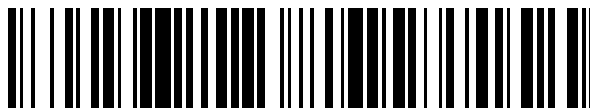


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 040**

21 Número de solicitud: 201000425

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A01P 5/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

31.03.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

04.04.2012

Fecha de la concesión:

06.02.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

18.02.2013

73 Titular/es:

PROBELTE, S.A
CTRA. DE MADRID KM 389,6
30100 ESPINARDO (Murcia) ES

72 Inventor/es:

FERNÁNDEZ MARTÍNEZ, Ana Isabel;
VILLAVERDE FERNÁNDEZ, Mario Jorge;
CASANOVA ROCA, Juan Antonio;
NICOLÁS MARTÍNEZ, José Antonio;
MALO LÓPEZ-ROMÁN, Jorge y
BALLESTA GERMÁN, Ceferino

74 Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

54 Título: **UN PREPARADO BIOLÓGICO BIONEMATICIDA Y ESTIMULADOR DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y CULTIVOS PUROS DE LAS CEPAS DENOMINADAS N₁₁, SR₁₁ Y AL₀₁, CONTENIDAS EN EL MISMO.**

57 Resumen:

Un preparado biológico bionematicida y estimulador del crecimiento vegetal y cultivos puros de las cepas denominadas N₁₁, SR₁₁ y AL₀₁, contenidas en el mismo.

Esta invención se refiere a un nuevo producto nematicida para el control biológico de nematodos fitopatógenos que contiene tres nuevos aislados de *Bacillus thuringiensis* cepa N₁₁, *Bacillus mojavensis* cepa SR₁₁ y *Azospirillum brasilense* cepa AL₀₁, depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con las denominaciones CECT-7665, CECT-7666 y CECT-5856 respectivamente, las cuales poseen una elevada capacidad antagonista frente a este tipo de patógenos, así como la propiedad de estimular el crecimiento vegetal por diferentes mecanismos. La invención también se refiere a los formulados líquido y sólido del producto que poseen una buena estabilidad a temperatura ambiente y que resultan efectivos en el control biológico de nematodos fitopatógenos y para la estimulación del crecimiento de plantas.

ES 2 378 040 B1

DESCRIPCIÓN

Un preparado biológico bionematicida y estimulador del crecimiento vegetal y cultivos puros de las cepas denominadas N₁₁, SR₁₁ y ALo₁, contenidas en el mismo.

5

Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es un preparado biológico, líquido o sólido, que presenta una potente actividad nematocida y que posee además capacidad para la biofertilización y la estimulación del crecimiento vegetal y el enraizamiento, tanto en semilleros, como en viveros, invernaderos y producción vegetal en general. También constituye objeto de esta invención, los nuevos aislados de los microorganismos componentes del preparado, *Bacillus thuringiensis* cepa N₁₁, *Bacillus subtilis* cepa SR₁₁ y *Azospirillum brasilense* cepa ALo₁, así como el procedimiento de producción de los formulados.

15

Estado actual de la técnica

Desde hace años, ha sido reconocida la necesidad e importancia de desarrollar y ampliar los procedimientos de Producción Integrada y de Agricultura Ecológica, como alternativa al uso indiscriminado de productos químicos en la agricultura, para reducir los efectos nocivos de estos últimos. El uso de biopreparados microbianos, tanto para el control biológico de plagas y enfermedades como para la fertilización de cultivos de interés comercial, se presenta como una de las alternativas más prometedoras dentro de este contexto. Además, estos biopreparados desempeñan un importante papel en los modelos de agricultura sostenible debido a la posibilidad de producirse a partir de recursos renovables (Altieri, 1997).

25

Los nematodos parásitos de plantas atacan las raíces o la parte aérea de la mayoría de los cultivos, de modo que es prácticamente imposible mantener una agricultura, económicamente viable, sin algún tipo de control sobre estos organismos. Muchos de ellos desarrollan su ciclo de vida en la zona de las raíces, y se alimentan de éstas, encontrándose en general en asociación con las plantas. Algunos son endoparásitos, es decir que viven y se alimentan en el interior de las raíces, los tubérculos, los brotes, las semillas etc. Otros son ectoparásitos y se alimentan de las paredes de las plantas. Unas pocas especies son sumamente específicas del hospedero, como en el caso de *Heterodera glycinis* en la soja y *Globodera rostochiensis* en la patata, pero en general tienen un amplio rango de hospederos (Guerena, 2006).

35

Entre los nematodos endoparásitos que se alimentan de las raíces, que constituyen plagas de gran importancia económica, se hallan los formadores de nódulos (especies de *Meloidogyne*), los formadores de quistes (especies de *Heterodera*), y los de lesiones radicales (especies de *Pratylenchus*). Mientras que entre los ectoparásitos de mayor importancia económica que se alimentan de las raíces se encuentran especies de los géneros *Paratrichodorus*, *Trichodorus*, *Xiphinema*, *Longidorus*, *Paralongidorus*, *Criconebella*, *Tylenchorhynchus*, *Merlinius*, *Pratylenchus*, *Helicotylenchus*, *Rotylenchus* y *Scutellonema* entre otros (Guerena, 2006).

40

El control de nematodos fitopatógenos es en sentido general una actividad, preventiva. Por tal razón, la mejor vía para abordar este problema es mediante la combinación de diferentes estrategias complementarias entre sí. Bridge (1996), propone cuatro estrategias para el manejo de nematodos fitopatógenos basado en el uso no directo de agroquímicos, métodos culturales y físicos, uso del control biológico y mantenimiento de la biodiversidad de los múltiples cultivos y cultivares que incrementan la resistencia o tolerancia de los nematodos. Este mismo autor reconoce que a pesar de todos los estudios relacionados con este tema, aún no se tienen todas las respuestas en la práctica para el control de nematodos en sistemas agrícolas sustentables.

45

Los nematodos fitopatógenos coexisten en la rizosfera con gran diversidad de microorganismos, muchos de los cuales son antagonistas de estos, ya que ejercen algún tipo de control biológico (Sikora 1992). El control biológico de nematodos abarca una gran diversidad de organismos que viven en el suelo, que incluyen virus, rickettsias, bacterias, hongos nematófagos, protozoos y tardígrados, también depredadores como turbelarios, nematodos, enchitridos, ácaros, collembolos y otros insectos (Kerry, 1995). Dentro de ellos, los hongos y las bacterias muestran las mayores potencialidades como agentes de control biológico (ACB) (Spiegel *et al.*, 2005). Según Mahdy, M., 2002 Entre los hongos encontramos especies tales como *Arthrobotrys*, *Paecilomyces*, y *Verticillium* (o *Lecanicillium*) (JP11246323, DE202005020816, CN1663394 entre muchas otras), mientras que entre las bacterias se destaca *Pasteuria penetrans* (EP0217378, EP1967068), varias cepas de *Bacillus* (EP1922931, EP1967068, US6004774, US5651965, US5378460, US5350577 Sela *et al.* 1998, Giannakou, *et al.* 2004, Guo *et al.* 2008) y *Tsukamurella paurometabolum* con posibilidades de ser empleadas como eficaces bioplaguicidas (EP2154121, Mena, 2002).

55

Un gran número de bacterias han sido utilizadas como agentes de control biológico en diversos cultivos y tienen gran potencial para el control de nematodos. Durante años, el uso de plaguicidas a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) estuvo limitado a combatir plagas producidas por un estrecho rango de insectos lepidópteros. Sin embargo, en los últimos años se ha puesto en evidencia que estos plaguicidas son muy efectivos para un rango mucho más amplio de plagas. Tal es el caso de especies como *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni*, y otras, que son utilizadas en la actualidad para el control de insectos dípteros y coleópteros respectivamente. Más recientemente se ha informado que las proteínas Cry, aunque específicas y dada su variedad, resultan tóxicas a un

65

espectro mucho más amplio de insectos. En la actualidad se sabe que las diferentes cepas de Bt son capaces de producir más de 550 toxinas diferentes, de las cuales, algunas poseen actividad nematocida (Crickmore y *et al.* 2009).

Una estrategia muy utilizada para el control biológico de nematodos es el empleo de organismos que colonizan la rizosfera y en particular las bacterias. Estos microorganismos pueden crecer en la rizosfera por lo que constituyen una barrera defensiva para las raíces contra el ataque de patógenos, por lo que en general resultan muy efectivos como organismos de control biológico (Weller, 1988). Las rizobacterias tienen la habilidad de colonizar las raíces de las plantas (Schroth y Hancock, 1982) y tienen también un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas.

Sikora (1992) señaló que entre el 7 y el 10% de los aislados bacterianos de la rizosfera de remolacha azucarera, patata y tomate posee actividad antagonista contra nematodos formadores de quistes y nódulos. Sikora y Hoffmann-Hergarten (1993) señalaron que las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) poseen una importante influencia en la relación íntima que se establece entre los nematodos parásitos y sus plantas hospederas, regulando el comportamiento de los nematodos durante la fase más temprana de penetración del parásito en la raíz, lo cual es extremadamente importante para el rendimiento de la cosecha.

Sikora en 1988 encontró que un aislado de *Bacillus subtilis* resultó efectivo en el control de *Meloidogyne incognita* en algodón y remolacha azucarera, *M. arenaria* en cacahuets y *Rotylenchulus reniformis* en algodón. Smith en 1994 informó que *Bacillus* sp. Cepa 23a redujo la densidad de *M. javanica* en tomate. *Pseudomonas fluorescens* cepa Pf1 reduce el número de nódulos y huevos de *M. incognita* en raíces de tomate (Santhi y Sivakumar, 1995). También la cepa S18 de *Bacillus cereus* disminuye la densidad de *M. incognita* en tomate (Keuken, 1996). Por otra parte Giannakou, *et al.*, 2004 y Terefe *et al.*, 2009, demostraron que el producto Bionem, a base de *Bacillus firmus*, posee una elevada actividad en el control de *Meloidogyne* spp. En condiciones de laboratorio, maceta y campo.

Otro de los grupos de elevada importancia entre los organismos causantes de enfermedades de las plantas son los hongos fitopatógenos, que incluye especies de los géneros *Botrytis*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Thielaviopsis* y *Botryosphaeria* entre muchos otros, los cuales pueden sobrevivir durante muchos años en el suelo.

Diversos mecanismos han sido descritos para explicar el fenómeno de control biológico de estos patógenos, tales como parasitismo, protección cruzada, antibiosis, competencia e inducción de resistencia, entre otros (Shoda, 2000, Walsh y col., 2001).

Uno de los nichos ecológicos (posición relacional de una especie en un ecosistema) más estudiados ha sido la rizosfera, por las relaciones que aquí se establecen entre plantas y otros organismos (Warrior, 2000). Desde la década de los 80 se ha venido estudiando los microorganismos de la rizosfera, como posibles sustitutos de los plaguicidas químicos para controlar una amplia gama de plagas y enfermedades. Debido a su abundante distribución en suelo, su capacidad de colonizar las raíces de las plantas, y de producir una gran variedad de compuestos beneficiosos, así como antagonistas de un elevado número de patógenos, estos organismos resultan muy adecuados para el control biológico de plagas y enfermedades. (Anjaiah y col., 1998; Hill y col., 1994; Maurhofer y col., 1991; Rodríguez, y Pfender. 1997; Ross y col., 2000 y Thomashow y col., 1997).

Entre los grupos microbianos de la rizosfera, que han sido ampliamente estudiados como agentes de control biológico de plagas y enfermedades producidas por los microorganismos, se encuentra el constituido por los hongos. El mismo ha sido empleado con éxito en el control de hongos patógenos pertenecientes a los géneros *Botrytis*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Penicillium*, y *Macrophomina* y otros (Whipps y Lumsden, 2001, McQuilken y col., 2001, Jones y Whipps, 2002, entre otros). Dado su metabolismo tan diverso, este grupo microbiano es capaz de producir una gran variedad de sustancias útiles para el control biológico. Por estas razones, el número de cepas y productos a base de hongos para este fin es cada vez más amplio y variado (Cook y col., 1996, Whipps, 1997, Fravel y col., 1998, EPA USA 2006. US 6,306,386 y US 6,890,530 entre otros).

El de las PGPR para el control biológico de plagas y enfermedades ha sido también ampliamente estudiado. La particularidad fundamental de este tipo de agentes es que además de su efecto protector, poseen una amplia capacidad de colonizar las raíces de las plantas y un gran poder estimulador del crecimiento vegetal, lo que une al efecto protector una mejora general de la sanidad de los cultivos y de esta forma, la planta es también más resistente al ataque de los patógenos. Este grupo de agentes ha sido empleado en enfermedades producidas por hongos fitopatógenos pertenecientes a los géneros *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Thielaviopsis*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Botrytis* entre otros (Emmert y handelsman, 1999, Ligon, y col., 2000, Cavaglieri, y col., 2004 y Roberts, y col., 2005, US 7,118,739, ES 2306600, WO 2008/113873, entre otros).

El género *Pseudomonas* ha sido objeto de numerosos estudios a lo largo de años por ser uno de los agentes más activos y dominantes en la rizosfera (Geels y Schippers, 1983, de Freitas y Germida 1991, de la Cruz y col., 1992, Ligon, y col., 2000, US 7,087,424). Miembros del género producen diferentes antibióticos que están íntimamente relacionados con la reducción y supresión de enfermedades de plantas. Otro factor que juega un papel fundamental en este fenómeno es la producción de sideróforos, lo cual contribuye además, al crecimiento de las plantas por la vía del suministro de hierro. Esta habilidad está muy extendida en miembros del género *Pseudomonas*. Sin embargo, la incapacidad del género para producir estructuras de resistencia durante su crecimiento, limita en alguna medida la estabilidad y efectividad de los biopreparados obtenidos con cepas de este género.

El género *Bacillus* también ha sido ampliamente estudiado, por presentar grandes potencialidades en este sentido. Este tiene como características principales el hecho de estar prácticamente omnipresente en todo tipo de suelos, a lo cual une una elevada tolerancia térmica, un rápido crecimiento en medios líquidos y la formación de esporas de resistencia que le permite sobrevivir durante largos periodos de tiempo. Todo esto le confiere a las cepas del género un gran potencial como agentes de biocontrol. La Agencia Norteamericana de Protección del Medioambiente (EPA) tiene registradas más de diez cepas de diferentes especies de este género como bioplaguicidas y en particular biofungicidas (EPA 2006). Los principales mecanismos asociados al biocontrol de hongos fitopatógenos mediante cepas de este género, también incluyen la producción de antibióticos, sideróforos, surfactantes y enzimas hidrolíticas tales como quitinasas entre otros (Utkhede, 1984, Acea y col., 1988, Stanghellini y Miller 1996, Shoda 2000, Banat y col., 2000, Zhang, y col., 2001, Ruiz-García y col., 2005, US 7,087,424 y EP1647188, ES 2306600, WO 2008/113873, entre otros).

Otros géneros bacterianos han sido también estudiados como agentes para el biocontrol, entre los que se encuentran los géneros, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Stenotrophomonas* y *Streptomyces* (McClure, y col., 1998, Brewster y col., 1997, Sabaratnam and Traquair, 2002, Cavaglieri y col., 2004 y otros).

Por otra parte, es bien conocida la importancia que tienen los microorganismos en el ciclo de los nutrientes en el suelo y su papel en la nutrición de las plantas. Su participación activa en la descomposición y mineralización de la materia orgánica, así como en la fijación y liberación de nutrientes del suelo, es crucial para el mantenimiento de la productividad de las plantas. Las interacciones que se establecen entre los microorganismos del suelo y las raíces de las plantas, satisfacen importantes requerimientos nutricionales para ambos. Las raíces están directamente influenciadas por la composición y densidad de la comunidad microbiana que en ellas se desarrolla, conociéndose esto como “Efecto Rizosfera” (Atlas, R.M. y Bartha, R., 1993) La práctica de la inoculación de plantas con microorganismos promotores del crecimiento vegetal es bien conocida desde hace muchos años (US.570,813).

Un grupo de microorganismos que tiene una notable importancia en este fenómeno es aquel que participa en la solubilización del fósforo de fuentes que de otra forma serían inaccesibles para las plantas. (Kucey y col, 1989). Muchos microorganismos son capaces de asimilar el fósforo insoluble del suelo, liberando una parte de este en forma de fosfatos solubles que a su vez pueden ser utilizados por las plantas, contribuyendo de esta forma a la nutrición vegetal (Chabot y col, 1993). En general es aceptado que la solubilización de fosfatos en el suelo es debida a la producción de ácidos orgánicos y oxo ácidos quelantes, a partir de azúcares (Leyval and Barthelin 1989, Deubel y Gransee 1996, Yadav y Dadarwal, 1997. En la actualidad existen procedimientos que emplean los microorganismos solubilizadores de fosfatos en la fertilización (US. 5,912,398, ES 2234417, WO 2009/027544, entre otras).

Los géneros *Enterobacter* y *Pantoea* han sido utilizados en la agricultura como solubilizadores de fosfato y para la protección contra enfermedades de las plantas (Gyaneshwar y col, 1999, EP1116632 y EP1174030, ES 2149131, ES 2234417, WO 2009/027544, entre otras). El género *Bacillus* también ha sido frecuentemente utilizado en la estimulación de crecimiento vegetal y la solubilización de fosfatos (RO 120556, CN 101439993, WO 2009/070966, entre otras).

Otro aspecto que en la práctica ocupa un lugar muy importante es el empleo de los microorganismos de la rizosfera fijadores de nitrógeno atmosférico. Esta práctica es también conocida desde hace muchos años (US. 1,212,196). Numerosos microorganismos han sido utilizados para esta función entre los que se encuentran bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Azotobacter* y *Azospirillum* (ES 2093559; US 5,951,978, ES 2234417, WO 2009/027544), y hongos de los géneros *Saccharomyces*, *Hansenula* (US 6,596,273) y *Aspergillus* (US 4,670,037) entre otros.

En los años 70 varios experimentos realizados en Brasil determinaron la significativa contribución del N₂ fijado para las plantas por diferentes microorganismos, encontrándose *Azospirillum* entre los géneros principales. (Döbereiner y Day, 1976; Neyra y Döbereiner, 1977 entre muchos otros). Estudios posteriores de cuantificación de la fijación biológica del nitrógeno (FBN) en caña de azúcar en este país, demostraron que prácticamente el 65% del total del N₂ acumulado fue derivado de la FBN, lo que representa alrededor de 150 kg N₂ x ha-1 x año-1, de lo que se derivó la recomendación de reducir al mínimo el uso de los fertilizantes nitrogenados, (Döbereiner, 1989; Urquiaga y Döbereiner, 1990).

Bashan y col (1990) demostraron que no es solo el nitrógeno el principal elemento involucrado en la relación *Azospirillum*-planta, sino que también el fósforo y el potasio juegan un papel fundamental en esta relación, concluyendo que en dependencia de la cepa utilizada, existirá un cambio cuantitativo en la toma de los minerales por la planta, aumentado significativamente algunas cosechas.

Hay que destacar que muchos autores coinciden en señalar que los efectos beneficiosos por la inoculación con microorganismos sobre el crecimiento vegetal, no son solo debidos a la solubilización de fosfatos o a la fijación biológica del nitrógeno. Existen mecanismos tales como la producción de fitohormonas y sideróforos o la actividad de la enzima 1-aminociclopropano 1-carboxilato desaminasa entre otros, que contribuyen notablemente en este efecto (Datta y col, 1992, Chabot y col, 1993, Deubel and Gransee 1995, Frietas y col, 1997, El-Khawas y col, 1998; Cassán y col 2001 entre otros).

El desarrollo asociativo de los géneros *Azospirillum* y *Bacillus* ha sido llevado a cabo exitosamente en la fijación biológica de nitrógeno y la solubilización de fosfatos, demostrándose que no existen incompatibilidades entre ambos

géneros y que al mostrar diferentes los mecanismos de regulación metabólica pueden realizar diferentes funciones en un ecosistema dado (Sukumar, 2001, El-Komy, H.M. 2005, Tabrizi, *et al.* 2008). Los cultivos mixtos de microorganismos del suelo, con diferentes capacidades metabólicas pueden desarrollar relaciones de cooperación entre sí y con las plantas que hacen más eficiente la adsorción de nutrientes por éstas y además pueden producir sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal, aumentando la productividad de las cosechas y protegiéndolas contra los microorganismos patógenos. También se ha llevado a cabo con éxito la obtención de cepas de *Azospirillum* que expresan toxinas de *Bacillus* intentando obtener los beneficios de ambos microorganismos (Goundera and Rajendrana 2001), aunque las limitaciones actuales de la legislación sobre liberación de organismos genéticamente modificados (GMOs), no ha permitido una introducción masiva de este tipo de cepas.

Las tendencias actuales en la inoculación de plantas con microorganismos se orientan en el sentido de utilizar cultivos mixtos (llamados también consorcios) que potencien fenómenos tales como la protección contra enfermedades producidas por organismos patógenos, el incremento de la eficiencia de la absorción del fósforo por las raíces, la fijación biológica del nitrógeno, la estimulación del crecimiento vegetal por la producción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, así como sideróforos entre otros (ES 2093559; EP1166632; US 5,147,441; US 6,277,167 y US 6,596,273 WO 00/51435). Esta práctica se ha revelado como la más efectiva en la biofertilización. Otros antecedentes aparecen en US 5,071,4623, US 5,578,486, WO93/19604, WO 00/73244, WO 00/64837, WO 02/20431, WO 02/070436. Por otro lado cepas del *Bacillus thuringiensis* con actividad bionematicida aparece descritas en los documentos US 5,378,460 y WO 99/09819.

Un aspecto muy importante a tener en cuenta en el control biológico es el empleo de mezclas o combinaciones de diversos agentes de control, particularmente si éstos poseen diferentes mecanismos de acción, los cuales pueden llegar a ser complementarios. De hecho, en la práctica, este es el fenómeno que se presenta en la naturaleza, por lo que su uso puede resultar muy beneficioso. Estas combinaciones de microorganismos, han demostrado en general una mayor eficacia, combinando efectos de nutrición y promoción del crecimiento vegetal con el de inhibición o supresión de diferentes plagas y enfermedades por lo que se presentan como una alternativa de gran potencial para su uso en la agricultura. Sin embargo, es muy importante tener en cuenta para la elaboración de este tipo de productos, que ningún componente de la mezcla tenga alguna acción inhibitoria sobre los demás o pueda interferir excesivamente con la microbiota normal del ecosistema (Whipps, 2000). Uno de los problemas más importantes en la producción de este tipo de biopreparados es el lograr una tecnología asequible desde el punto de vista práctico de producción y formulación.

Breve descripción de la invención

El objeto de la presente invención es un preparado biológico, líquido o sólido, que presenta una potente actividad nematicida y que posee además capacidad biofertilizante y potenciadora del crecimiento y el enraizamiento tanto en semilleros, como en viveros, invernaderos y producción vegetal en general. El producto consiste en un preparado microbiano que contiene células de nuevos aislados de *Bacillus thuringiensis* cepa N₁₁, *Bacillus mojavensis* cepa SR₁₁ y *Azospirillum brasilense* cepa ALo₁ que los autores de la presente invención han logrado aislar. Dichos microorganismos han sido depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) que les ha asignado los números de depósito CECT-7665, CECT-7666 y CECT-5856 respectivamente. Las bacterias fueron identificadas por los autores y se solicitó además la identificación en la CECT verificándose su identidad. El citado preparado consiste en un producto líquido o sólido, compuesto por las células bacterianas y que contiene además los componentes necesarios para garantizar su supervivencia durante el almacenamiento, así como en el ambiente, después de su aplicación en el tratamiento de las plantas. Dicho preparado es un consorcio microbiano formado por *Bacillus thuringiensis* N₁₁ con una gran capacidad antagonista de nematodos fitopatógenos, *Bacillus mojavensis* cepa SR₁₁ con acción sinérgica en la actividad antagonista de nematodos fitopatógenos y gran eficiencia para la solubilización de fosfatos y otros minerales del suelo, así como capacidad de producir sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal y que contiene además *Azospirillum brasilense* cepa ALo₁ fijadora de nitrógeno atmosférico con una elevada capacidad para producir sustancias promotoras del crecimiento vegetal. Dicho consorcio posee una elevada capacidad nematicida y presenta además actividad, promotora del crecimiento vegetal, el enraizamiento, y es un excelente potenciador de la salud de las plantas.

El microorganismo *Bacillus thuringiensis* N₁₁ CECT-7665 constituye igualmente objeto de esta invención. El mismo fue obtenido utilizando un procedimiento que combina el aislamiento en medio sólido y la selección mediante un proceso de tamizado secuencial, de crecimiento en medios agarizados para la determinación de diferentes actividades enzimáticas. Posterior se determinó su capacidad nematicida en bioensayos frente a la raza 2 de *Meloidogyne incognita* en base a su poder ovicida en placas y para inhibir la formación de nódulos en plántulas de pepino *in vitro*. La cepa N₁₁ posee además la capacidad de solubilizar fosfatos y otros minerales del suelo lo cual fue demostrado a través de su cultivo en medio sólido y la determinación del PO₄³⁻ solubilizado en medio líquido agitados, empleando en ambos casos Ca₃PO₄ como única fuente de fósforo. Quedó demostrado mediante análisis por HPLC y bioensayo en insectos que *Bacillus thuringiensis* cepa N₁₁ no produce β-exotoxinas. Dicha cepa capaz de degradar la lecitina así como el colágeno.

Asimismo constituye objeto de la presente invención el microorganismo *Bacillus mojavensis* SR₁₁ CECT-7666. El mismo fue obtenido utilizando un procedimiento que combina el aislamiento en medios agarizados con tampón Tris HCl 1N pH 8, por zonas de aclaramiento del agar (Gyaneshwar y col 1999) y selección mediante determinación del PO₄³⁻ solubilizado en medios líquidos agitados (Nautiyal 1999), empleando en ambos casos Ca₃PO₄ como única

fuelle de f3sforo. La capacidad para fijar nitr3geno atmosf3rico se estableci3 cultivando dicha cepa en medio NFb semi-s3lido (Kreig y D3bereiner, 1984), libre de nitr3geno. La presencia del enzima 1-aminociclopropano 1-carboxilato desaminasa se comprob3 a trav3s del crecimiento en medio s3lido con 3cido 1-aminociclopropano 1-carbox3lico (ACC) como 3nica fuente de nitr3geno (Penrose 2001).

5 El microorganismo *Azospirillum brasilense* ALO₁ CECT 5856 y es tambi3n motivo de la presente invenci3n. El mismo fue obtenido mediante un procedimiento que combina el aislamiento en medio NFb semi-s3lido (Kreig y D3bereiner, 1984) y la selecci3n a trav3s su capacidad para estimular el crecimiento vegetal y producir auxinas y otras fitohormonas. La capacidad para estimular el crecimiento vegetal. Se comprob3, mediante estos bioensayos que
10 la cepa ALO₁ posee un potente efecto estimulador del crecimiento vegetal, muy superior en comparaci3n con los otros aislados ensayados. La producci3n de 3cido 3 indol ac3tico (AIA) fue verificada por m3todos colorim3tricos (Pilet y Chollet 1970) y HPLC (Olivella y col 2001), as3 como se detect3 la presencia de otras fitohormonas del tipo citoquininas. En la producci3n de AIA, en con 200 mg x L⁻¹ de tript3fano, se logran concentraciones de 100-180 mg x mL⁻¹ y un por ciento de transformaci3n de hasta el 90% de este amino3cido. Se comprob3 tambi3n la actividad del
15 enzima 1-aminociclopropano 1-carboxilato desaminasa presente en esta cepa, a trav3s del crecimiento en medios con 3cido 1-aminociclopropano 1-carbox3lico (ACC) como 3nica fuente de nitr3geno (Penrose 2001).

La capacidad del bionematicida para estimular el crecimiento vegetal fue comprobada mediante bioensayos de laboratorio e invernadero, seg3n los m3todos descritos por Bashan y col 1986, Fern3ndez 1995 y Bashan 1998.

Tambi3n constituye objeto de esta patente de invenci3n el procedimiento de producci3n de las cepas y los caldos de cultivo utilizados en el citado preparado, el cual consta de cuatro pasos:

- Propagaci3n de la cepa N₁₁ en cultivo sumergido, en un medio espec3fico que estimula la esporulaci3n y la capacidad para producir enzimas proteol3ticas y quitinol3ticas y que al final de la fermentaci3n contiene en su composici3n una elevada actividad plaguicida.
- Propagaci3n de la cepa SR₁₁ en un medio de cultivo que estimula la esporulaci3n y la capacidad de producir sustancias surfactantes y que al final de la fermentaci3n contiene en su composici3n actividad fungicida y capacidad para estimular el crecimiento vegetal y el enraizamiento.
- Propagaci3n de la cepa ALO₁ en un medio a base de sustancias naturales y sales minerales en el cual se produce adem3s una elevada concentraci3n de sustancias promotoras de crecimiento vegetal y del enraizamiento.
- Mezcla final de esto tres caldos fermentados en partes proporcionales, lo que da como resultado un l3quido con una elevada concentraci3n celular, mayor de 10⁹ unidades formadoras de colonias (UFC) x mL⁻¹ y una potente actividad plaguicida frente a nematodos fitopat3genos, as3 como una notable capacidad para estimular el crecimiento y el enraizamiento vegetal y contribuir en eficazmente a la nutrici3n y a la salud de las plantas.

De igual manera son objetos de esta invenci3n los procedimientos de obtenci3n de los formulados, los cuales constan de los siguientes pasos:

Formulado l3quido:

- Al l3quido obtenido por el procedimiento anterior se le a3ade una soluci3n quitosano en una proporci3n tal que quede a una concentraci3n final del 0,1-1% y se agita hasta disoluci3n total. El producto as3 formulado tiene una estabilidad a temperatura ambiente no menor de 6 meses.

Inmovilizaci3n celular en formulado s3lido:

- Al l3quido obtenido mediante el procedimiento de producci3n de las cepas y los caldos de cultivo, se le a3ade los siguientes componentes agitando continuamente:

Leche descremada	1-3%
Sacarosa	2-4%
Maltodextrina	3-5%

- Se contin3a con la agitaci3n durante una hora para permitir la interacci3n entre los diferentes componentes y luego se procede a alimentar un secador por aspersi3n (Spray Dryer) para llevar a cabo el proceso de secado hasta una humedad final de 4-6%.

El proceso de encapsulaci3n de la composici3n desarrollada mediante secado por aspersi3n, ha permitido garantizar la estabilidad del preparado por no menos de un a3o y facilitar su aplicaci3n. Estos procedimientos han sido usados con 3xito por los autores en la realizaci3n de otros preparados microbianos para el control biol3gico y la biofertilizaci3n.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra un bioensayo en cultivo gnotobiótico de plántulas de pepino.

5 La Fig. 2 ilustra un bioensayo en bandejas de plantas de tomate en cámara de cultivo.

Las Figs. 3 y 4 muestran ejemplos de valoraciones realizadas a partir de plantas de sandía tratadas con el bioplaguicida (Fig. 3) y de plantas testigo sin tratar (Fig. 4).

10 Las Fig. 5 y 6 ilustran ejemplos de valoraciones visuales realizadas a partir de ensayos de plantas de tomate tratadas con el bioplaguicida (Fig. 5) y de plantas testigo sin tratar (Fig. 6).

Las Figs. 7 y 8 ilustran ejemplos de valoraciones visuales realizadas a partir de ensayos de plantas de pepino tratadas con el bioplaguicida (Fig. 7) y de plantas testigo sin tratar (Fig. 8).

15 Las Figs. 9 y 10 muestran ejemplos de valoraciones visuales realizadas a partir de ensayos de plantas de coliflor tratadas con el bioplaguicida (Fig. 9) y de plantas tratadas con Vydate (Fig. 10).

20 La Fig. 11 muestra un diagrama tridimensional que muestra la comparación de las medias de los diferentes tratamientos explicados.

Descripción detallada y Modo de realización de la invención

25 El producto líquido obtenido fue sometido a diferentes evaluaciones mediante bioensayos *in vitro*, así como ensayos de invernadero experimental y en campo en condiciones de producción. Los resultados de dichas evaluaciones se presentan a continuación.

30 En primer lugar se realizaron ensayos *in vitro*, para determinar la capacidad antagonista de éstas frente a nematodos parásitos del género *Meloidogyne* para lo cual se llevó a cabo un bioensayo utilizando el cultivo gnotobiótico de plántulas de pepino en agar, (Fernández 2004). La metodología resumida es como sigue:

Preparación del bioensayo

35 Se sumergen semillas comerciales de pepino variedad Marketmore.76 en una disolución de hipoclorito de sodio al 5% durante 3 min. Posteriormente son lavadas con abundante agua destilada estéril. A continuación se ponen a germinar durante 72 h en cámara húmeda. Las semillas germinadas se trasplantan a tubos plásticos de fondo cónico de 60 mL (3x9 cm), conteniendo 30 mL de agar-solución nutritiva (Hoffland, *et al.* 1989) y se colocan en cámara de cultivo a 25°C, 80% de humedad con ciclos de iluminación de 16 h de luz y 8 de oscuridad. Una vez que aparece la primera hoja verdadera, las plantas son sometidas a los tratamientos con el producto a ensayar.

Tratamientos

45 Se realizaron dos tipos de tratamientos: infectar las plantas mediante un inóculo mixto de huevos, juveniles y adultos de *Meloidogyne* sp. y posteriormente tratar con el producto y viceversa, primero tratar las plantas y después infectarlas con los nematodos. En ambos tratamientos se deja un intervalo de 24 h entre una inoculación y la otra.

Preparación de los inóculos infectivos

50 Se preparó un inóculo infectivo mixto con el objetivo de llevar a cabo la selección basándose en su capacidad antagonista frente a los diferentes estadios del ciclo biológico del patógeno. A partir de plantas de tomate infectadas con la raza 2 de *Meloidogyne incognita* que presentan abundantes síntomas de la enfermedad, se toman trozos de raíces y se van extrayendo los nódulos que son lavados con agua corriente y a continuación se rompen suavemente con una batidora manual de cuchilla en la menor cantidad de agua posible. Esta suspensión, con los diferentes estadios fisiológicos del patógeno es utilizada para infectar las plantas. El ensayo se realiza con 5 tubos por tratamiento como mínimo.

Determinación de la capacidad antagonista

60 A los 10 días de incubación se evalúa la formación de nódulos en las raíces de las plántulas infectadas, tratadas con el producto y los controles sin tratar. Se considera que ha habido actividad nematocida cuando existe una reducción mínima del 50% de los tubos infectados con respecto al control. El producto ensayado tuvo una efectividad del 80-100% en la inhibición de la formación de nódulos en las múltiples repeticiones que se llevaron a cabo.

65 En la figura 1 se presentan las fotos de las plántulas de pepino durante el bioensayo. En la imagen inferior, centro de esta figura, se pueden observar los nódulos formados en las raíces.

Bioensayo de cultivo gnotobiótico de plantas en agar

5 A continuación se llevó a cabo un bioensayo *in vitro* en bandejas, usando plantas de tomate provenientes de semillero. Este paso se realiza para confirmar los resultados obtenidos en el bioensayo anterior, pero en otro cultivo y en condiciones más reales. Este bioensayo consiste en lo siguiente:

Preparación del bioensayo

10 Se toman plantas de tomate variedad Raf, procedentes del semillero y se sumergen las raíces en el inoculo infectivo durante toda la noche. A continuación son trasplantadas a bandejas de 44x27x7 cm, las cuales contienen como sustrato vermiculita previamente esterilizada a la que se ha añadido una solución nutritiva de Hoagland (Hoagland y Arnon 1950). Posteriormente son tratadas con el inoculo bacteriano, el cual es añadido a la bandeja mediante riego. Las plantas son entonces colocadas en cámara de cultivo a 25°C, 80% de humedad y con ciclos de iluminación de 16 h de luz y 8 de oscuridad durante 15 días.

15 *Preparación de los inóculos infectivos*

20 Como en el bioensayo en tubos, se preparó un inoculo infectivo mixto con el objetivo de llevar a cabo la selección basándose en su capacidad antagonista frente a los diferentes estadios fisiológicos del ciclo biológico del patógeno. A partir de plantas de tomate infectadas con la raza 2 de *Meloidogyne incognita* que presentan abundantes síntomas de la enfermedad, se toman trozos de raíces y se van extrayendo los nódulos que son lavados con agua corriente y se rompen suavemente con una batidora manual de cuchilla en la menor cantidad de agua posible.

25 *Determinación de la capacidad antagonista*

A los 15 días se evalúa el número de nódulos formados en las raíces de las plantas infectadas y tratadas con los diferentes aislados, así como los controles sin tratar. Se considera que ha habido actividad nematocida cuando existe una reducción mínima del 50% con respecto al control.

30 Como se puede apreciar en la figura 2, el cultivo en bandejas, permite un mejor desarrollo de la plaga, lo cual posibilita una mayor formación de nódulos y una evaluación más precisa de la actividad nematocida de los aislados y los productos elaborados.

35 *Bioensayo de plantas en bandejas usando vermiculita como sustrato*

Al final del proceso de tamizado, se seleccionó, una mezcla de dos cepas del género *Bacillus*, N₁₁ y SR₁₁, dado que produjo mejores resultados que cualquiera de los aislados individualmente.

40 Al producto así elaborado se le añadió la cepa ALO₁ dado su potente actividad estimuladora del crecimiento vegetal con el objetivo de mejorar notablemente la salud de las plantas y reforzar su resistencia frente al ataque de organismos patógenos.

Bioensayos de estimulación del crecimiento vegetal

45 Para determinar la capacidad estimuladora del crecimiento vegetal, se llevaron a cabo bioensayos en invernadero experimental, encaminados a determinar los efectos de los productos sobre diferentes cultivos de interés comercial. Este tipo de ensayo se realizó en macetas y jardineras de diferentes volúmenes.

50 Como criterio de evaluación se determinó el peso fresco del tejido verde o parte aérea, así como el peso fresco de la raíz.

55 Los resultados de estos bioensayos resultaron en general muy positivos en cuanto a la capacidad de estimulación del crecimiento vegetal y el enraizamiento de los productos elaborados. En el Diagrama 1 se presentan los resultados obtenidos en el cultivo de lechugas para el formulado bionematicida líquido. Como puede observarse, todos los tratamientos estimularon el crecimiento vegetal y el enraizamiento con respecto al control. De todos los tratamientos ensayados, el que mejores resultados dio fue el producto bionematicida. Estos resultados se repitieron en los diferentes cultivos ensayados.

60

65

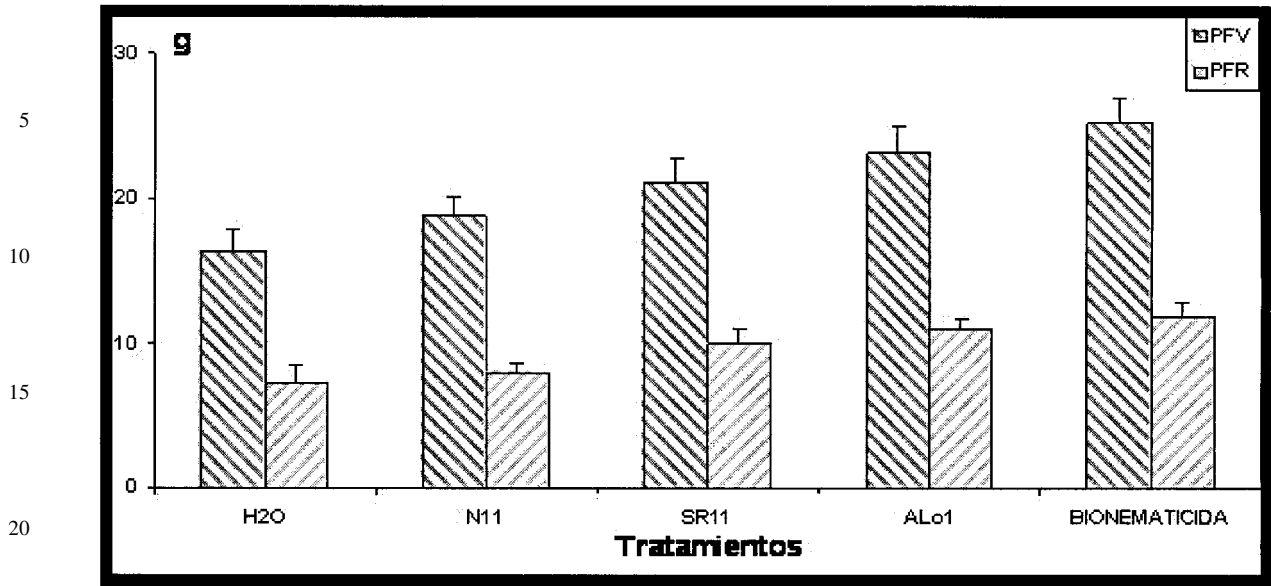


Diagrama 1

Bioensayo de las diferentes cepas y el bionematicida en plantas de lechuga

ENSAYOS DE CAMPO

ENSAYOS EN RIEGO POR GOTEO

INFORMACION GENERAL DEL ENSAYO

	Ensayo 01	Ensayo 02	Ensayo 03
Cultivo/Variiedad	Sandia / Dulce Maravilla	Tomate/Magnitud	Pepino/Tritón
Nombre científico	Citrus lanatus	Lycopersicon esc. M.	Cucumis sativus
Condiciones	Invernadero	Invernadero	Invernadero
Sistema de riego	Localizado	Localizado	Localizado
Tipo de suelo	Franco arenoso	Franco arenoso	Franco arenoso
Fecha plantación	24/02/09	20/06/09	2/07/09
Marco de plantación	2 m x 1.30 m	2 m x 0.5 m	2 m x 0.5 m
Densidad de plantación	3.846 plantas/ha	10.000 plantas/ha	10.000 plantas/ha

DATOS DEL BIOPLAGUICIDA

Tipo de formulación	Líquido Soluble
Composición	Bacillus thuringiensis cepa N ₁₁ Bacillus subtilis cepa SR ₁₁ Azospirillum brasilense cepa AL ₀₁ .
Concentración total	>10 ⁹ UFC/mL
Uso del producto	Nematicida y promotor del crecimiento vegetal.

DATOS DE LA APLICACION

	Ensayo 01	Ensayo 02	Ensayo 03
Método, de aplicación	Riego por goteo	Riego por goteo	Riego por goteo
Volumen de agua por riego	7500 L/ha	7300 L/ha	7300 L/ha
N° de aplicaciones	2 Aplicaciones.	3 Aplicaciones.	3 Aplicaciones.
Fecha de las aplicaciones	1ª- Aplicación: 13-03-09 2ª- Aplicación: 27-03-09	1ª- Aplicación: 19-06-09 2ª- Aplicación: 03-07-09 3ª- Aplicación: 17-07-09	1ª- Aplicación: 03-07-09 2ª- Aplicación: 17-07-09 3ª- Aplicación: 31-07-09
Estados fenológicos (BBCH)	BBCH 63 BBCH 71	BBCH 13 BBCH 19 BBCH 31	BBCH 13 BBCH 19 BBCH 31
Producto por hectárea	30 L/ha (20 L/ha 1º aplicación) (10 L/ha 2º aplicación)	30 L/ha (Cada aplicación 10 L/ha, 3 aplicaciones)	30 L/ha (Cada aplicación 10 L/ha, 3 aplicaciones)

DATOS RELATIVOS A LAS SUPERFICIES

	Ensayo 01	Ensayo 02	Ensayo 03
Superficie testigo (m ²)	300 m ²	2.000 m ²	1000 m ²
Superficie parcela tratada (m ²)	300 m ²	2.000 m ²	1000 m ²

DATOS RELATIVOS A LAS TESIS

Ensayo 01

Tesis	TRATAMIENTO	Dosis
N° 1	TESTIGO	-
	BIOPLAGUICIDA	30 L/ha

N ° 2		(20 L/ha 1° aplicación) (10 L/ha 2° aplicación)
-------	--	--

Ensayo 02

Tesis	TRATAMIENTO	Dosis
N ° 1	TESTIGO	-
N ° 2	BIOPLAGUICIDA	30 L/ha (10 L/ha cada aplicación, 3 aplicaciones)

Ensayo 03

Tesis	TRATAMIENTO	Dosis
N ° 1	TESTIGO	-
N ° 2	BIOPLAGUICIDA	30 L/ha (10 L/ha cada aplicación, 3 aplicaciones)

DISEÑO UTILIZADO EN EL ENSAYO. DISTRIBUCION DE LAS TESIS EN EL ENSAYO

Se plantea el ensayo con una distribución aleatoria de las tesis. Del siguiente modo:

Parcela testigo	Parcela tratada
------------------------	------------------------

DATOS RELATIVOS A LAS VALORACIONES. EFICACIAS.

Evaluación, descripción y métodos: Se toman muestras de suelo para determinar la evolución de las poblaciones de nematodos y se valora el aspecto general de las plantas de las diferentes tesis.

Resultados

Ensayo 01

De las valoraciones realizadas se pudo observar (figuras 3 y 4) que hubo una diferencia notable entre las dos tesis, en la parcela testigo se apreció una pérdida de vigor y color en las plantas, así como una menor masa foliar, a diferencia de las plantas a las que se aplicó el BIOPLAGUICIDA, donde el crecimiento fue mayor y el color verde más intenso. Esto demuestra en general el carácter estimulador del crecimiento vegetal del producto.

TABLA 1

Resumen de los resultados de los análisis hematológicos

1 ^{er} Tratamiento BIOPLAGUICIDA			
	Totales	Parásitos	No Pat
26/03/2009	1100	254	846
09/03/2009	2090	615	1475
% Reducción	47.4	58.7	42.6
2 ^o Tratamiento BIOPLAGUICIDA			
	Totales	Parásitos	No Pat
27/04/2009	2080	520	1560
09/03/2009	2090	615	1475
% Reducción	0.5	15.4	-5.8

TABLA 2

Diferencias entra las dos tesis

Incremento del control sin tratar			
	Totales	Parásitos	No Pat
27/04/2009	9790	1241	8369
09/03/2009	2090	615	1475
% incremento	78.7	56.7	82.4
Diferencias entre el tratado con BIOPLAGUICIDA y sin tratar			
	Totales	Parásitos	No Pat
27/04/2009	2080	520	1560
09/03/2009	9790	1421	8369
% Reducción	78.8	63.4	81.4

Predominan los parásitos de los géneros *Pratylenchus* y *Tylenchorhynchus*

De las tablas 1 y 2 se puede inferir que hubo una reducción drástica del número de nematodos en general y particularmente de los fitopatógenos, manteniéndose la plaga controlada en todo momento. Esto se corresponde también con el aspecto general de las plantas. El producto ha demostrado que no solo es un bionemático eficaz, sino que por la vía de la estimulación del crecimiento vegetal, hace a las plantas más saludables y resistentes al ataque de los patógenos.

Ensayo 02

De las valoraciones visuales se pudo observar (figuras 5 y 6) que hubo una diferencia notable entre las dos tesis, en los controles se apreció una pérdida de vigor y color en las plantas, así como una menor masa foliar, a diferencia de las plantas en las que se aplicó el BIOPLAGUICIDA, donde el crecimiento fue mayor y el color verde más intenso. Aquí también se demuestra la capacidad del producto para estimular el crecimiento vegetal.

TABLA 3

Resumen de los resultados de los análisis

	Totales	Parásitos	Nº Pat
A. INICIAL 18/06/09	7.700	2.880	4.813
TESTIGO 29/07/09	7.460	3.879	3.584
BIOPLAGUICIDA 29/07/09	980	231	749
% REDUCCIÓN	87%	94%	79%

Predominan los parásitos de los géneros *Pratylenchus* y *Tylenchorhynchus*.

En este ensayo también se observó una elevada reducción de las poblaciones de nematodos, así como una buena estimulación del crecimiento vegetal, resultando muy eficaz en el control de la plaga todo lo cual se puede comprobar en las tablas 3.

Ensayo 03

De las valoraciones visuales se pudo observar, como en los casos anteriores, una diferencia notable entre las dos tesis (figuras 7 y 8). Las plantas tratadas con el BIOPLAGUICIDA presentan una masa foliar mucho mayor y su aspecto en general es más saludable que las plantas testigo. El sistema radicular en estas últimas está mucho menos desarrollado y en la foto 6 se observa claramente el ataque de nemátodos a diferencia de las plantas tratadas que poseen una masa radicular mucho mayor y una elevada presencia de raíces secundarias y pelos absorbentes lo que corrobora el carácter nematicida y estimulador del crecimiento vegetal del producto.

Aquí también se pudo observar, como en los ensayos anteriores, una reducción notable de los nematodos en general y de los fitopatógenos en particular, lo que ratifica la capacidad nematicida del producto BIOPLAGUICIDA. En particular en este ensayo, dada la presencia del género *Meloidogyne*, además de los análisis nematológicos, en la figura 7 se puede comprobar la ausencia de nódulos característicos de la infección por este género, a diferencia de la figura 8 donde se observan claramente éstos en las plantas sin tratar, lo que demuestra la capacidad del BIOPLAGUICIDA para el control de nematodos fitopatógenos.

TABLA 4

Resumen de los resultados de los análisis

	Totales	Parásitos	Nº Pat
A. INICIAL 2/07/09	2080	520	1560
TESTIGO 17/09/09	1580	758	822
BIOPLAGUICIDA 17/09/09	860	0	860
% REDUCCIÓN	58 %	100 %	45 %

Predominan los parásitos de los géneros *Meloidogyne* y *Pratylenchus*.

ENSAYO EN RIEGO POR INUNDACIÓN**INFORMACION GENERAL DEL ENSAYO**

Cultivo/Variiedad	Coliflor
Nombre científico	<i>Brassica oleracea</i> L
Condiciones	Aire libre
Sistema de riego	Inundación
Tipo de suelo	Franco arenoso
Fecha plantación	25/09/09
Marco de plantación	0,65 m x 0,50 m
Densidad de plantación	28.000 plantas/ha

DATOS DEL BIOPLAGUICIDA

Tipo de formulación	Líquido Soluble
Composición	<i>Bacillus thuringiensis</i> cepa N ₁₁ <i>Bacillus subtilis</i> cepa SR ₁₁ <i>Azospirillum brasilense</i> cepa ALo ₁ .
Concentración total	>10⁹ UFC/mL
Uso del producto	Nematicida y promotor del crecimiento vegetal.

DATOS DEL PRODUCTO NEMATICIDA DE REFERENCIA**Vydate: Oxamilo 10% p/v SL****DATOS DE LA APLICACION**

Método, equipo, tipo de aplicación	Aplicación riego por inundación
N ° de aplicaciones durante el ensayo	3 Aplicaciones.
Fecha de las aplicaciones	1°.- Aplicación: 15-10-09 2°.- Aplicación: 06-11-09 3°.- Aplicación: 20-11-09

Estados fenológicos (BBCH)	BBCH 31 BBCH 33 BBCH 41
Producto por hectárea	30 l/ha (10 l/ha 1° aplicación) (10 l/ha 2° aplicación) (10 l/ha 3° aplicación)

DATOS RELATIVOS A LAS SUPERFICIES

Superficie Testigo (m²)	1000 m²
Superficie parcela tratada BIOPLAGUICIDA (m²)	4000 m²
Superficie parcela tratada OXAMILO 10% (m²)	5000 m²

DATOS RELATIVOS A LAS TESIS

Tesis	NOMBRE COMERCIAL	Dosis
N ° 1	TESTIGO	-
N ° 2	BIOPLAGUICIDA	30 l/ha (10 l/ha 1° aplicación) (10 l/ha 2° aplicación) (10 l/ha 3° aplicación)
N ° 3	VYDATE	30 l/ha (20 l/ha 1° aplicación) (10 l/ha 2° aplicación)

DISEÑO UTILIZADO EN EL ENSAYO. DISTRIBUCION DE LAS TESIS EN EL ENSAYO

Se plantea el ensayo con una distribución aleatoria de las tesis. Del siguiente modo:

Parcela testigo 1000 m²	Parcela BIOPLAGUICIDA 4000 m²	Parcela Vydate 5000 m²
---	---	--

DATOS RELATIVOS A LAS VALORACIONES. EFICACIAS.

Evaluación, descripción y métodos: Se toman muestras de suelo para determinar la evolución de las poblaciones de nematodos y se valora el aspecto general de las plantas de las diferentes tesis.

Resultados

Como se puede observar en la tabla 5, después de haber aplicado los 30 litros por hectárea del BIOPLAGUICIDA, vemos una reducción en el contenido de nematodos superior al 80% en todos los casos con respecto al análisis inicial, mientras que con la aplicación de Vydate se logran reducciones de más del 60%. Esto demuestra que el BIOPLAGUICIDA presenta una elevada eficacia en el control de nematodos e incluso superior al producto químico de referencia con lo cual queda establecido que, en el cultivo utilizado y en las condiciones del ensayo, el producto líquido elaborado a base de las cepas autóctonas N₁₁, SR₁₁ y ALo₁ resultó muy efectivo en el control de nematodos fitopatógenos, al menos de los géneros presentes.

TABLA 5

Resumen de los resultados de los análisis nematológicos

	Totales	Fitopatógenos	No Fitopatógenos
A. INICIAL 06/10/09	7910	3116	4794
BIOPLAGUICIDA 01/12/09	1360	501	859
% reducción BIOPLAGUICIDA	82	84	82
VYDATE 01/12/09	2870	1241	1489
% reducción VYDATE	64	60	69

Predominan los parásitos de los géneros *Pratylenchus*, *Ditylenchus* y *Tylenchorhynchus*.

Por otra parte se llevaron a cabo valoraciones visuales de las diferentes tesis constatándose diferencias entre las distintas tesis. En la parcela testigo se apreció una notable diferencia de vigor y color, así como una menor masa foliar, en relación con las plantas tratadas con el BIOPLAGUICIDA, las cuales son similares a las plantas tratadas con VIDATE. En estas dos últimas parcelas el crecimiento de las plantas fue mayor y su aspecto mucho mejor en cuanto a color y masa foliar. Como se puede observar en las fotos figuras 9 y 10, no hubo una diferencia significativa entre estos tratamientos.

El día de la recolección se procedió a pesar 50 piezas de coliflor por tesis, para ver las posibles diferencias en cuanto a peso. El resultado se presenta en la figura 11.

Como se aprecia en la figura 11 existen diferencias importantes en cuanto a producción donde se han aplicado los nematicidas, con respecto a la parcela testigo.

También se realizaron valoraciones de Fitotoxicidad en todos los ensayos realizados:

La valoración se hizo sobre la totalidad de la superficie ocupada por cada tesis apuntando la posible toxicidad del formulado sobre las plantas después de la aplicación.

Se miró con especial interés las tesis de los formulados.

Se observan las plantas anotando cualquier modificación en el desarrollo del ciclo (inhibición o fallo en el crecimiento, modificación fenológica, fallos en floración o frutos, la no aparición de ciertos órganos, etc.).

Se observó si existían modificaciones en la cantidad o calidad del cultivo tanto cualitativa como cuantitativamente.

Se intentó detectar las deformaciones morfológicas (enrollamientos, atrofas, elongaciones, cambios en la talla o volumen de copa, marchitamientos, etc.).

Escala % de toxicidad

Valor escala	Superficie afectada	Síntomas observados en la planta
0	0	Sin fitotoxicidad
1	0 a 5%	Inicio fitotoxicidad, hasta el 5% de superficie
2	5 a 10%	Presencia fitotoxicidad, del 5 al 10% de superficie afectada
3	10 a 25%	Ataque moderado, del 10 al 25% de superficie afectada
4	25 a 50%	Ataque fuerte, del 25 al 50% de superficie afectada
5	50 a 75%	Ataque muy fuerte, del 50 al 75% de la superficie afectada
6	75 a 100%	Hojas totalmente afectadas 100% afectado

Resultados

No hubo ningún síntoma de fitotoxicidad en las plantas tratadas en ninguno de los ensayos realizados.

Conclusiones

En las pruebas de eficacia realizadas con el bioplaguicida de la invención, en los diferentes cultivos ensayados, aplicados en riego por goteo e inundación, a la dosis de 30 L/ha, quedó demostrado que el producto es capaz de controlar los nemátodos fitopatógenos, produciendo una reducción importante de su concentración en el suelo y raíces de las plantas, del orden del 70-90%, con respecto a los testigos sin tratar y superior al producto químico de referencia utilizado en el caso del ensayo de coliflor. En este último ensayo se pudo apreciar la presencia de agallas en las plantas testigo, a diferencia de las tesis donde se aplicaron los nematicidas.

En las valoraciones visuales se pudo observar una diferencia notable entre las dos tesis, en los controles se apreció una pérdida de vigor y color en las plantas testigo, así como una menor masa foliar y el sistema radicular estaba menos desarrollado lo que demuestra la actividad de nematodos fitopatógenos, a diferencia de las plantas en las que se aplicaron los nematicidas y particularmente el BIOPLAGUICIDA donde, pocos días después de la primera aplicación, ya se observó que el crecimiento fue mayor y el color verde más intenso lo que se mantuvo a lo largo de todo el ensayo, en cada caso. Esto demuestra en general el carácter estimulador del crecimiento vegetal del producto.

No se observó fitotoxicidad en ninguno de los ensayos realizados, por el contrario los efectos del producto están relacionados con una mejora general de la salud de las plantas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un cultivo puro de la cepa denominada N₁₁ de la especie *Bacillus thuringiensis*, **caracterizada** por poseer una elevada actividad nematocida, así como actividad colagenasa, no producir β -exotoxina y que posee la capacidad para solubilizar fosfatos, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número CECT-7665.
- 10 2. Un cultivo puro de la cepa denominada SR₁₁ de la especie *Bacillus mojavensis*, **caracterizada** por su capacidad para solubilizar fosfatos del suelo y estimular el crecimiento vegetal, siendo capaz de producir ácido indol-3-acético y crecer en ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC) como única fuente de nitrógeno, habiendo sido depositada dicha cepa en la CECT con el número CECT-7666.
- 15 3. Un cultivo puro de la cepa denominada ALO₁ de la especie *Azospirillum brasilense*, **caracterizada** por producir, ácido 3 indol acético con un por ciento de conversión de entre 70-90% del triptófano añadido en el medio de cultivo, sideróforos y otras sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, así como de fijar nitrógeno atmosférico y con capacidad para crecer en ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC) como única fuente de nitrógeno, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número CECT-5856.
- 20 4. Un preparado biológico bionemático y estimulador del crecimiento vegetal **caracterizado** por contener *Bacillus thuringiensis* cepa N₁₁ (CECT-7665), *Bacillus mojavensis* cepa SR₁₁ (CECT-7666) y *Azospirillum brasilense* cepa ALO₁ (CECT-5856).
- 25 5. Un preparado biológico bionemático y estimulador del crecimiento vegetal según la reivindicación 4, **caracterizado** porque las células microbianas son obtenidas mediante uno o varios procesos de fermentación sumergida en la cual se alcanzan concentraciones celulares mayores de 109 UFC/mL.
- 30 6. Un preparado biológico bionemático y estimulador del crecimiento vegetal según la reivindicación 4 ó 5 **caracterizado** por contener células vivas de dichas tres bacterias en proporciones adecuadas para alcanzar una concentración final total mayor de 109 UFC x mL⁻¹, en una formulación líquida.
- 35 7. Un preparado biológico bionemático y estimulador del crecimiento vegetal según reivindicación 4 ó 5, **caracterizado** por contener células vivas de estas tres bacterias en proporciones adecuadas para alcanzar una concentración final total mayor de 1010 UFC x mL⁻¹, en una formulación sólida.
8. Un preparado biológico bionemático y estimulador del crecimiento vegetal según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, **caracterizado** por contener además de las células viables, materia orgánica y otras sustancias con actividad plaguicida y reguladoras del crecimiento de plantas.
- 40 9. Un preparado biológico bionemático y estimulador del crecimiento vegetal según la reivindicación 6 **caracterizado** que presenta una estabilidad de hasta seis meses a temperatura ambiente.
- 45 10. Un preparado biológico bionemático y estimulador del crecimiento vegetal según reivindicación 9, **caracterizado** porque la estabilidad es garantizada mediante el empleo de sustancias inhibitoras del crecimiento microbiano.
- 50 11. Un preparado biológico bionemático y estimulador del crecimiento vegetal según la reivindicación 7 **caracterizado** que presenta una estabilidad de hasta un año a temperatura ambiente.
12. Un preparado biológico bionemático y estimulador del crecimiento vegetal según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la estabilidad es garantizada mediante un proceso de secado por aspersión utilizando sustancias protectoras de la viabilidad celular.
- 55 13. Un preparado biológico bionemático y estimulador del crecimiento vegetal según una cualquiera de las reivindicaciones 7, 11 ó 12, **caracterizado** porque las sustancias protectoras de la viabilidad celular son la leche descremada en polvo, la Maltodextrina y la sacarosa, y la estabilidad es garantizada mediante un proceso de secado por aspersión utilizando sustancias protectoras de la viabilidad celular.
- 60 14. Un preparado biológico bionemático y estimulador del crecimiento vegetal según una cualquiera de las reivindicaciones 7, 11 ó 12, **caracterizado** porque las concentraciones de las sustancias protectoras son: leche descremada en polvo es usada entre el 1-3%, Maltodextrina 3-5% y sacarosa 2-4%. y la estabilidad es garantizada mediante un proceso de secado por aspersión utilizando sustancias protectoras de la viabilidad celular.
- 65 15. Un preparado biológico bionemático y estimulador del crecimiento vegetal según una de las reivindicaciones 4 a 14 **caracterizado** porque presenta una elevada actividad al ser aplicado tanto en riego por goteo como por inundación.



FIGURA 1

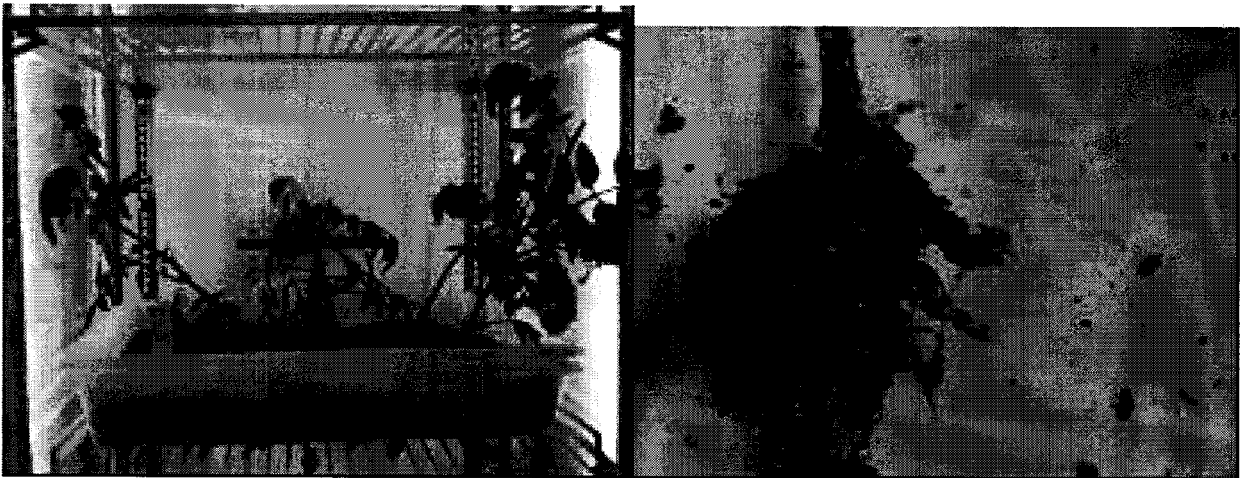
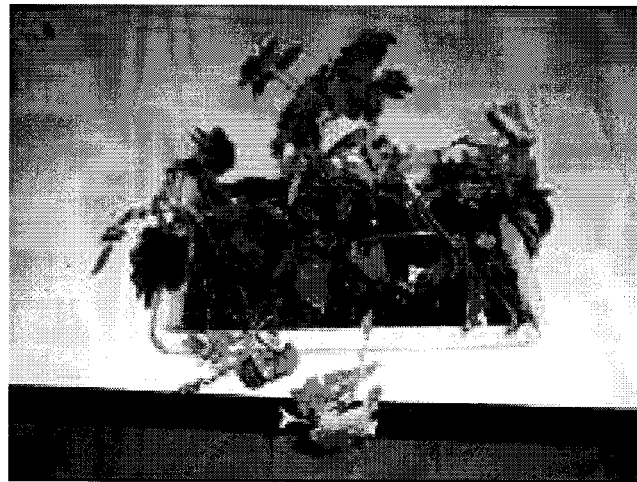


FIGURA 2



FIGURA 3



FIGURA 4



FIGURA 5



FIGURA 6



FIGURA 7



FIGURA 8



FIGURA 9



FIGURA 10

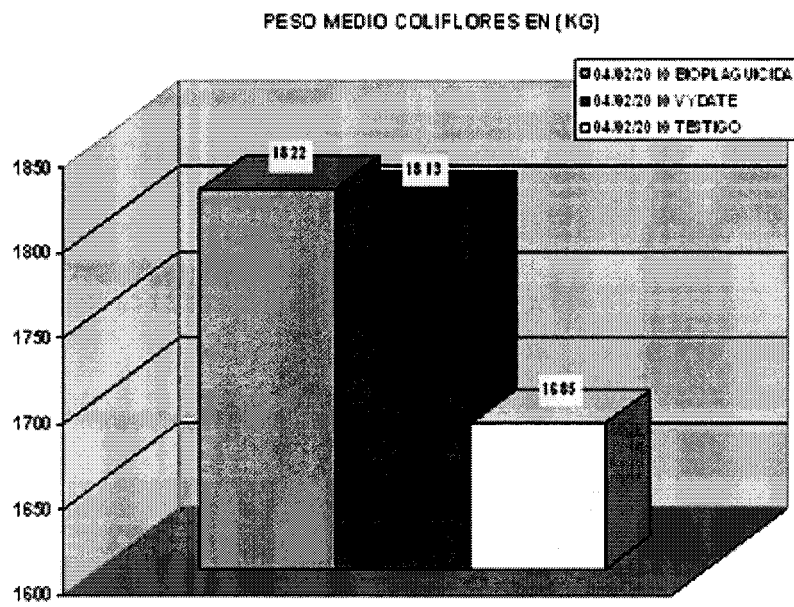


FIGURA 11



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201000425

②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.03.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A01N63/00** (2006.01)
A01P5/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 0462721 A2 (MYCOGEN CORPORATION) 27.12.1991	1,4-15
A	MOZGOVAYA I.N . et al . Nematicidal effects of the entomopathogenic bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i> in soil. 2002. <i>Pedobiología</i> . Vol.46, páginas 558-572.	1,4-15
A	US 20070224179 A1 (BARRY JACOBSEN; NINA K.ZIDACK; REBECCA LARSON) 27.09.2007	2,4-15
A	WO 2009027544 A1 (PROBELTE, S.A.) 05.03.2009	3,4-15
A	Natural occurrence of <i>Azospirillum brasilense</i> in strawberry plants. 2007. <i>Plant Soil</i> . Vol. 295, páginas 169-178.	3,4-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
21.03.2012

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

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

A01N, A01P

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.03.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 0462721 A2 (MYCOGEN CORPORATION).	27.12.1991
D02	MOZGOVAYA I.N . et al . Nematicidal effects of the entomopathogenic bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i> in soil. <i>Pedobiología</i> . Vol. 46, páginas 558-572.	2002
D03	US 20070224179 A1 (BARRY JACOBSEN; NINA K.ZIDACK; REBECCA LARSON).	27.09.2007
D04	WO 2009027544 A1 (PROBELTE, S.A.).	05.03.2009
D05	Natural occurrence of <i>Azospirillum brasilense</i> in strawberry plants.2007. <i>Plant Soil</i> . Vol. 295, páginas 169-178.	2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

En la solicitud de patente se reivindica un cultivo puro de tres especies de bacterias y un preparado biológico que comprende a las mismas. Las tres especies bacterianas reivindicadas son:

La cepa N₁₁ de *Bacillus thuringiensis*, con número de depósito CECT-7665, caracterizada por poseer una elevada actividad nematocida, así como, actividad colagenasa, no producir β -exotoxina y poseer la capacidad para solubilizar fosfatos.

La cepa SR₁₁ de la especie *Bacillus mojavensis*, con número de depósito CECT-7666, caracterizada por su capacidad para solubilizar fosfatos y estimular el crecimiento vegetal, así como por su capacidad para producir ácido 3-indol-acético y por crecer en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico como única fuente de nitrógeno.

La cepa AL₀₁ de la especie *Azospirillum brasilense*, con número de depósito CECT-5856, caracterizada por producir ácido 3-indol-acético, con un porcentaje de conversión de entre 70-90% del triptófano, por producir sideróforos y otras sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, así como por su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico y para crecer en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico como única fuente de nitrógeno.

Los documentos D01 y D02 muestran diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* con actividad nematocida.

El documento D03 divulga como la especie bacteriana *Bacillus mojavensis* aumenta la resistencia a enfermedades en plantas.

Los documentos D04 y D05 muestran diferentes cepas de *Azospirillum brasilense*. El documento D04 refleja la capacidad de la especie *Azospirillum brasilense* para fijar nitrógeno atmosférico y producir ácido 3-indol-acético. El documento D05 divulga como diferentes cepas, de la citada especie bacteriana, son capaces de fijar nitrógeno atmosférico y producir compuestos sideróforos.

Ninguno de los documentos citados anteriormente (D01, D02, D03, D04 y D05) muestra una especie bacteriana que presente las mismas características que las especies bacterianas reivindicadas en la solicitud de patente. Por tanto, las reivindicaciones 1-15 presentan novedad y actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 Ley 11/1986.