma que la concentración final en los matraces de cultivo fuera de 1 × 10<sup>2</sup> ufc/ml.

*Cuantificación:*

35 Los matraces se incubaron a 37 °C agitando a 150 rpm durante 28 horas ("1 día") o 50 horas ("2 días"). Se diluyeron en serie partes alícuotas de cada matraz en placas Petri con PCA enfriado hasta <45 °C vertido en la parte superior, se agitaron y se dejaron solidificar. Se invirtieron las placas y se incubaron durante aproximadamente 24 horas a 37 °C. Se contaron las colonias y se calcularon las concentraciones a partir de las diluciones. También se filtraron aproximadamente 10 µl de muestras de cada matraz en placas PCA para comprobar su pureza.

Tabla 11. Crecimiento de *Bacillus licheniformis* tratado con GOSD (GO+) cuando se ve sometido al estrés osmótico de la solución salina.

Día	GO + o -	Molar	ufc/ml
1	GO +	0	1,05E+06
1	GO-	0	7,33E+03
1	GO +	0,5	3,60E+06
1	GO-	0,5	5,00E+06
1	GO +	1,0	3,00E+05
1	GO-	1,0	2,31E+05
1	GO +	1,5	1,22E+04
1	GO-	1,5	1,50E+02
2	GO +	0	8,17E+06
2	GO-	0	4,90E+05
2	GO +	0,5	7,03E+06
2	GO-	0,5	8,43E+06
2	GO +	1,0	2,07E+06
2	GO-	1,0	3,50E+06
2	GO +	1,5	4,33E+05
2	GO-	1,5	1,53E+02
Conclusión: El tratamiento con GOSD mejoró significativamente la germinación y el crecimiento de <i>Bacillus licheniformis</i> bajo estrés osmótico salino.			

Ejemplo 12: Actividad proteasa de la cepa ENV 923 de *Bacillus subtilis*

- 5 Para el ensayo de actividad proteasa se utilizaron esporas de *Bacillus subtilis* cepa ENV 923 tratadas con GOSD (GO+) como se ha descrito anteriormente, y no tratadas (GO-).

*Medio*

- 10 Se utilizó un medio salino químicamente definido ("Chemically Defined Salt Medium", CDSM) para la propagación celular en un ensayo de proteasa. El medio se preparó disolviendo los componentes de la solución base (g/l): (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, 1,26 g; ácido L-glutámico, 1,18 g; MgCl<sub>2</sub>, 0,81; CaCl<sub>2</sub>, 0,155 y ácido L-láctico al 85 % (0,530 ml/l) en agua destilada y añadiendo 1 ml/l de 1000× mezcla de oligoelementos (g/50 ml). Los matraces con la solución base (48 ml/matraz) se esterilizaron en autoclave durante 40 minutos. Antes de la inoculación se prepararon por separado 2 ml de solución tampón 25× esterilizada por filtro con glucosa (g/50 ml). Se añadieron MOPS, 11,6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,6; glucosa, 4,5.

- 15 Crecimiento de células de *Bacillus subtilis* ENV923

La cantidad de esporas utilizadas para la inoculación se determinó mediante recuentos de polvo de esporas GO- y GO+. Se prepararon suspensiones concentradas (1000×) de esporas de la cepa ENV923 de *Bacillus*

*subtilis* mezclando las esporas en los vasos de batidora estériles con tampón fosfato de potasio 0,01 M estéril, pH 7,0 y se añadieron a los matraces a una concentración de aproximadamente  $1 \times 10^4$  ufc/ml. Los recuentos del cultivo inicial se confirmaron realizando diluciones y recuentos en placa de las suspensiones de esporas mezcladas. Se prepararon 3 matraces para cada muestra de esporas.

5 Los matraces se incubaron a 30 °C, 150 rpm, y se tomaron muestras a las 48 h.

*Ensayo de actividad proteasa*

10 El ensayo de actividad proteasa se llevó a cabo en sobrenadantes celulares utilizando caseína como sustrato y el reactivo de fenol de Folin y Ciocalteu que reacciona con la tirosina y facilita el desarrollo del color azul. La unidad de actividad proteasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1 µg de tirosina en un minuto. La cantidad de tirosina en los tubos de ensayo se determinó midiendo la DO<sub>650</sub> en un espectrofotómetro Jenway 7305 y calculando la tirosina liberada mediante una curva patrón.

*Reactivos*

Reactivo 1: Tampón fosfato de potasio 0,05 M, pH 7,0

15 Se diluyó tampón fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,0 (preparado como se describe en el ejemplo 1) en la proporción 1:1 con agua destilada para obtener tampón fosfato de potasio 0,05 M, pH 7,0

Reactivo 2: Solución de caseína al 0,65 %

Se disolvieron 0,65 g de caseína en 80 ml de tampón fosfato de potasio 0,05 M, pH 7,0, se calentaron para disolver la caseína y el volumen final se llevó a 100 ml con tampón fosfato de potasio 0,05 M, pH 7,0.

Reactivo 3: Ácido tricloroacético (TCA) al 15 %

20 Se disolvieron 15 g de TCA en agua destilada y se llevó el volumen final a 100 ml.

Reactivo 4: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20 %

Se disolvieron 20 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en agua destilada y se llevó el volumen final a 100 ml.

*Ensayo de proteasa*

- 25 • Se centrifugaron 10 ml de cultivo y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,2 µm hacia tubos estériles.
- Se mezclaron 3 ml de sobrenadante filtrado con 3 ml de solución de caseína al 0,65 % y se introdujeron en un baño de agua a 37 °C durante 1 h.
- La reacción se detuvo añadiendo 6 ml de TCA al 15 % y las muestras se centrifugaron durante 5 min.
- 30 • Se mezclaron 0,5 ml de cada muestra con 1 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20 %, seguido de la adición de 0,5 ml de reactivo de fenol de Folin y Ciocalteu y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente para que se desarrollase el color azul.
- Se añadieron 3 ml de agua destilada a cada muestra y, después de mezclar, se midió la DO<sub>650</sub>.
- 35 • Para calcular la actividad proteasa se preparó la curva patrón para la tirosina obteniendo diluciones en series de tirosina disuelta en agua destilada, tratándolas en las mismas condiciones que las muestras de cultivo y midiendo la DO<sub>650</sub>.

Tabla 12. Producción de proteasas de *Bacillus subtilis* tratado con GOSD (GO+) frente al control (GO-)

<i>Bacillus subtilis</i>		Unidades de actividad proteasa
54 h	GO +	71,5
	GO -	40
Conclusión: El tratamiento de las esporas de <i>Bacillus subtilis</i> con GOSD permite una mayor producción de enzimas, tales como la proteasa.		

Ejemplo 13: Germinación de *Streptomyces viridochromogenes* en presencia de compuestos germinativos

5 Las esporas de *Streptomyces viridochromogenes* se recogieron de las placas vertiendo 10 ml de tampón TX (tampón Tris-HCl 0,05 M, pH 7,3 con Tween 80 al 0,001 %) y retirando las esporas con un bastoncillo de algodón estéril. Las suspensiones de esporas de las placas se vertieron en tubos estériles de 50 ml. Una vez obtenidas las suspensiones de esporas en un bloque térmico, se realizó el choque térmico colocando los tubos con las suspensiones de esporas en un bloque térmico, dejando que la temperatura alcanzara 55 °C y manteniendo la temperatura a 55 °C durante 10 min. Después del choque térmico, las suspensiones de esporas se enfriaron en agua helada durante 5 minutos y se centrifugaron durante 30 minutos. El sobrenadante se vertió, las esporas se volvieron a suspender en 25 ml de tampón fosfato de potasio 0,02 M, pH 7,0 a 4 °C y se centrifugaron durante 15 minutos. Tras verter el sobrenadante, las esporas se volvieron a suspender en 20 ml de tampón fosfato de potasio 0,02 M, pH 7,0 y se mezclaron enérgicamente para obtener la suspensión de esporas que se utilizó en el experimento.

15 Las muestras se prepararon mezclando 1,5 ml de 2× mezcla germinante con 1,5 ml de suspensión de esporas. Todas las mezclas de germinantes se prepararon en agua destilada como soluciones de 2 × 50 ml. Se preparó cloruro de calcio como 100× solución (0,4 g/10 ml) y se añadieron 20 µl a 10 ml de 2× mezclas germinantes. Las concentraciones finales de los compuestos germinativos fueron las siguientes: 0,89 mg/ml de L-alanina; 1,17 mg/ml de L-valina, 13,2 mg/ml de L-asparagina; 2,25 mg/ml de glucosa; y 2,25 mg/ml de fructosa. Tras medir la DO600 inicial, las muestras se transfirieron a un baño de agua a 30 °C y se midió la DO600 a intervalos de 15 min durante 90 min para determinar los índices de germinación.

Tabla 13. ENV 151 (*Streptomyces viridochromogenes*), porcentaje de reducción de la densidad óptica

Tratamiento ion/germinante	0	15	30	45	60	75	90
KPO4 0,01 M	0	1,0 %	2,0 %	5,4 %	6,2 %	4,9 %	5,4 %
KPO4 0,01 M, CaCl <sub>2</sub>	0	7,3 %	3,4 %	6,1 %	6,1 %	8,0 %	9,3 %
KPO4 0,01 M, CaCl <sub>2</sub> , L-Ala	0	1,8 %	5,2 %	12,2 %	11,9 %	14,2 %	17,6 %
KPO4 0,01 M, CaCl <sub>2</sub> , L-Val	0	2,0 %	4,9 %	11,2 %	7,8 %	14,4 %	18,0 %
KPO4 0,01 M, CaCl <sub>2</sub> , L-Asn	0	2,0 %	6,1 %	8,8 %	11,7 %	8,0 %	9,0 %
KPO4 0,01 M, CaCl <sub>2</sub> , L-Ala, L-Asn	0	7,7 %	12,1 %	14,4 %	19,8 %	20,4 %	18,6 %
KPO4 0,01 M, CaCl <sub>2</sub> , L-Ala, L-Asn, glucosa	0	8,2 %	11,7 %	14,5 %	20,1 %	19,4 %	20,7 %
KPO4 0,01 M, CaCl <sub>2</sub> , glucosa	0	7,0 %	8,8 %	7,0 %	10,5 %	12,6 %	13,2 %
KPO4 0,01 M, CaCl <sub>2</sub> , glucosa, fructosa	0	5,9 %	8,3 %	12,0 %	12,7 %	14,6 %	14,6 %
KPO4 0,01 M, CaCl <sub>2</sub> , L-Ala, L-Asn, glucosa, fructosa	0	11,7 %	14,0 %	17,7 %	20,4 %	22,2 %	22,4 %
Conclusión: El tratamiento de las esporas de <i>Streptomyces viridochromogenes</i> con compuestos germinativos mejora la germinación.							

20 Ejemplo 14: Comparación de los índices de germinación entre mezclas íntimas y mezclas convencionales de esporas bacterianas y compuestos germinativos

Para comparar el índice de germinación de las esporas de las mezclas íntimas con la de las esporas mezcladas de modo convencional con un germinante, se realizan los siguientes tratamientos:

25 A. Formación de una mezcla íntima: Esporas de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. popilliae*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces lydicus*, *Streptomyces plicatus*, *Streptomyces sindeneusis*, *Streptomyces rochei*, *Streptomyces alni*, *Streptomyces viridis*, *Streptomyces thermovulgaris*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces acidiscabies*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces galbus*, *Streptomyces microflavus* y *Streptomyces aureofaciens* se secan con L-alanina, L-valina, L-prolina, L-leucina,

30

L-cisteína, L-treonina, L-glutamina, L-asparagina o L-fenilalanina que se introducen en la masa de esporas inmediatamente antes del secado como una solución que contiene 0,044 gramos del aminoácido por mililitro de agua destilada. La mezcla íntima producida se germina mediante su posterior introducción en una solución consistente en tampón fosfato 0,01 M en agua destilada con pH 7 resultante.

- 5 **B. Mezcla convencional de esporas con un germinante:** Esporas de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycooides*, *B. popilliae*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces lydicus*,  
10 *Streptomyces plicatus*, *Streptomyces sindeneusis*, *Streptomyces rochei*, *Streptomyces alni*, *Streptomyces viridis*, *Streptomyces thermovulgaris*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces acidiscabies*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces galbus*, *Streptomyces microflavus* y *Streptomyces aureofaciens* se hidratan y se secan. Estas esporas se hacen germinar mediante la introducción en una solución que consiste en tampón fosfato 0,01 M en agua destilada con pH 7 resultante, y 0,0001 gramos de L-alanina, L-valina, L-prolina, L-leucina, L-cisteína, L-treonina, L-glutamina, L-asparagina o L-fenilalanina por mililitro de solución.
- 15 **C. Germinación de esporas solas:** Esporas de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycooides*, *B. popilliae*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces lydicus*, *Streptomyces plicatus*, *Streptomyces sindeneusis*, *Streptomyces rochei*, *Streptomyces alni*, *Streptomyces viridis*, *Streptomyces thermovulgaris*,  
20 *Streptomyces griseus*, *Streptomyces acidiscabies*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces galbus*, *Streptomyces microflavus* y *Streptomyces aureofaciens* se hidratan y se secan. Posteriormente, las esporas se introducen en una solución consistente en tampón fosfato 0,01 M en agua destilada con pH 7 resultante.

25 La germinación de las esporas resultantes de cada uno de estos tratamientos se mide por la disminución porcentual de la densidad óptica o contando el número de esporas germinadas al microscopio. Se observa que las composiciones íntimamente mezcladas germinan más rápidamente que su correspondiente equivalente mezclado de modo convencional.

Ejemplo 15: Tratamiento de hojas de maíz, raíz de zanahoria y tubérculos de patata con mezclas de compuestos germinativos de esporas de *Bacillus licheniformis*

30 Para preparar las mezclas de compuestos germinativos de esporas de *Bacillus licheniformis*, se introdujo una solución de 0,044 g de L-alanina por ml de agua destilada en una masa de esporas de *Bacillus licheniformis*, y la mezcla se secó inmediatamente por pulverización. El polvo secado por pulverización resultante que contiene la mezcla íntima de esporas de *Bacillus* y L-alanina se denomina "GO+" en los tratamientos siguientes. Las esporas de *Bacillus* también se secaron por pulverización sin añadir L-alanina para utilizarlas como control. Las esporas de *Bacillus* secadas por pulverización sin adición de L-alanina se describen como "GO-" en los tratamientos siguientes.

35 Antes de resuspender las esporas de *Bacillus licheniformis* secadas por pulverización, se determinó el recuento bacteriano de las formulaciones GO+ y GO- para ajustar las diferencias en la concentración de esporas como se muestra en la tabla 14 a continuación.

Tabla 14. Recuentos bacterianos de esporas de *B. licheniformis* en formulaciones de GO+ y GO- secadas por pulverización

Polvo de esporas	Recuento bacteriano	Cantidad utilizada por 1 ml de suspensión
GO+: Mezcla secada por pulverización de <i>B. licheniformis</i> con L-alanina	$6,9 \times 10^{11}$ ufc/g	0,018 gramos
GO-: <i>B. licheniformis</i> secado por pulverización, sin L-alanina	$6,9 \times 10^{12}$ ufc/g	0,009 gramos

40 Las esporas secadas por pulverización se suspendieron en tampón fosfato de potasio 0,01 M a pH 7,0 que se había enfriado a 4 °C antes de añadir las esporas. Tal como se muestra en la tabla 14, las formulaciones secadas por pulverización GO+ y GO- se añadieron al tampón a una concentración de 0,018 g/ml y 0,009 g/ml, respectivamente, para ajustar las diferencias en la concentración de esporas en cada formulación.

45 Se obtuvieron hojas de maíz (*Zea mays*) de plantas que crecían en el campo. Cada hoja se cortó en secciones de aproximadamente 2,5 cm. Se cortaron en secciones raíces de zanahoria (*Daucus carota*) y tubérculos de patata (*Solanum tuberosum*) dejando la piel exterior. Las muestras de plantas se colocaron sobre papel de filtro húmedo en una placa Petri, con una muestra de planta por placa Petri. Se añadieron aproximadamente 150 µl de suspensión de

5 esporas a cada muestra vegetal. Para las muestras de zanahoria y patata, la suspensión de esporas se aplicó sobre la superficie de la piel, es decir, la superficie exterior de la raíz o el tubérculo. Las placas Petri que contenían las muestras vegetales se taparon y se incubaron a 37 °C. Las muestras para el recuento celular de 0 min se tomaron de los tubos de la suspensión de esporas. Posteriormente se tomaron muestras de las secciones de hoja tratadas en cada punto temporal (15 min, 30 min y 60 min) y se observaron al microscopio de contraste de fases. Se obtuvo el número de esporas de fase brillante y de fase oscura tomando fotografías de algunos campos de observación y contando las células oscuras y brillantes. El nivel de germinación de las esporas se determinó en función del número de esporas de fase brillante (no están en germinación) y de fase oscura (están en germinación) en el microscopio de contraste de fases.

10 Tal como se muestra en la siguiente tabla 15, el porcentaje de esporas en germinación en las hojas de maíz tratadas con formulaciones que contienen L-alanina (GO+) fue mucho mayor que con las formulaciones sin L-alanina (GO-). Por ejemplo, el 94 % de las esporas GO+ germinaron en 30 min, mientras que menos del 20 % de las esporas GO- habían germinado incluso después de 60 min. Se observaron resultados similares en las raíces de zanahoria (tabla 16) y en los tubérculos de patata (tabla 17). Estos resultados indican que la adición de L-alanina a las formulaciones secadas por pulverización dio lugar a una germinación más rápida de las esporas en las superficies de las plantas.

Tabla 15. Germinación de *B. licheniformis* con L-alanina (GO+) o sin L-alanina (GO-) en hojas de maíz. "Rep" es réplica, "Prom." es promedio.

Tiempo (min)	GO-						GO+					
	Células brillantes		Células oscuras		Número total de células	% de células de fase oscura	Células brillantes		Células oscuras		Número total de células	% de células de fase oscura
	Rep	Prom.	Rep	Prom.			Rep	Prom.	Rep	Prom.		
0	171	185,7	9	13,3	199,0	7,18	197	231,33	24	27,67	259	10,68
	171		13				243		13			
	215		18				254		46			
15	318	309,5	25	41,6	351,1	11,85	42	39	218	185,4	224,4	82,62
	284		31				46		204			
	459		53				30		133			
	495		58				41		221			
	301		41				36		151			
30	385	462	41	43,6	505,6	8,62	14	18,33	352	297,67	316	94,20
	388		42				12		315			
	488		44				23		268			
	488		39				14		219			
	561		52				16		280			
									31			
60	243	320	56	66,5	386,5	17,21	10	10,2	259	317,2	327,4	96,88
	232		56				11		316			

Tiempo (min)	GO-						GO+						
	Células brillantes		Células oscuras		Número total de células	% de células de fase oscura	Células brillantes		Células oscuras		Número total de células	% de células de fase oscura	
	Rep	Prom.	Rep	Prom.			Rep	Prom.	Rep	Prom.			
	380		64					12		319			
	425		90					10		339			
									8		353		

Tabla 16. Germinación de *B. licheniformis* con L-alanina (GO+) o sin L-alanina (GO-) en raíces de zanahoria. "Rep" es réplica, "Prom." es promedio.

Tiempo (min)	GO-						GO+					
	Esporas brillantes		Esporas oscuras		Número total de esporas	% de esporas de fase oscura	Esporas brillantes		Esporas oscuras		Número total de esporas	% de esporas de fase oscura
	Rep	Prom.	Rep	Prom.			Rep	Prom.	Rep	Prom.		
<b>0</b>	183	217	18	33,8	250,8	<b>13,48</b>	217	221,2	28	28,8	250	<b>11,52</b>
	131		34				118		28			
	233		22				299		40			
	252		40				167		21			
	286		55				305		27			
<b>15</b>	318	260,33	61	48,17	308,5	<b>15,61</b>	176	203,83	115	179,5	383,3	<b>46,83</b>
	482		69				150		122			
	226		40				254		158			
	158		37				300		241			
	167		34				204		210			
		211	48				139		231			
<b>30</b>	212	227,25	61	65,5	292,75	<b>22,37</b>	127	118,83	398	405,67	524,5	<b>77,34</b>
	220		40				129		417			
	295		90				141		409			
	182		71				95		384			
									133			

Tiempo (min)	GO-						GO+					
	Esporas brillantes		Esporas oscuras		Número total de esporas	% de esporas de fase oscura	Esporas brillantes		Esporas oscuras		Número total de esporas	% de esporas de fase oscura
	Rep	Prom.	Rep	Prom.			Rep	Prom.	Rep	Prom.		
							88		398			
<b>60</b>	287	250,5	83	75,5	326	<b>23,16</b>	80	75,33	603	621,83	697,2	<b>89,20</b>
	285		103				91		859			
	198		57				61		464			
	201		60				89		885			
	319		86				69		472			
	213		64				62		448			

Tabla 17. Germinación de *B. licheniformis* con L-alanina (GO+) o sin L-alanina (GO-) en tubérculos de patata. "Rep" es réplica, "Prom." es promedio.

Tiempo (min)	GO-						GO+					
	Células brillantes		Células oscuras		Número total de células	% de fase oscura	Células brillantes		Células oscuras		Número total de células	% de fase oscura
	Rep	Prom.	Rep	Prom.			Rep	Prom.	Rep	Prom.		
<b>0</b>	414	397,5	12	14,5	412	<b>3,65</b>	504	608	19	20	628	<b>3,29</b>
	381		17				712		21			
<b>15</b>	399	565,5	69	67	633	<b>10,59</b>	432	541,33	163	214,33	755,7	<b>28,36</b>
	481		88				737		262			
	738		56				731		263			
	696		60				558		234			
	647		71				449		201			
	432		58				341		163			
<b>30</b>	500	555,33	84	95,67	651	<b>14,70</b>	247	203,5	390	392,5	596	<b>65,86</b>
	496		126				222		458			
	747		121				250		381			
	554		78				119		386			
	479		78				218		364			

Tiempo (min)	GO-						GO+					
	Células brillantes		Células oscuras		Número total de células	% de fase de oscura	Células brillantes		Células oscuras		Número total de células	% de fase de oscura
	Rep	Prom.	Rep	Prom.			Rep	Prom.	Rep	Prom.		
	556		87					165		376		
60	452	304,67	70	71,67	316	22,65	44	31,33	245	271,5	302,8	89,65
	293		80				16		225			
	304		75				37		275			
	270		68				27		271			
	261		72				38		284			
	248		65				26		329			

Ejemplo 16: Evaluación de la germinación, el crecimiento de la planta y el rendimiento de semillas de maíz recubiertas con una composición que comprende una espora bacteriana y un compuesto germinativo

5 Las semillas de maíz se recubren con composiciones que comprenden diversas combinaciones de las esporas bacterianas y los compuestos germinativos enumerados en el ejemplo 14. El recubrimiento de las semillas se realiza por medios convencionales, tales como los descritos en la patente de EE. UU. n.º 7 989 391 y la patente de EE. UU. n.º 5 849 320. Se evalúan los siguientes tratamientos:

- A. Semilla recubierta con una mezcla íntima de las esporas bacterianas y el compuesto germinativo
- B. Semilla recubierta con una mezcla convencional de las esporas bacterianas y el compuesto germinativo
- 10 C. Semilla recubierta solo con las esporas bacterianas
- D. Semilla no recubierta

15 Los índices de germinación de las semillas se miden en ensayos de invernadero y de campo midiendo la emergencia de las plántulas cada día, comenzando el primer día en que emergen las plantas y continuando durante tres semanas después de la primera fecha de emergencia. El rendimiento se mide cosechando las mazorcas maduras y secándolas durante tres días en una estufa a 37 °C. A continuación, se desgranar las mazorcas y se recogen las semillas para contarlas. El peso total de las semillas también se mide pesando las semillas recolectadas de cada planta.

Ejemplo 17: Efecto de un probiótico de *Bacillus* en pollos infectados por *Eimeria maxima* y *Clostridium perfringens*

20 Se realizó un ensayo en batería de 28 días en pollos Cobb 500 (*Gallus gallus domesticus*) para determinar el efecto de suplementar el pienso con agentes probióticos de *Bacillus* o un tratamiento antibiótico convencional (bacitracina) en pollos infectados por *Eimeria maxima* (un agente causante de coccidiosis en aves de corral) y *Clostridium perfringens* (un agente causante de enteritis necrótica). El probiótico de *Bacillus* contenía proporciones iguales de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus pumilus*. Se preparó un probiótico de *Bacillus* GO+ mediante secado por pulverización de esporas de la especie *Bacillus* con L-alanina. La L-alanina se introdujo en la masa de esporas inmediatamente antes del secado por pulverización como una solución que contenía 0,044 gramos de alanina por mililitro de agua destilada, tal como se ha descrito anteriormente. Se formó un probiótico de *Bacillus* GO- mediante secado por pulverización de esporas de la especie *Bacillus* sin adición de L-alanina, como se ha descrito anteriormente. El estudio incluyó ocho jaulas replicadas para cada grupo de tratamiento con ocho polluelos por jaula (64 aves por grupo de tratamiento). Se evaluaron los siguientes grupos de tratamiento. Los grupos de tratamiento 2 a 5 fueron infectados con *Eimeria maxima* y *Clostridium perfringens* (infectados). El grupo de tratamiento 1 no se infectó con *Eimeria maxima* ni con *Clostridium perfringens* para servir de control negativo no infectado.

- 1) Sin aditivo en el pienso, sin infección (control negativo no infectado)
- 2) Sin aditivo en el pienso, infectado (control negativo infectado)

- 3) Probiótico de *Bacillus* GO-,  $2 \times 10^6$  ufc/g de pienso, infectado
- 4) Probiótico de *Bacillus* GO+,  $2 \times 10^6$  ufc/g de alimento, infectado
- 5) Antibiótico bacitracina, 50 g/tonelada de pienso, infectado (control positivo)

5 Los pollos fueron alimentados con el pienso tratado o sin tratar a partir del día 0. El día 14, las aves de los grupos de tratamiento 2 a 5 fueron estresadas con una infección de *Eimeria maxima*, seguida de una infección de *Clostridium perfringens*, agente causante de la enteritis necrótica. El día 28 se evaluó el índice de transformación de alimentos, el aumento de peso, la puntuación de las lesiones y el porcentaje de mortalidad de las aves. El índice de transformación de alimentos se calculó como la proporción entre los kg de alimento necesarios para producir un kg de peso corporal desde el día 0 hasta el día 28. Por ejemplo, un índice de transformación de alimentos de 1,6 significa que se necesitaron 1,6 kg de alimento para producir 1 kg de peso corporal. El aumento de peso se midió como el incremento del peso corporal desde el día 0 hasta el día 28. La puntuación de las lesiones se basó en la observación visual de las mismas, siendo 0 normal y 3 la más grave. Tanto los probióticos de *Bacillus* GO- como GO+ redujeron el porcentaje de mortalidad con respecto al control negativo infectado (grupo de tratamiento 2). Véase la tabla 18. El porcentaje de mortalidad fue menor en los polluelos tratados con el tratamiento de probiótico GO+ que en los tratados con bacitracina, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. Tanto los grupos de tratamiento con probióticos GO+ como con antibióticos mostraron un aumento significativo de la ganancia de peso con respecto al control negativo infectado. Estos resultados indican que el tratamiento de los piensos para pollos con probióticos GO+ consiguió los mismos o mejores resultados que el tratamiento antibiótico convencional durante la exposición a patógenos.

20 Tabla 18. Índice de transformación de alimentos, aumento de peso, puntuación de las lesiones y porcentaje de mortalidad en pollos infectados por *Eimeria maxima* y *Clostridium perfringens* (grupos de tratamiento 2 a 5) o en el control negativo no infectado (grupo de tratamiento 1). Los grupos de tratamiento se describieron anteriormente. Las letras que siguen a los valores representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento.

	Índice de transformación de alimentos	Aumento de peso (kg)	Puntuación de la lesión (de 0 a 3)	Mortalidad (%)
Grupo de tratamiento	Día 0 a 28	Día 0 a 28		
1	1,600bc	0,805a	0,0c	0,0b
2	1,913a	0,696c	0,8a	14,1a
3	1,707b	0,726bc	0,2c	3,1b
4	1,691bc	0,755ab	0,5b	1,6b
5	1,585c	0,811a	0,5b	3,1b

Ejemplo 18: Efecto de los probióticos en almejas infectadas con especies de *Vibrio*

25 Se evaluó la causa de la muerte de larvas en un criadero de bivalvos de Florida aislando y cuantificando la carga bacteriana del criadero. Se determinó que las especies de *Vibrio* representaban el 100 % de los recuentos aerobios ( $4 \times 10^4$  ufc/ml) descubiertos en la fuente de agua, y aproximadamente el 50 % de los recuentos aerobios ( $2 \times 10^4$  ufc/ml) en el criadero. De esta gran población de *Vibrio*, se descubrieron dos morfologías de colonias dominantes en diferentes medios y se enviaron para su identificación. Las dos cepas dominantes de *Vibrio* observadas fueron *Vibrio chagasii* y *Vibrio coralliilyticus*, esta última virulenta contra los bivalvos.

30 La medición de las zonas de exclusión para cepas individuales de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* sobre el crecimiento de *Vibrio* y la restricción de la formación de biopelículas indicó que estas cepas de *Bacillus* tenían una actividad de moderada a buena contra la mayoría de las cepas de *Vibrio* ensayadas. Estos resultados indican que las cepas de *Bacillus* superaron a las cepas de especies de *Vibrio* aisladas del criadero en la formación de biopelículas y tuvieron un efecto directo contra las biopelículas de *Vibrio*.

40 Los tanques de larvas de almeja infectados por las cepas de *Vibrio* fueron tratados con una mezcla de 4 cepas de probióticos que contenía proporciones iguales de dos cepas de *Bacillus licheniformis*, una cepa de *Bacillus subtilis* y una cepa de *Bacillus pumilus*. Las cepas de *Bacillus* se formularon mediante secado por pulverización como GO+ (con L-alanina) o GO- (sin L-alanina), tal como se ha descrito anteriormente. Los probióticos se añadieron a los tanques suspendiendo la formulación secada por pulverización en 1 litro de agua y añadiendo la suspensión inmediatamente

al tanque después de los cambios diarios de agua en una dosis de  $5 \times 10^5$  ufc/ml. Las larvas de almeja se tamizaron con filtros de malla de diferentes tamaños (150, 200, 250 o 300  $\mu\text{m}$ ) al principio del periodo de tratamiento y 12 días después de iniciarse el tratamiento diario. El día 12 se registró el número de larvas de almeja vivas encontradas en cada tamaño de tamiz en relación con el número inicial de larvas. Véase la tabla 19. Durante la mortandad de las almejas, el tanque no tratado solo obtuvo un índice de supervivencia del -10 %, mientras que el tanque tratado con GO obtuvo una supervivencia del -20 % y el tanque tratado con GO+ obtuvo una supervivencia del -40 %. Además, los tratamientos con probióticos aumentaron el índice de crecimiento (más larvas recogidas en tamices más grandes), siendo los tanques tratados con GO+ los que crecieron más rápidamente.

Tabla 19. Porcentaje de supervivencia de larvas de almeja de distintos tamaños tras 12 días de tratamiento con probióticos. Los tanques de larvas de almeja se infectaron con cepas de *Vibrio*.

<b>Tamaño del tamiz</b>					
	<b>150 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>200 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>250 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>300 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>Total</b>
Control	3,75	2	5	0	10,75
Envera GO-	0	10	9,9	1	20,9
Envera GO+	3	6	20	10	39

Ejemplo 19: Determinación de la demanda biológica de oxígeno (DBO) en un sistema cerrado que evalúa formulaciones de *Bacillus licheniformis* en extractos de piensos para pollos con sales biliares

Se midió la demanda bacteriana de oxígeno (DBO) de *Bacillus licheniformis* en extractos de piensos para pollos suplementados con sales biliares para determinar la capacidad de las bacterias de crecer bajo estrés de sales biliares. Se utilizó pienso de pollo como fuente de energía en combinación con sales biliares 4 mM (60 % de taurodesoxicolato, 30 % de glicodesoxicolato, 10 % de desoxicolato).

*Medio: Preparación de extracto de pienso para pollos suplementado con sales biliares*

Se pesaron 42,44 g de pienso para pollos (Chick Starter Grower) en un vaso de precipitados y se trituraron con un molinillo de café. El volumen se llevó a un total de 1 litro con agua tibia del grifo, y las mezclas se mezclaron en una placa de agitación durante 60 minutos. Se dispensaron 100 ml de la solución en matraces agitadores con amortiguación de 250 ml, incluidos 2 "matraces de ensayo preliminares", y se esterilizaron en autoclave.

Solución madre de sales biliares (SMSB):

1. 1,8 g de taurodesoxicolato
2. 0,9 g de glicodesoxicolato
3. 0,3 g de desoxicolato

Cada componente se mezcló por separado en pequeñas cantidades de agua del grifo hasta que se disolvió y luego las soluciones se mezclaron, se llevaron a 30 ml y se esterilizaron por filtración.

Se preparó una solución de HCl 1,0 N y se añadió a los matraces de ensayo preliminares descritos anteriormente para reducir el pH a 2,25. Se registró el volumen de HCl utilizado para reducir el pH.

Transcurridos exactamente 90 minutos, se registró el pH (el pH aumentó durante este tiempo). Se añadieron 1,6 ml de SMSB a cada matraz. Tras 15 minutos, se aumentó el pH a 7,5 utilizando NaOH 1,0 M. Se registró el volumen de NaOH utilizado. Transcurridos 15 minutos, se registró el pH (el pH descendió durante este tiempo). Los resultados se promediaron y las cantidades se utilizaron para tratar los matraces restantes que contenían extracto de pienso de pollo.

*Suspensiones de esporas:*

Se prepararon polvos de esporas de *Bacillus licheniformis* cepa ENV100 preparados como formulaciones GO+ (secado por pulverización con L-alanina como se ha descrito anteriormente) o GO- (secado por pulverización sin L-alanina como se ha descrito anteriormente). Las formulaciones se suspendieron en agua estéril con Octosol SLS al 0,1 % (FT-SLS-246DRUM, Tiarco Chemical, Dalton, GA) dentro de un vaso de batidora estéril. Las esporas se suspendieron mezclándolas durante intervalos de 5 segundos durante un total de al menos 15 segundos o hasta que las esporas estuvieran completamente suspendidas, comprobándose de modo visual, seguido de diluciones en serie

## ES 2 942 990 T3

en agua estéril. Esto se realizó de forma que la concentración final en los frascos de DBO fuera de  $5 \times 10^7$  ufc/ml o  $5 \times 10^3$  ufc/ml.

### Ensayo DBO:

- 5 La demanda biológica de oxígeno (DBO) se midió con instrumentos BODTRAKII (Hach 2952450) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 2 ml del extracto preparado de pienso para pollos que contenía sales biliares descrito anteriormente a 98 ml de agua en frascos DBO, se esterilizaron en autoclave y se dejaron enfriar hasta la temperatura ambiente. Los instrumentos y frascos BODTRAKII se preincubaron a 37 °C antes de la inoculación. Los frascos se inocularon como se ha descrito anteriormente, se cerraron inmediatamente siguiendo las instrucciones del fabricante y se incubaron a 37 °C. Una vez finalizado el ensayo, se descargaron los datos del instrumento y se sembraron en estría aproximadamente 10 µl del cultivo en placas PCA para comprobar su pureza.

10 Tal como se muestra en la tabla 20, la formulación GO+ de esporas de *Bacillus licheniformis* permitió el crecimiento en condiciones de estrés por sales biliares y dio como resultado un aumento del metabolismo (medido por la demanda biológica de oxígeno) frente a un tratamiento de control. Estos datos demuestran que la formulación GO+ mejora el crecimiento de *Bacillus licheniformis* en condiciones de estrés biliar.

- 15 Tabla 20. Medición de la demanda biológica de oxígeno (DBO) expresada como cantidad de oxígeno utilizado (mg/l) en cultivos de *Bacillus licheniformis* conteniendo extracto de pienso de pollo y sales biliares.

	Concentración de <i>Bacillus licheniformis</i>			
	$5 \times 10^7$ ufc/ml		$5 \times 10^3$ ufc/ml	
Días	Registros GO+ 7	Registros GO- 7	Registros GO+ 3	Registros GO- 3
0	0	0	0	0
0,22	1,7	-2,5	-1,8	-1,5
0,5	12	-2	-2,3	-2,1
0,75	17	6,5	-1,4	-1,1
1,03	19	14	-0,7	-0,5
1,56	19	16	5,9	-1
1,75	21	19	13	3
2	20	18	16	11
2,25	20	18	18	16
2,5	21	19	21	19
2,75	22	20	23	21
3	21	20	22	21

## REIVINDICACIONES

- 1.- Una planta o parte de una planta recubierta con una composición que comprende:
- a) una espora bacteriana; y
  - b) un L-aminoácido,
- 5 en la que la composición comprende una mezcla íntima seca de la espora bacteriana y el L-aminoácido, y en la que el L-aminoácido se adsorbe sobre la espora bacteriana o es absorbido por la misma, y el L-aminoácido se selecciona entre L-alanina, L-valina, L-prolina, L-leucina, L-cisteína, L-treonina, L-glutamina, L-asparagina y L-fenilalanina.
- 2.- La planta o parte de la planta de la reivindicación 1, en la que la planta o parte de la planta se selecciona del grupo que consiste en una flor, una semilla, una raíz, un fruto, un tubérculo, un bulbo, un rizoma, un brote, un retoño, una semilla, una hoja, una plántula y un trasplante.
- 10 3.- La planta o parte de la planta de la reivindicación 1 o 2, en la que la planta o parte de la planta es una semilla.
- 4.- La planta o parte de la planta de cualquier reivindicación anterior, en la que la espora bacteriana se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus agri*, *Bacillus aizawai*, *Bacillus albolactis*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus butanolivorans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus endoparasiticus*, *Bacillus endorhythmos*, *Bacillus firmus*, *Bacillus kurstaki*, *Bacillus lacticola*, *Bacillus lactimorbus*, *Bacillus lactis*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus medusa*, *Bacillus metiens*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus natto*, *Bacillus nigrificans*, *Bacillus popillae*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus simplex*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus spp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus unifagellatus*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae* y una especie del género *Streptomyces*.
- 15 5.- La planta o parte de la planta de cualquier reivindicación anterior, en la que la espora bacteriana se selecciona del grupo que consiste en *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* y *B. pumilus*; y el L-aminoácido se selecciona del grupo que consiste en L-alanina, L-valina y L-asparagina.
- 25 6.- La planta o parte de la planta de la reivindicación 3, en la que la composición comprende además un polímero de recubrimiento de semillas.
- 7.- Un procedimiento para potenciar un rasgo relacionado con el rendimiento en una planta o parte de una planta que comprende tratar la planta o parte de la planta con una composición que comprende:
- a) una espora bacteriana; y
  - b) un L-aminoácido,
- 30 en el que la composición comprende una mezcla íntima seca de la espora bacteriana y el L-aminoácido, y en el que el L-aminoácido se adsorbe sobre la espora bacteriana o es absorbido por la misma, y el L-aminoácido se selecciona entre L-alanina, L-valina, L-prolina, L-leucina, L-cisteína, L-treonina, L-glutamina, L-asparagina y L-fenilalanina, y
- 35 en el que el rasgo relacionado con el rendimiento de la planta o parte de la planta se potencia en relación con el rasgo relacionado con el rendimiento de una planta o parte de una planta correspondiente que no está recubierta con dicha composición.
- 8.- El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la planta o parte de la planta se selecciona del grupo que consiste en una flor, una semilla, una raíz, un fruto, un tubérculo, un bulbo, un rizoma, un brote, un retoño, una semilla, una hoja, una plántula y un trasplante.
- 40 9.- Un procedimiento no terapéutico para alimentar a un animal que comprende administrar una composición que comprende una espora bacteriana y un L-aminoácido a un animal, en el que la composición comprende una mezcla íntima seca de la espora bacteriana y el L-aminoácido, y en el que el L-aminoácido se adsorbe sobre la espora bacteriana o es absorbido por la misma, y el L-aminoácido se selecciona entre L-alanina, L-valina, L-prolina, L-leucina, L-cisteína, L-treonina, L-glutamina, L-asparagina y L-fenilalanina.
- 45 10.- Un procedimiento de preparación de ensilado que comprende aplicar al ensilado una composición que comprende una espora bacteriana y un L-aminoácido, en el que la composición comprende una mezcla íntima seca de la espora bacteriana y el L-aminoácido, y en el que el L-aminoácido se adsorbe sobre la espora bacteriana o es absorbido por la misma, y el L-aminoácido se selecciona entre L-alanina, L-valina, L-prolina, L-leucina, L-cisteína, L-treonina, L-glutamina, L-asparagina y L-fenilalanina.
- 50 11.- La planta o parte de la planta de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en los que la composición se presenta en forma de polvo seco.