

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 822 824**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2010.01)
C12R 1/07 (2006.01)
C12N 11/00 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C05F 11/02 (2006.01)
C05G 3/00 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2016** **PCT/DE2016/000159**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016** **WO16165685**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2016** **E 16727286 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020** **EP 3282847**

54 Título: **Selección y uso de cepas de bacilos tolerantes al frío como fitoestimuladores biológicos**

30 Prioridad:

14.04.2015 DE 102015004809

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

05.05.2021

73 Titular/es:

ABITEP GMBH (100.0%)
Gliennicher Weg 185
12489 Berlin, DE

72 Inventor/es:

BORRIS, RAINER;
DIETEL, KRISTIN y
BEIFORT, PAUL

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 822 824 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

Selección y uso de cepas de bacilos tolerantes al frío como fitoestimuladores biológicos

- 5 [0001] La invención se refiere a un medio biológico para la mejora del rendimiento de plantas de cultivos. Campos de aplicación de la invención son la agricultura, la jardinería y protección de vegetales.

Estado de la técnica

- 10 [0002] La introducción de pesticidas o fertilizantes biológicos proporciona una alternativa ecológica para pesticidas químicos y abonos minerales. Las rizobacterias "promotoras del crecimiento vegetal" (PGPR) se utilizan con éxito para la producción de biofórmulas eficaces. Tienen mucha importancia representante del género *Bacillus* con la capacidad de formación de endosporas duraderas, porque presentan una gran estabilidad natural. Las esporas son formas permanentes de la célula bacteriana, que resisten influencias ambientales extremas como calor y sequía y durante años se pueden almacenar sin pérdida de actividad.

- 15 [0003] Las biofórmulas de representantes del género *Bacillus* son los medios de protección de protección de cultivos biológicos y fitoestimuladores (Borriess 2011) más utilizados. Además de los fabricantes conocidos de los insecticidas *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus kurstakii*, son las cepas de la familia *Bacillus subtilis*, entre otras, *B. Amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, *B. Subtilis*, *B. Licheniformis* y *B. Pumilus*, las que presentan mayor aplicación en este campo. Ejemplos de productos comerciales (abonos biológicos y/o medios de protección de cultivos), que contienen esporas de *B. Amyloliquefaciens plantarum*, son Kodiak™ (Baier Crop Science), Companion (Growth Products Ltd.), BioYield™ (Bayer Crop Science), INTEGRAL® (BASF), VAULT® (BASF), SERENADE® Max (Bayer Crop Science), CEASE^(R) (BioWorks, inc.), RhizoVital® (ABITEP GmbH), FZB24® (ABITEP GmbH), Double Nickel 55™ (Certis U.S.A.), Amylo-X® (Certis U.S.A.). EcoGuard y Green Releaf (Novozyme Biologicals Inc.) son medios de protección de plantas a base de *B. licheniformis*. La cepa *B. pumilus* GB34 (Yield Shield, Bayer Crop Science) es componente activo de fungicidas biológicos. Otros biofungicidas de *B. Pumilus* registrados en OEP son SONATA (Bayer Crop Science), y GHA 180 (Premier Horticulture). Representantes de *B. Mojavensis* se describieron igualmente como fitoestimuladores y capaces de crecimiento endofítico (Bacon & Hinton 2002). Otros bacilos que no pertenecen al complejo de *B. Subtilis Species*, estimulan igualmente el crecimiento de las plantas y la salud de las plantas. *B. Firmus* GB126 (BioNem AgroGreenes, Israel ahora tomado por Bayer Crop Science) se utiliza como nematocida registrado en OEP para el control biológico de nematodos fitopatógenos. Un producto similar de *B. Firmus* Bmj WG se desarrolla actualmente por Certis U.S.A. Una cepa fitoestimuladora de *B. Megaterium* (Bucio-López et al. 2007) es la base del biofungicida BioArc. Representantes del complejo *Bacillus cereus Species*, p.ej. *B. Cereus* UW8 (Handelsman et al. 1990), *B. Thuringiensis* y *B. Weihestephanensis* se describieron igualmente como rizobacterias formadoras de endosporas y estimuladoras del crecimiento de plantas.

- 40 [0004] Estas bacterias empleadas para la fabricación de los bioproductos actuales se conocen como bacterias "mesófilas" y necesitan temperaturas de crecimiento de más de 15°C, para desplegar su efecto como fitoestimuladoras.

- Más del 85% de la superficie de la tierra está ocupada sin embargo por ecosistemas fríos, incluyendo regiones montañosas, zonas polares y oceánicas (Feller & Gerdaí 2003). En condiciones climáticas por debajo de 15°C, como son típicas para estas regiones, las bacterias mesófilas no pueden tener ningún efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas. Una alternativa atractiva proporciona el uso de microorganismos tolerantes al frío. Aunque el crecimiento óptimo se encuentra en la zona mesófila, estos microorganismos han desarrollado mecanismos que les confieren la capacidad de seguir creciendo a temperaturas bajas ($\leq 10^{\circ}$ - 0° C) (Kumar et al. 2010). Se ha señalado al respecto que el uso de bacterias tolerantes al frío y estimuladoras de crecimiento como inoculantes puede ser atractivo en particular para la producción agraria en zonas climáticas templadas con temperaturas bajas y estación de crecimiento corta (Mishra et al. 2012). Sin embargo, los ejemplos conocidos para el uso de bacterias tolerantes al frío en la producción de plantas se limitan a bacterias fitoestimuladoras gram negativas, como *Pseudomonas* (Katiyar & Goel 2003), *Burkholderia* (Barka et al. 2006), *Acinetobacter* (Gulati et al. 2009), *Azospirillum* (Kaushik et al. 2002), *Rhizobium* (Prevost et al. 2003), *Bradyrhizobium* (Zhang et al. 2003), *Pantoea* (Selvakumar et al. 2008a), *Serratia* (Selvakumar et al. 2008b).

- 55 Aunque en el pasado se describieron algunos tipos de bacilos psicrófilos o tolerantes al frío, como *Bacillus globisporus* (ahora *Sporosarcina globisporus*), *Bacillus insolitus* (ahora: *Psychrobacillus insolitus*), *Paenibacillus macquariensis*, *Bacillus marinus* (ahora: *Marinibacillus marinus*), *Bacillus psychrophilus* (ahora: *Sporosarcina psychrophilus*), *Bacillus psychrosaccharolyticus*, *Bacillus psychrotolerans* (ahora: *Psychrobacillus psychrotolerans*) y *Bacillus psychrodurans* (ahora: *Psychrobacillus psychrodurans*) (El-Rahman et al. 2002, Krishnamurti et al. 2010) falta información sobre cepas de bacilos tolerantes al frío con efecto fitoestimulante.

- 60 [0005] Se divulga en Yadav Ajar Nath et al. World journal of microbiology and Biotechnology, Rapid communications of Oxford, Oxford GB, Bd 31, N° 1, 5 de noviembre 2014, páginas 95-108, que la cepa *Bacillus simplex* IARI-L-118 (véase Tabla 2) tolerante al frío estimula el crecimiento de plantas.

[0006] En Yadav Ajar Nath et al. Journal of Bioscience and Bioengineering, Elsevier, Amsterdam, NL, Bd. 119, Nr. 6, 6. Januar 2015 (2015-01-06), páginas 683-693 se divulga que la cepa tolerante al frío *Bacillus simplex* IARI-R-3 (véase Tabla 2) fomenta el crecimiento de las plantas.

5 Objetivo y tarea de la invención

[0007] La invención tiene el objetivo de desarrollar un medio ecológico y sostenible para la estimulación del crecimiento de plantas también a temperaturas por debajo de 15°C. El medio debe emplearse en particular en regiones desfavorables climáticamente, p.ej. regiones montañosas y regiones cercanas a los polos del hemisferio septentrional y meridional.

Esencia de la invención

[0008] La tarea se resuelve según la reivindicación, las reivindicaciones dependientes 2 - 9 son variantes preferidas.

[0009] La esencia de la invención es el uso de cepas de bacilos tolerantes al frío como fitoestimuladores biológicos. Forma parte de la invención además la combinación de cepas de bacilos tolerantes al frío con bacterias mesófilas del orden Bacillales preferiblemente el género *Bacillus* y *Paenibacillus* y la combinación con ácidos húmicos. En la búsqueda de bacterias que estimulan el crecimiento de plantas, que muestran un claro crecimiento a temperaturas por debajo de 15°C se descubrió que bacilos que forman endosporas que proceden de zonas climáticas frías, p. ej. regiones montañosas de las tierras altas tibetanas (RP China) o las faldas de los Alpes (1400 m), también pueden crecer a temperaturas por debajo de 12°C de. Según sus secuencias 16S ARNr estas bacterias adaptadas al frío se asignaron a las especies *Bacillus simplex*, *Bacillus pumilus*, así como al *Bacillus subtilis* Species complex. Debido a sus secuencias *gyrA* y *cheA* los representantes de la especie compleja *B. Subtilis* se identificaron como pertenecientes a la especie *Bacillus atrophaeus*. El efecto estimulante de crecimiento de plantas se examinó con brotes de *Arabidopsis* en experimentos en macetas. Los representantes tolerantes al frío de las especies *Bacillus simplex*, *Bacillus atrophaeus* y *Bacillus pumilus* mostraron un claro efecto fitoestimulante (ejemplo 6). Las cepas *B. Simple* (ABI02S), *B. Atrophaeus* (ABI02A), y *B. Pumilus* (ABI02P1) se seleccionaron a título de ejemplo para las investigaciones adicionales. Sigue una descripción de estas cepas: *Bacillus atrophaeus* se distingue de *B. Subtilis* a través de su secuencia ADN y la formación de un pigmento oscuro (Nakamura 1989). Su capacidad para promover el crecimiento de plantas se documentó (Karlidag et al. 2010, Ertuk et al. 2011, Chan et al. 2013). La pertenencia taxonómica de la cepa ABI02A a *Bacillus atrophaeus* se determinó a través de la comparación de su 16S rRNA, *gyrA* y la secuencia parcial *cheA* (véase el ejemplo 1):

Tabla 1

Cebador	Fragmento de gen	Especie	Registro	BLAST
pRB1601	16SrRNA	<i>B. Atrophaeus</i> 1942	CP002207.1	451/453 (99%)
pRB1602	16SrRNA	<i>B. Atrophaeus</i> 1942	CP002207.1	470/473 (99%)
<i>gyrFW</i>	<i>gyrA</i>	<i>B. Atrophaeus</i> 1942	CP002207.1	863/872 (99%)
<i>gyrRV</i>	<i>gyrA</i>	<i>B. Atrophaeus</i> 1942	CP002207.1	857/865 (99%)
<i>cheAFW</i>	<i>cheA</i>	<i>B. Atrophaeus</i> 1942	CP002207.1	604/698 (87%)
<i>cheARV</i>	<i>cheA</i>	<i>B. Atrophaeus</i> 1942	CP002207.1	509/533 (95%)

[0010] ABI02A, ABI03 y ABI05 se caracterizan por los siguientes rasgos: las características fisiológicas de ABI02A, ABI03 y ABI05 se representan en el ejemplo de aplicación 3. Las cepas fomentan el crecimiento de plantas (véase el ejemplo de aplicación 1), suprimen el crecimiento de patógenos bacterianos *in vitro* (*Xanthomonas oryzae*) y fúngicos (*Sclerotinia sclerotorum*). ABI02A se depositó como cepa DSM 32019, ABI03 como cepa DSM 32285 y ABI05 como cepa DSM 24918 en DSMZ, Braunschweig. *Bacillus atrophaeus* ya se había descrito como bacteria que fomenta el crecimiento de plantas (Bai et al. 2002). Sin embargo, hasta la fecha no se ha reportado sobre un efecto fitoestimulador a temperaturas bajas como en el caso de *B. simplex*.

[0011] *Bacillus simplex* ABI02S y ABI12 ya crecen a temperaturas de 4°C. El máximo de crecimiento es 45°C. Las características fisiológicas de la cepa se representan en el ejemplo de realización 4. Se identificaron actualmente representantes de la especie *Bacillus simplex* como bacterias fitoestimulantes (Schwartz et al. 2013). No se informó hasta ahora sobre un efecto estimulante del crecimiento a temperaturas bajas. La cepa ABI02S se depositó como cepa DSM 32020 y la cepa ABI12 como DSM 32283 en DSMZ Braunschweig, Alemania.

[0012] La invención se explica más detalladamente a continuación con ejemplos.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1: Aislamiento de bacilos potencialmente tolerantes al frío

[0013] Se aislaron cepas de bacilos tolerantes al frío p.ej. de las altas tierras de la provincia autónoma Tibet y las laderas de los Alpes, altura 1400 m. Las montañas tibetanas están a una altura media de 4000 m y presentan una temperatura media anual de 10°C. Típico de esta región son las grandes diferencias de temperatura entre el día y la noche. Las muestras se tomaron o bien directamente de las raíces de las plantas o de la tierra adherente:

2.5 g de material de muestra fueron resuspendidos bajo agitación continua en 25 g de agua destilada durante 2 horas. A continuación, la suspensión se incubó durante una hora a 80° C para matar células vegetativas. 10 ml de la suspensión se añadieron a 40 ml de un medio de sal mineral y se incubó durante una semana a 20° C hasta presentar células vegetativas en forma de varillas con control microscópico. A continuación, la suspensión se diluyó 10^{-1} hasta 10^{-5} y se preparó sobre placas de mínimo agar. Las placas fueron incubadas a 20°C y las colonias formadas se separaron sobre agar nutriente o LB-agar.

[0014] La clasificación taxonómica de los aislados se llevó a cabo a través de la determinación de su secuencia de 16S rRNA, así como en el caso de cepas de la familia de *B. Subtilis* por su secuencia *gyrA* y *cheA*. El aislamiento de ADN cromosómico de células *Bacillus* que crecen exponencialmente, la secuenciación y amplificación de ADN se realizó según Idriss et al. 2002. Así se utilizaron los siguientes cebadores para la amplificación de las secuencias de ADN mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR):

pRB1601: 5'GGATCCTAATACATGCAAGTCGAGCGG
 pRB1602: 5'GGATCCACGTATTACCGCGGCTGCTGGC
 gyrFW: 5' CAGTCAGGAAATGCGTACGTC
 gyrRV: 5' CAAGGTAATGCTCCAGGCATT
 cheAFW: 5' GAAACGGAKAYATGGMAGTBACMTCARACTGGCTG
 cheARV: 5' TGCTCRAGACGCCCGCGWCAATGACAAGCTCTTC

[0015] En la tabla 2 se presenta una vista en conjunto de los aislados obtenidos y su clasificación taxonómica sobre la base de su secuencia 16S ARNr.

Tabla 2: Secuencias de ADN de aislados de *Bacillus* adaptados al frío de las altas tierras tibetanas y laderas de los Alpes (altura 1400m)

Cepa	lugar del aislamiento	Similitud con 16SrRNA	PGP ¹	Crecimiento
ABI02S	Raíces de hierbas, montaña Sejila, Niingtri, Tibet	<i>B. simplex</i> 338/358(94%) (pRB1601) <i>B. simplex</i> 403/464(87%) (pRB1602)	+	04 - 45°C
ABI02A	Raíces de hierbas, Niingtri, Tibet	<i>B. Atropheus</i> 450/458 (98%) (pRB1601) <i>B. atrophaeus</i> 572/590(97%) (gyrFW) <i>B. atrophaeus</i> 733/757(97%) (gyrREV)	+	10 - 45°C
ABI02P1	Lago Nam, Lhasa, Tibet	<i>B. Pumilus</i> 457/468(98%) (pRB1602)	+	10 - 50°C
ABI03	Raíces de hierbas, laderas de los Alpes, altura 1400 m	<i>B. Atropheus</i> 446/465 (96%) (pRB1601) 474/475 (99%) <i>B. atrophaeus</i> 608/625 (97%) (gyrFW) (pRB1602)	+	10-45°C
ABI05	Raíces de hierbas, laderas de los Alpes, altura 1400 m	<i>Bacillus atrophaeus</i> 450/458 (98%) (pRB1601)	+	10-45°C

		447/478(94%) (pRB1601)		
ABI12	Raíces de hierbas, laderas de los Alpes, altura 1400 m)	<i>B. Simple</i> 450/472 (95%) (pRB1601) 461/472(98%) (pRB1602)	+	04-45°C
PGP = efecto estimulante del crecimiento.				

Ejemplo 2: Característica de crecimiento de bacterias tolerantes al frío

[0016] Los ensayos de crecimiento se realizaron en medio-LB a temperaturas diferentes. La tabla 2 da una visión en conjunto de los comportamientos de crecimiento de las cepas tolerantes al frío. El límite superior para el crecimiento de *B. simplex* ABI02S y ABI12, así como *B. Atrophaeus* ABI02A ABI03 y ABI05 estaba en 45°C, mientras que *B. Pumilus* ABI02P1 también crece a 50°C. *B. Atrophaeus* y mesophile *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 fueron cultivados a 20°C y 25°. A estas temperaturas la cepa tolerante al frío *B. atrophaeus* mostró una velocidad de crecimiento más alta que FZB42 (Fig.1).

[0017] *B. Atrophaeus* ABI02A se cultivó a temperaturas diferentes entre 20° hasta 50°C (figura. 1). El crecimiento óptimo se determinó a 33 - 35°C. A 30°C se registró una ligera ralentización de la velocidad del crecimiento. Por debajo de 30° C (25°C y 20°C) se reforzó más este efecto. A 40° C se ralentizó el crecimiento de forma significativa. A 50°C se observó además una lisis de las células. Estos resultados confirman que *B. Atrophaeus* ABI02A es una cepa mesófila, pero al mismo tiempo tolerante al frío, que a pesar de alcanzar el crecimiento óptimo a 33 - 35° C, también sigue creciendo a temperaturas bajas.

[0018] Las características fisiológicas de las cepas tolerantes al frío *Bacillus atrophaeus* y *Bacillus simplex* se describen detalladamente en los ejemplos 3 y 4 que siguen.

Ejemplo 3: Características fisiológicas de *Bacillus atrophaeus*

[0019]

Tabla 3: Características fisiológicas de *Bacillus atrophaeus* ABI02A, ABI03 y ABI05

Utilización de azúcares	
Glucosa	+
Sacarosa	+
Lactosa	-
Maltosa	±
Fructosa	+
Voges Proskauer	+
Formación de exoenzima	
Lipasa (tributirina)	+
Amilasa (almidón)	+
Proteasa (caseína)	+
Keratinasa (queratina)	-
Celulasa (celulosa)	-
Test de yema (lecitinasa)	-
Formación de pigmentos	+
Inhibición a través de los antibióticos (test de hojas)	
CM5 Cloramfenicol	+
KM5 canamicina	+++
ER1 eritromicina	++
Li25 lincomicina	+
AP100 ampicilina	++
RIF 25* rifampicina	+++
SPEC 100 espectinomicina	++
Bleo1 bleomicina	+

[0020] Al contrario que *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 *Bacillus atrophaeus* ABI02A, ABI03 y ABI05 crecen también a 10°C. A 20°C y 25°C presenta ABI02A una velocidad de crecimiento más alta que FZB42. En la prueba de difusión de agar ABI02A, ABI03 y ABI05 inhiben *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, así como los fitopatógenos *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

Ejemplo 4: Características fisiológicas de *Bacillus simplex*

[0021] B. Simple ABI02S y ABI12 tienen las siguientes características fisiológicas (tabla 4).

Tabla 4: Características fisiológicas de ABI02S y ABI12

Forma de células	barritas, 0.9-1.0 X 3.0->4.0 m
Endosporas	elipsoide
célula primaria de espora	no hinchada
Uso de ácido cítrico	+
Uso de ácido propiónico	-
catalasa	+
Nitrato reductasa (NO ₂ de NO ₃)	+
Fenilalanina desaminasa	-
Arginina dihidrolasa	-
formación de indol	-
Crecimiento anaeróbico	-
Voges Proskaueres (formación de acetoina)	-
pH en medio de Voges Proskauer	6.2
Lecitinasa (reacción de yema)	-
Crecimiento a 50°C	-
Crecimiento a 45°C	(+)
Crecimiento a 40°C	+
Crecimiento en pH 5.7	-
Crecimiento a 2% de NaCl	+
Crecimiento a 5% NaCl	-
Crecimiento a 7% NaCl	-
Crecimiento a 10% NaCl	-
Formación de ácido de D-glucosa	+
Formación de ácido de L-Arabinosa	+
Formación de ácido de D-silosa	+
Formación de ácido de D-manita	+
Formación de ácido de D-fructosa	+
Gas de D-glucosa	-
Hidrólisis de almidón	+
Hidrólisis de gelatina	+
Hidrólisis de caseína	+
Hidrólisis de Tween 80	+
Hidrólisis de Aesculina	(+)

[0022] Las características fisiológicas confirman la clasificación en *Bacillus simplex* en gran parte, pero no todas las características son típicas para *Bacillus simplex*. El análisis de los ácidos grasos celulares muestra un perfil típico del género *Bacillus*. *B. Simplex* ABI02S y ABI12 crecen en el medio LB a 10°C, una temperatura en la que *B. amyloliquefaciens* FZB42 no puede crecer más. En otros experimentos se mostró que estas dos cepas *B. simplex* también pueden crecer a una temperatura de 4°C. El crecimiento óptimo se alcanzó a 45°C.

[0023] En la prueba de difusión de agar *B. simplex* tiene un efecto supresivo sobre los hongos patógenos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*, así como sobre *Xanthomonas oryzae*.

Ejemplo 5: Fermentación de *Bacillus atrophaeus* ABI02A y producción de una suspensión de esporas

[0024] A modo de ejemplo se realiza aquí la descripción para la producción de una suspensión de esporas para *B. atrophaeus* ABI02A. La fermentación de *B. atrophaeus* se realizó en un fermentador de remover convencional con un volumen de preparación de un medio de 1.4 L realizado bajo las condiciones siguientes:

Medio: medio completo con fuente N y C orgánica: harina de soja o agua de maíz, leche en polvo desnatada, extracto de levadura, sales

Esterilización del medio: 20 min. a 121 °C

Agente antiespumante: 200 ml

Velocidad de remoción: 700 r.p.m.

Temperatura de fermentación: 33 °C

Ventilación: 0,7 L/min (40% O₂ saturación)

pH: con NaOH ajustado a 6,9

[0025] Después de 16 h se consiguió una densidad celular máxima de 1×10^{10} células/ml. Se siguió con el cultivo para alcanzar una esporulación a ser posible completa de las células vegetativas. Después de 40 h se consiguió un título de esporas de 3×10^9 . Las esporas fueron centrifugadas y se absorbieron en 10% del volumen del medio original bajo adición de propanodiol (concentración final: 5%).

Ejemplo 6: Fomento de la germinación de semillas de maíz a través de bacilos tolerantes al frío

[0026] 10 ml de una suspensión de esporas de *Bacillus* se mezclaron con 30 ml de 1% de carboximetil celulosa (CMC), que servía como adhesivo para una mejor adherencia de las esporas a la superficie del maíz. La concentración final de las esporas de *Bacillus* en la suspensión era $1 \times 10^7, 1 \times 10^6, 1 \times 10^5, 1 \times 10^4$ cfu/ml. Las semillas de maíz se desinfectaron en la superficie con 75% etanol, 5% NaClO durante 5 min., antes de tratarse durante 5 minutos con las diluciones diferentes de las suspensiones de esporas de *Bacillus*. Respectivamente 3x 10 semillas de una concentración de esporas se colocaron en una plaquita petri con papel de filtro húmedo. La determinación de la velocidad de germinación se realizó después de una semana con una incubación a oscuras a 30°C. Como control se usaron semillas de maíz, que se habían tratado con un medio nutriente estéril + CMC. Se constató un aumento claro de la velocidad de germinación con la aplicación de *B. simplex* y *B. Atrophaeus* (figura. 3).

Ejemplo 7: Experimentos de crecimiento con *Arabidopsis thaliana*

[0027] Las raíces de una germinación de 6 días de *Arabidopsis thaliana* se incubaron durante 5 min. en una suspensión de esporas (10^5 esporas/ml) de bacilos adaptados al frío. Para comparar se realizó también un tratamiento con una suspensión de esporas de FZB42, que se conoce por su efecto estimulante del crecimiento. A continuación, las germinaciones tratadas se transfirieron a agar (1%) de Skoog-Murashige (MS). Las placas cuadradas (12 x 12 cm) se cerraron con parafilm y se mantuvieron durante tres semanas a 23°C (8/16 h ritmo de luz-oscuridad). A continuación, se realizó la determinación del peso en fresco de las plantas *Arabidopsis*. Representantes tolerantes al frío de las especies *Bacillus Simplex*, *Bacillus atrophaeus*, y *Bacillus pumilus* mostraron un claro efecto fitoestimulante (figura. 4, figura 5).

Ejemplo 8: Ensayo en maceta con plantas de patatas en el invernadero

[0028] El ensayo se realizó en el punto de examen para investigación sobre las patatas Agro Nord, D-18190 Groß-Lüsewitz como ensayo en maceta del 11.07. - 11.10. 2011. Los tubérculos de las patatas empleadas -planta de ensayo de la especie "Burana", tenían síntomas de infestación *Rhizoctonia solani* ("costra negra", "viruela"). A los tubérculos se les aplicó antes del cultivo una suspensión de poros diluida de las formulaciones de *Bacillus*. La plantación se realizó después de secar los tubérculos. La recolección se realizó tres meses después de la plantación. La valoración de las La valoración de las plantas de patatas y - tubérculos mostró una reducción de la plaga-*Rhizoctonia* en comparación para el control del 40 -45 % en las variantes tratadas con *Bacillus pumilus* ABI02P1 y *Bacillus simplex* ABI02S. Al mismo tiempo se consiguió un aumento de la cosecha del 95% (ABI02P1) o 57% (ABI02S) (figura. 6). Los resultados logrados con el uso de las cepas tolerantes al frío se pueden comparar por tanto con los resultados que fueron conseguidos con el uso de FZB42. Hay que tener en cuenta que el ensayo se realizó en verano y a principios de otoño, donde las temperaturas medias diurnas en ningún caso son óptimas para un uso de bacterias tolerantes al frío.

Ejemplo 9: Ensayo in situ con patatas con *B. pumilus* y *B. simplex*

[0029] Para la realización del ensayo véase el ejemplo siguiente. El recubrimiento de los tubérculos de patata con la bacteria mesófila FZB42 estimulante del crecimiento condujo a un aumento de la cosecha frente al control no tratado de 14% (cantidades utilizadas: 1 L de suspensión de esporas/ha). El aumento de cosecha a través del recubrimiento con *Bacillus pumilus* ABI02P1 tolerante al frío (cantidades utilizadas: 1L suspensión de esporas/ha) fue del 6% frente al control no tratado. No hubo aumento de la cosecha con el uso de una suspensión de esporas de *Bacillus simplex* ABI02S tolerante al frío (figura. 7). En la interpretación hay que tener en cuenta que el ensayo se realizó desde mayo hasta septiembre, donde las temperaturas medias diurnas en ningún caso son óptimas para un uso de bacterias tolerantes al frío.

Ejemplo 10: Ensayo in situ: El uso de *Bacillus atrophaeus* (ABI02A) conduce a un aumento de la cosecha de patatas

[0030] El ensayo in situ se llevó a cabo por Punto de Examen para investigación sobre la patata, 18190 Groß Lüsewitz, en Sanitz (Mecklenburg-Vorpommern). Fruto anterior: maíz. Tipo/número de suelo IS / 35, Abono: 140 KG N. Se usó la variedad de patata "Verdi" (medio tardía - tardía). La aplicación de la suspensión de esporas se realizó a través de pulverización (pulverización de parcelas PL1, tipo de boquillas: boquillas de chorro plano TJ 800 15). Para ello las suspensiones de esporas empleadas (2×10^{13} esporas/L) se diluyeron en 300 L de agua antes del uso. El "recubrimiento" se realizó el 05.05.2013 en el almacén. Después de secar los tubérculos se realizó la siembra al 06.05.2013 a una temperatura del suelo de 15.8°C.

[0031] Condiciones climáticas: el mes mayo era tenía 1,2 °C de más y 42,5 mm (79%) de más en humedad. De esta manera se daban buenas condiciones de partida para las patatas. El mes junio se correspondió en total a los valores medios de largo plazo. Las precipitaciones caían, pero sobre todo en forma de precipitaciones más fuertes (13. = 26 mm; 20. = 14,3 mm; 25. = 13,5 mm) aprox. 74% de la suma de precipitaciones del mes. La única precipitación digna de mencionar cayó en julio el 3 de julio con 28,4 mm, luego tuvo lugar un periodo seco muy largo, que continuó hasta finales de agosto combinado con temperaturas demasiado altas.

[0032] El ensayo se vio afectado por la presencia del hongo fitopatógeno, que se encuentra en el suelo *Rhizoctonia solani*. *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn es la forma anamórfica de *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk (teleomórfica), de un basidiomiceto de la familia de los agaricales. Produce pérdidas de cosecha (daños de emergencia, necrosis en tallos y estolones, muchos tubérculos pequeños o deformados) así como pérdidas de calidad (viruelas de patatas, síntomas de "núcleo seco"). Se determinó el efecto antagonista de *B. atrophaeus*, FZB42 y el fungicida químico Monceren Pro (figura. 9).

[0033] El uso de una suspensión de esporas (2×10^{10} cfu/ml) de *Bacillus atrophaeus* (ABI02A) en una concentración de 1,0 L/ha conduce a una reducción de los síntomas de la enfermedad de "costra negra" (núcleo seco) y un aumento de la cosecha del 10%. De tal modo el efecto de este fitoestimulante biológico se corresponde con el del fungicida químico Monceren Pro (concentración: 1,5 L/L).

Ejemplo 11: Ensayo en situ: Confirmación: El uso de *Bacillus atrophaeus* (ABI02A) conduce a un aumento de la cosecha de patatas y a reducir la infección a través de *Rhizoctonia solani* (Kürzinger 2014)

[0034] En una segunda serie de ensayos (Kürzinger 2014) se confirmaron los resultados del ejemplo 10. El efecto de las suspensiones de esporas *B. atrophaeus* ABI02A era comparable con del fungicida químico Monceren (figura. 11 y figura 12).

Leyenda a las ilustraciones

[0035]

Fig. 1: comparación del crecimiento de *B. atrophaeus* ABI02A y la cepa mesófila FZB42 a 20°C y 25°C.

Fig. 2: Contraste de fases: *Bacillus simplex* ABI02S. Las endosporas distales ovales se pueden ver bien en las células madre de las esporas.

Fig. 3: germinación mejorada de *Zea mays* después de la incubación con *B. simplex* ABI02A (fila inferior) en comparación con el control.

Fig. 4: Estimulación del crecimiento (en peso en fresco en g) de *Arabidopsis thaliana* mediante las suspensiones de esporas de cepas *Bacillus* tolerantes al frío. Para comparación: Efecto de *B. amyloliquefaciens* FZB42. Control: sin inoculación de esporas de *Bacillus*. Las columnas representan el valor medio de tres ensayos independientes.

Fig. 5: estimulación del crecimiento de raíces de *Arabidopsis thaliana* a través del *B. atrophaeus* ABI02A (de izquierda arriba), y *B. simplex* ABI02S (arriba a la derecha). CK= control sin inoculación con bacterias

Fig. 6: ensayo en maceta con plantas de patatas (Kürzinger GmbH 2011). Comparación de la cosecha de tubérculos para el control no tratado. Aplicación de 1 L de suspensión de esporas por ha de FZB42 y *B. Pumilus* ABI02P1. La

suspensión de esporas de *B. simplex* ABI02S mostró una concentración más baja en el factor 5 y se aplicó en una cantidad correspondientemente más alta (5L/ha) a las plantas de patatas.

Fig. 7: aplicación de *B. Pumilus* ABI02P1 (1L/ha) y *B. simplex* ABI02S a las plantas de patatas. Aplicación única a través del recubrimiento con la suspensión de esporas (FZB42 y *Bacillus pumilus* ABI02P1: 2×10^{10} cfu/ml, *Bacillus simplex* ABI02S: 4×10^9 cfu/ml) antes de la plantación.

Fig. 8: plano del sitio aleatorizado: 1 (control, ningún aditivo), 2 fungicida químico (Monceren Pro, 1,5 L/L), 3 FZB42 (0,5 L/L), 4 FZB42 (1,0 L/L), 5 FZB42 ($2 \times 0,5$ L/L), 8 ABI02A (1 L/ha). Para cada variante se realizaron cuatro repeticiones. El tamaño de las parcelas era: 6,90 m x 3,00 m = 20,70 m², espacio entre las filas: 75 cm, espacio entre los tubérculos en la fila: 30 cm. "recubrimiento" de los tubérculos en el almacén: 0.5.2013, Fecha de plantación: 06.05.2013, fecha de afloramiento: 02.06.2013, cosecha 30.08.2013, preparación: 07.10.2013.

Fig. 9: reducción de los síntomas de la enfermedad ("costra negra") durante la aplicación de fungicidas químicos (Monceren Pro) y estimuladores biológicos. El uso de ABI02A '*Bacillus atrophaeus*' (1,0 L/L) conduce a una reducción clara de los síntomas de la enfermedad.

Fig. 10: Uso de Monceren (fungicida químico) y suspensiones de esporas de FZB42 y ABI02A (*Bacillus atrophaeus*) en patatas de la especie Verdi (Sanitz, Kürzinger 2013) conduce a un aumento de la cosecha (%). Cantidades de utilización: 1.0 = 1.0 kg/ha.

Fig. 11: la aplicación de *Bacillus atrophaeus* ABI02A conduce a un claro aumento de la cosecha, que es comparable al del fungicida químico Monceren. Con la cepa mesófila FZB42 se consiguió un aumento de cosecha algo más alto. Cantidades de utilización de los fungicidas: 1,5 L/ha (Monceren), 0,5 1,0 L/ha así como $2 \times 0,5$ L/ha en suspensiones de esporas de FZB42 y ABI02A.

Fig. 12: al mismo tiempo se redujo la infestación por esclerocios (*Rhizoctonia solani*) durante la aplicación de *Bacillus atrophaeus* ABI02A en comparación con el control no tratado. La representación de todas las clases de infestaciones (% infestación por esclerocios) durante el uso de Monceren, FZB42 y *B. atrophaeus*.

B. atrophaeus conduce a una reducción de la infestación por esclerocios en comparación con el control no tratado. Clases de infestaciones: 0, <1, 1,1-5, 5,1-10, 10,1-15 y >15.

Lista de referencias

[0036]

- 10 - Abd El-Rahman, H.A., Fritze, D., Cathrin Sproer, C., Claus, D. 2002. Two novel psychrotolerant species, *Bacillus psychrotolerans* sp. nov. and *Bacillus psychrodurans* sp. nov., which contain ornithine in their cell walls. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 2127–2133
- Bai, Y., D'Aoust, F., Smith, D.L., Driscoll, B.T. 2002. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. Can. J. Microbiol. 48, 230–238 (2002)
- 15 - Barka, A.E., Nowk, J., Clement, C. 2006. Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with plant growth promoting rhizobacteria *Burkholderia phytofermans* strain PsJN. Appl Environ Microbiol 72:7246–7252
- Benhamou, N., Kloepper, J.W., Quadt-Hallman, A., Tuzun, S. 1996. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. Plant Physiol. 112, 919-929
- 20 - Borriess, R. 2011. Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents, In: Maheshwari DK (ed). Bacteria in agrobiolgy: plant growth responses. Springer, Germany, pp 41-76
- Chan, W.Y., Dietel, K., Lapa, S. et al. 2013. Draft Genome Sequence of *Bacillus atrophaeus* UCMB-5137, a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium. Genome Announcement 1, e00233-13
- Erturk, Y., Cakmakci, R., Omur Duyar, O., Turan, M. 2011. The Effects of Plant Growth Promotion Rhizobacteria on Vegetative Growth and Leaf Nutrient Contents of Hazelnut Seedlings (Turkish hazelnut cv, Tombul and Sivri). Int. J. Soil Science, 6, 188-198.
- 25 - Feller, G. & Gerday C. 2003. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. Nature Reviews Microbiology 1, 200-208
- Gulati, A., Vyas, P., Rai, P., Kasana, R.C. 2009. Plant growth promoting and rhizosphere-competent *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 from the cold deserts of the Himalayas. Curr. Microbiol. 58, 371–377
- 30 - Handelsman, J., Raffel, S., Mester, E.H. et al. 1990. Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus-cereus* UW85. Appl. Env. Microbiol. 56, 713-718
- Katiyar, V., Goel, R. 2003. Solubilization of inorganic phosphate and plant growth promotion by cold tolerant mutants of *Pseudomonas fluorescens*. Microbiol Res 158, 163–168
- 35 - Idriss, E.E., Makarewicz, O., Farouk, A. et al. 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant -growth-promoting effect. Microbiology 148, 2097-2109.
- Kaushik, R., Saxena, A.K., Tilak, K.V.B.R. 2002. Can *Azospirillum* strains capable of growing at a suboptimal temperature perform better in field-grown-wheat rhizosphere. Biol Fertil Soils 35, 92–95
- Karlidag, H., Esitken, A., Yildirim, E. et al. 2010. Effects of plant growth promoting bacteria on yield, growth, leaf water content, membrane permeability, and ionic composition of strawberry under saline conditions. J. Plant Nutr. 34, 34-45
- 40 - Krishnamurti, S., Ruckmani, A., Pukall, R., Chakrabarti, T. 2010. *Psychrobacillus* gen. nov. and proposal for reclassification of *Bacillus insolitus* Larkin & Stokes, 1967, - *B. psychrotolerans* Abd-El Rahman et al., 2002 and *B. psychrodurans* Abd-El Rahman et al., 2002 as *Psychrobacillus insolitus* comb. nov., *Psychrobacillus psychrotolerans* comb. nov. and *Psychrobacillus psychrodurans* comb. nov. Syst. Appl. Microbiol. 33, 367-373
- 45 - Kumar, P.K., Joshi, P., Bisht, J. K. et al. 2011. Cold-Tolerant Agriculturally Important Microorganisms. In: Plant Growth and Health Promoting Bacteria. Microbiology Monographs. Volume 18, 2011, pp 273-296.
- López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J.C., Hernández-Calderón, E. et al. 2007. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Plant Microbe Interact. 20, 207–217
- 50 - Mishra, P. K., Bisht, S.C., Bisht, J. K., Bhatt, J.C. 2012. Cold-tolerant PGPRs as bioinoculants for stress management. In: Maheshwari DK (ed). Bacteria in agrobiolgy: Stress Management, DOI 10.1007/978-3-642-23465-1_6, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Nakamura, L. K. 1989. Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 39, 295–300.
- 55 - Prevost D, Drouin P, Laberge S, et al. 2003. Cold-adapted rhizobia for nitrogen fixation in temperate regions. Can. J. Bot. 81, 1153–1161
- Schwartz, A. R., Ortiz, I., Maymon, M. et al. 2013. *Bacillus simplex* - A little known PGPB with anti-fungal activity -alters pea legume root architecture and nodule morphology when coinoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae. Agronomy 3, 595-620
- 60 - Selvakumar, G., Kundu, S., Joshi, P. et al. 2008a. Characterization of a cold-tolerant plant growth-promoting bacterium *Pantoea dispersa* 1A isolated from a sub-alpine soil in the North Western Indian Himalayas. World J. Microbiol. Biotechnol. 24, 955–960
- Selvakumar, G., Mohan, M., Kundu, S. et al. 2008b. Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbita pepo*). Lett. Appl. Microbiol. 46:171–175
- 65

- Zhang, H., Prithiviraj, B., Charles, T.C. et al. 2003. Low temperature tolerant *Bradyrhizobium japonicum* strains allowing improved nodulation and nitrogen fixation of soybean in a short season (cool spring) area. Eur. J. Agron. 19,205–213

5 LISTADO DE SECUENCIAS
[0037]

<110> ABiTEP GmbH

10 <120> Selección y uso de cepas de bacilos tolerantes al frío como fitoestimuladores biológicos

<130> Abitep 2 EP

15 <140> EP16727286.3

<141> 2016-04-13

<160> 6

20 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

25 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer pRB1601

30

<220>

<221> misc_feature

<223> pRB1601

35

<400> 1

ggatcctaatacatgcaagtcgagcgg

27

<210> 2

40 <211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

45 <223> Primer pRB1602

<220>

<221> misc_feature

50 <223> pRB1602

<400> 2

ggatccacgtattaccgcggctgctggc

28

55

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

60

<220>

<223> Primer gyrFW

65

<220>

<221> misc_feature

	<223> gyrFW	
	<400> 3	
5	cagtcaggaa atgcgtacgt c	21
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> DNA	
10	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Primer gyrRV	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> gyrRV	
20	<400> 4	
	caaggtaatg ctccaggcat t	21
	<210> 5	
25	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
30	<223> Primer cheAFW	
	<220>	
	<221> misc_feature	
35	<223> cheAFW	
	<400> 5	
	gaaacggaka yatggmagtb acmtcaract ggctg	35
40	<210> 6	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
45	<220>	
	<223> Primer cheARV	
50	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> cheARV	
	<400> 6	
55	tgctcragac gcccgcgwc aatgacaagc tcttc	35

REIVINDICACIONES

1. Composición para estimular el crecimiento de plantas de cultivo, **caracterizada por el hecho de que** contiene la cepa tolerante al frío *Bacillus atrophaeus* ABI02A DSM 32019 o ABI03 DSM 32285 o ABI05 DSM 24918 o una mezcla de dos o tres de estas cepas.
5
2. Composición para estimular el crecimiento de plantas de cultivo, **caracterizada por el hecho de que** contiene una cepa tolerante al frío *Bacillus simplex* ABI02S DSM 32020 o ABI12 DSM 32283 o una mezcla de los dos.
- 10 3. Composición según la reivindicación 1-2, **caracterizada por el hecho de que** contiene una cepa o una mezcla de las cepas tolerantes al frío *Bacillus atrophaeus* ABI02A DSM 32019 o ABI03 DSM 32285 o ABI05 DSM 24918 y una cepa o una mezcla de las cepas tolerantes al frío *Bacillus simplex* ABI02S DSM 32020 o ABI12 DSM 32283.
- 15 4. Composición según la reivindicación 1 - 3, **caracterizada por el hecho de que** se formula como suspensión de esporas líquida, preferiblemente con al menos 2×10^9 esporas/ml, de manera especialmente preferida con al menos 1×10^{10} esporas/ml.
- 20 5. Composición según la reivindicación 1 - 3, **caracterizada por el hecho de que** se usa para el tratamiento de semillas o como preparación para el riego durante la plantación, o se utiliza como agente de pulverización de hojas en un momento posterior.
- 25 6. Composición según la reivindicación 1 - 3, **caracterizada por el hecho de que** se formula como preparación seca ("revestimiento seco"), preferiblemente con al menos 5×10^9 esporas/ml, de manera especialmente preferida con al menos 2×10^{10} esporas/ml.
7. Composición según la reivindicación 1 - 3, **caracterizada por el hecho de que** además de una o varias cepas de *Bacillus* tolerantes al frío contiene ácido húmico.
- 30 8. Uso de las composiciones según la reivindicación 1 - 3 junto con bacterias mesófilas que fomentan el crecimiento de las plantas del género *Bacillales*, preferiblemente del género *Bacillus* o *Paenibacillus*, de manera especialmente preferida del tipo *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum*.
- 35 9. Uso de las composiciones según la reivindicación 1 - 3 junto con el hongo estimulante del crecimiento de las plantas *Trichoderma* sp.

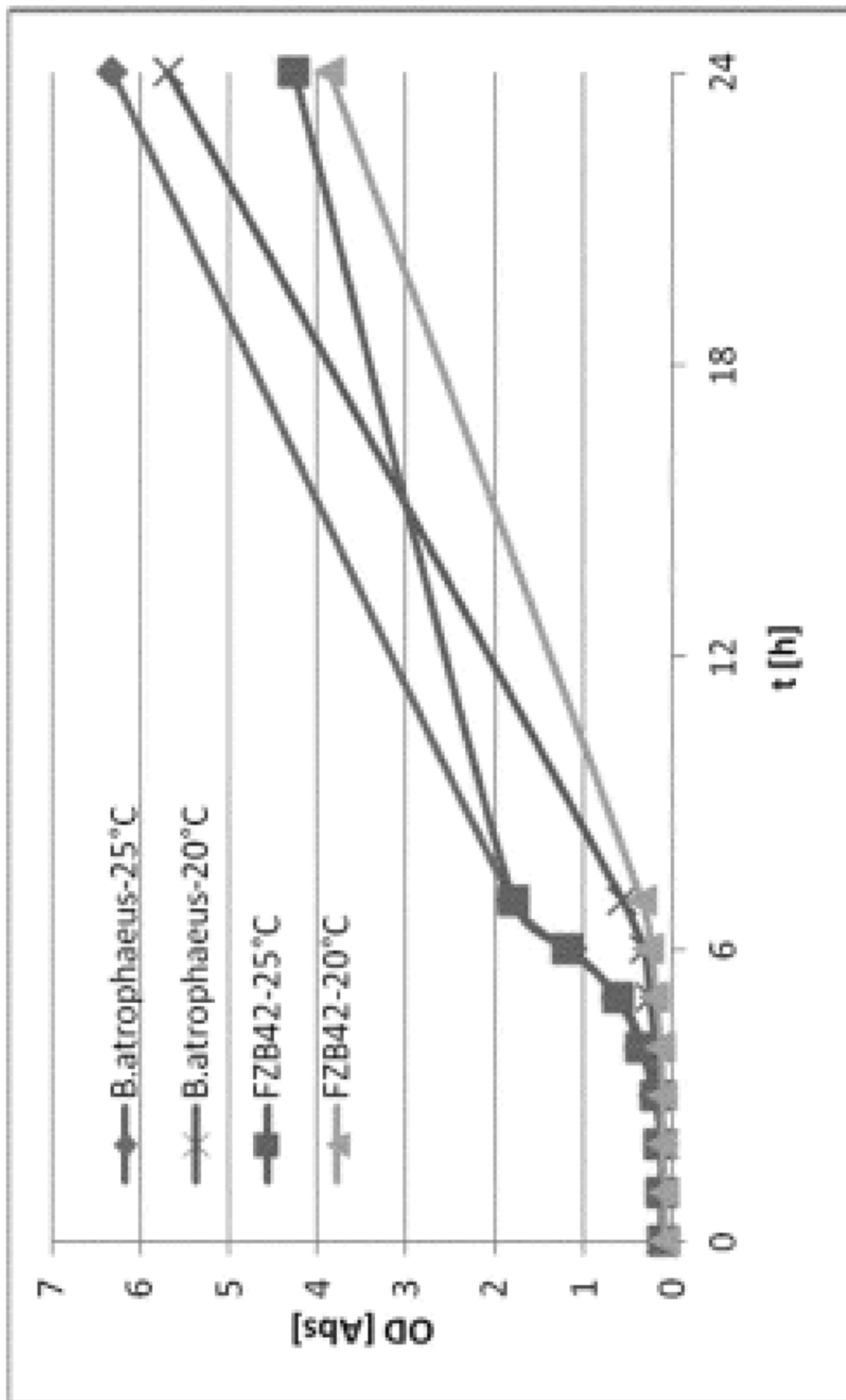


Figura 1

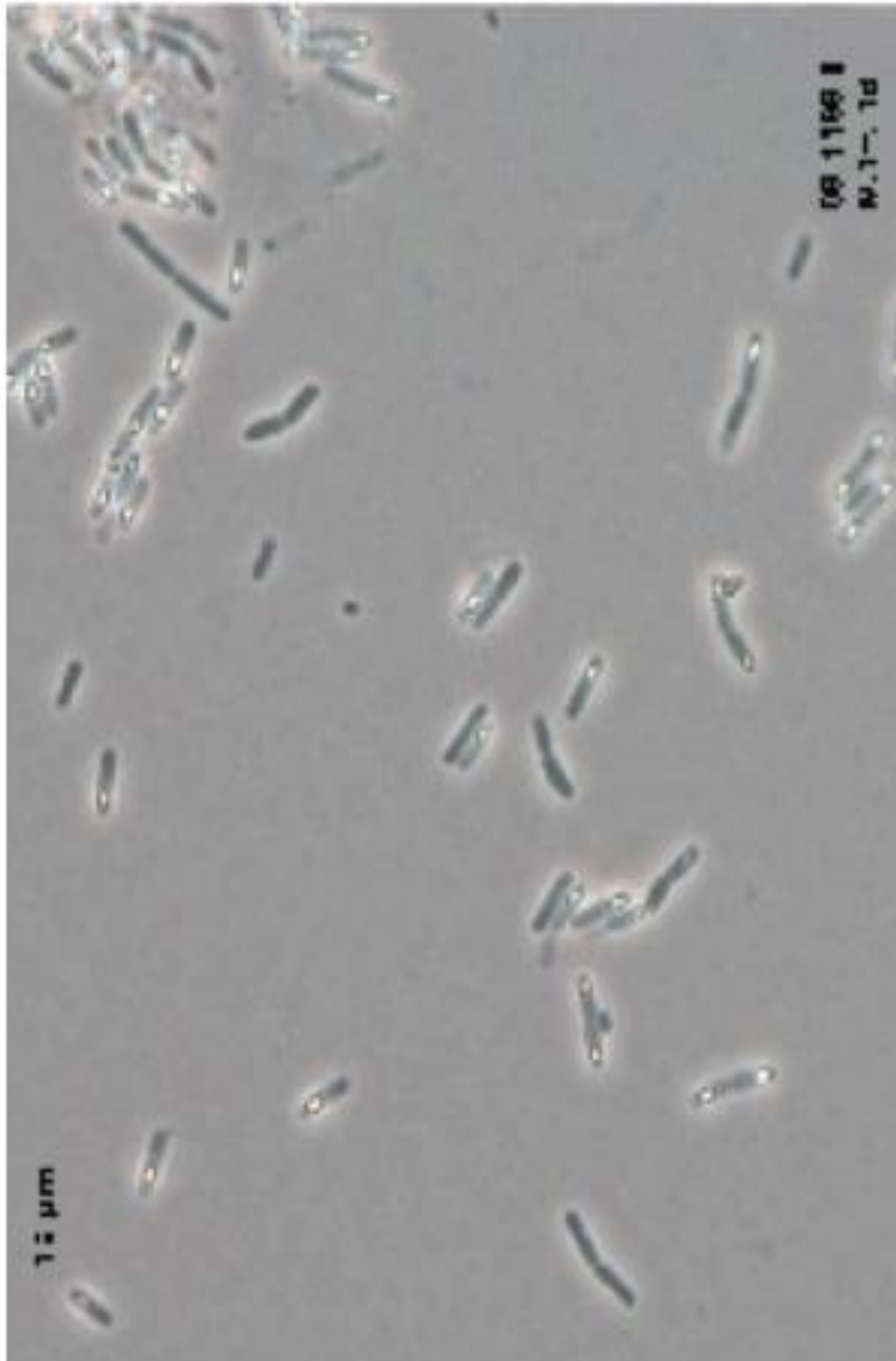


Figura 2



Figura 3

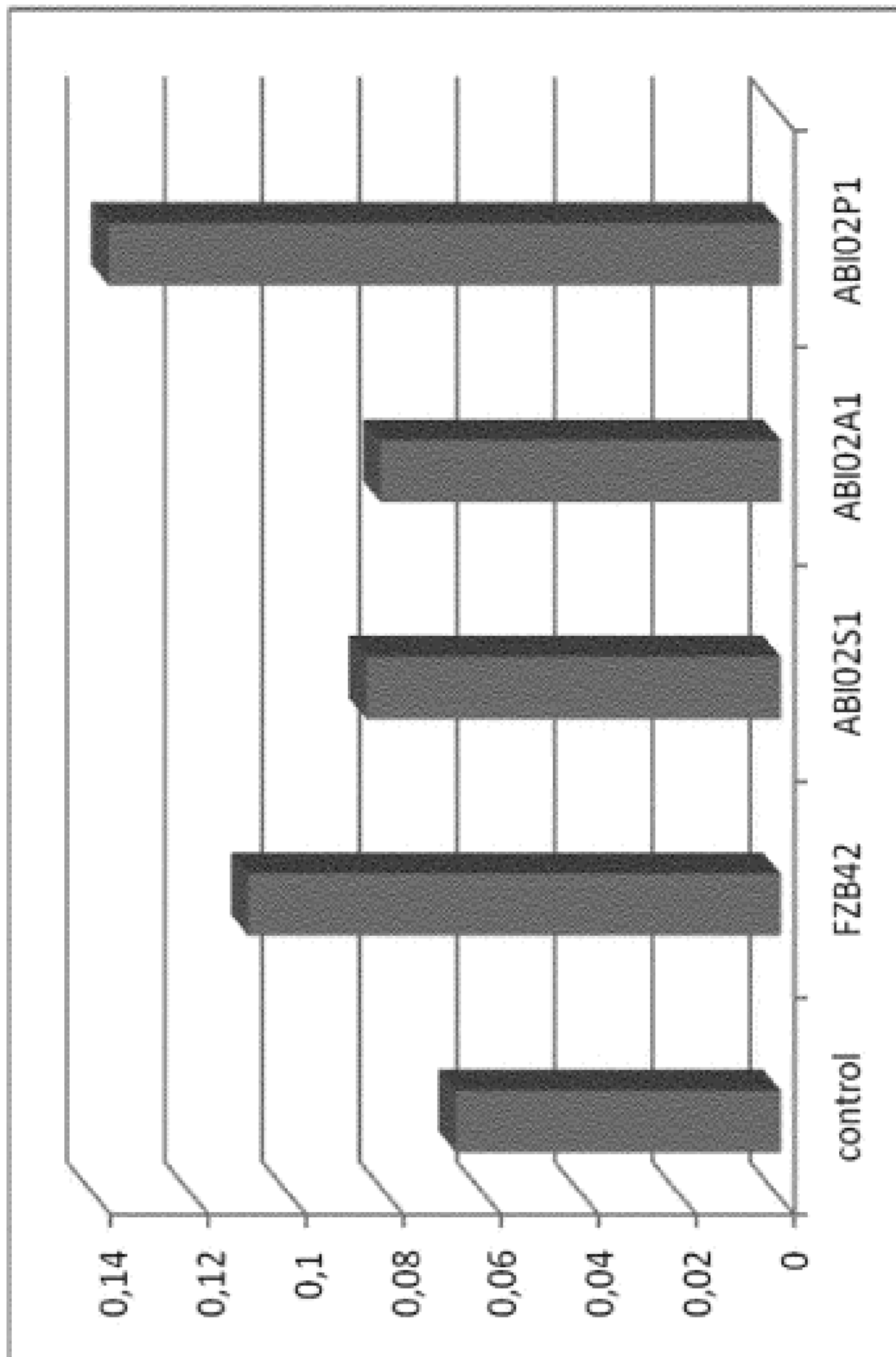


Figura 4

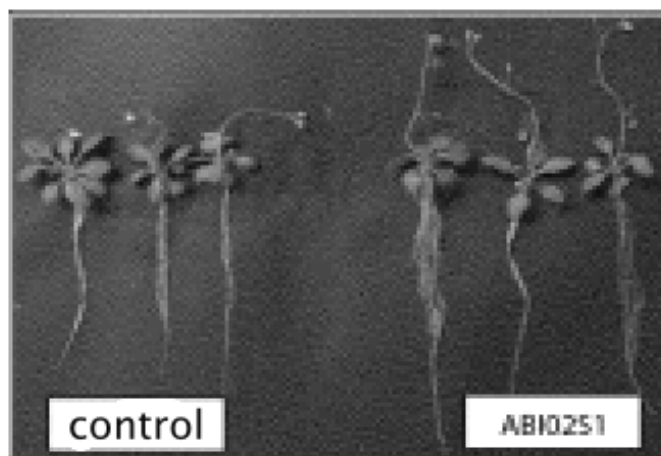
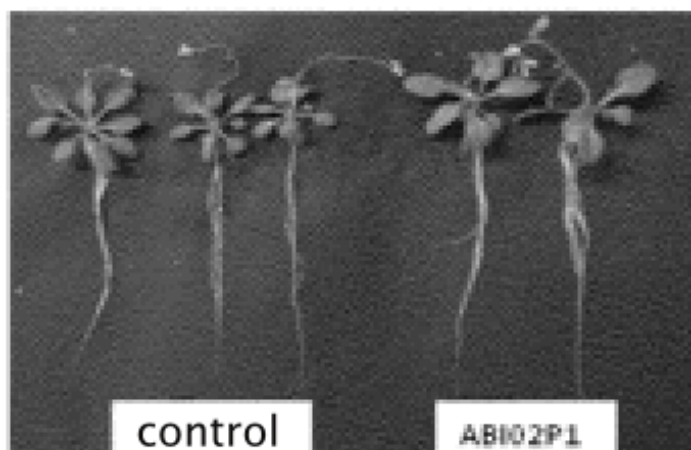
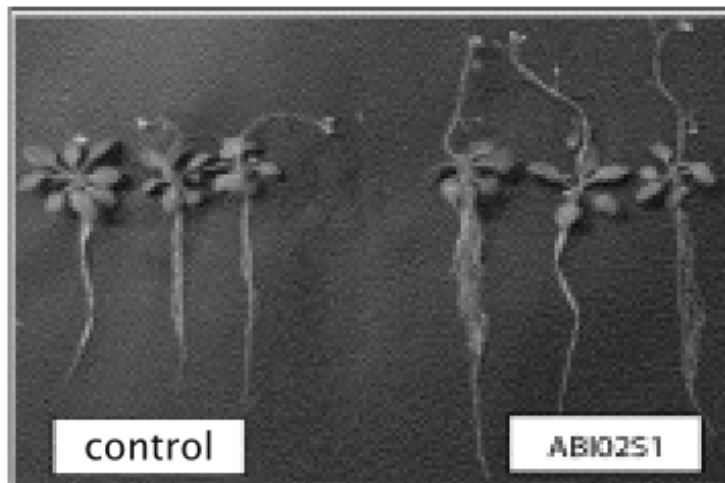


Figura 5

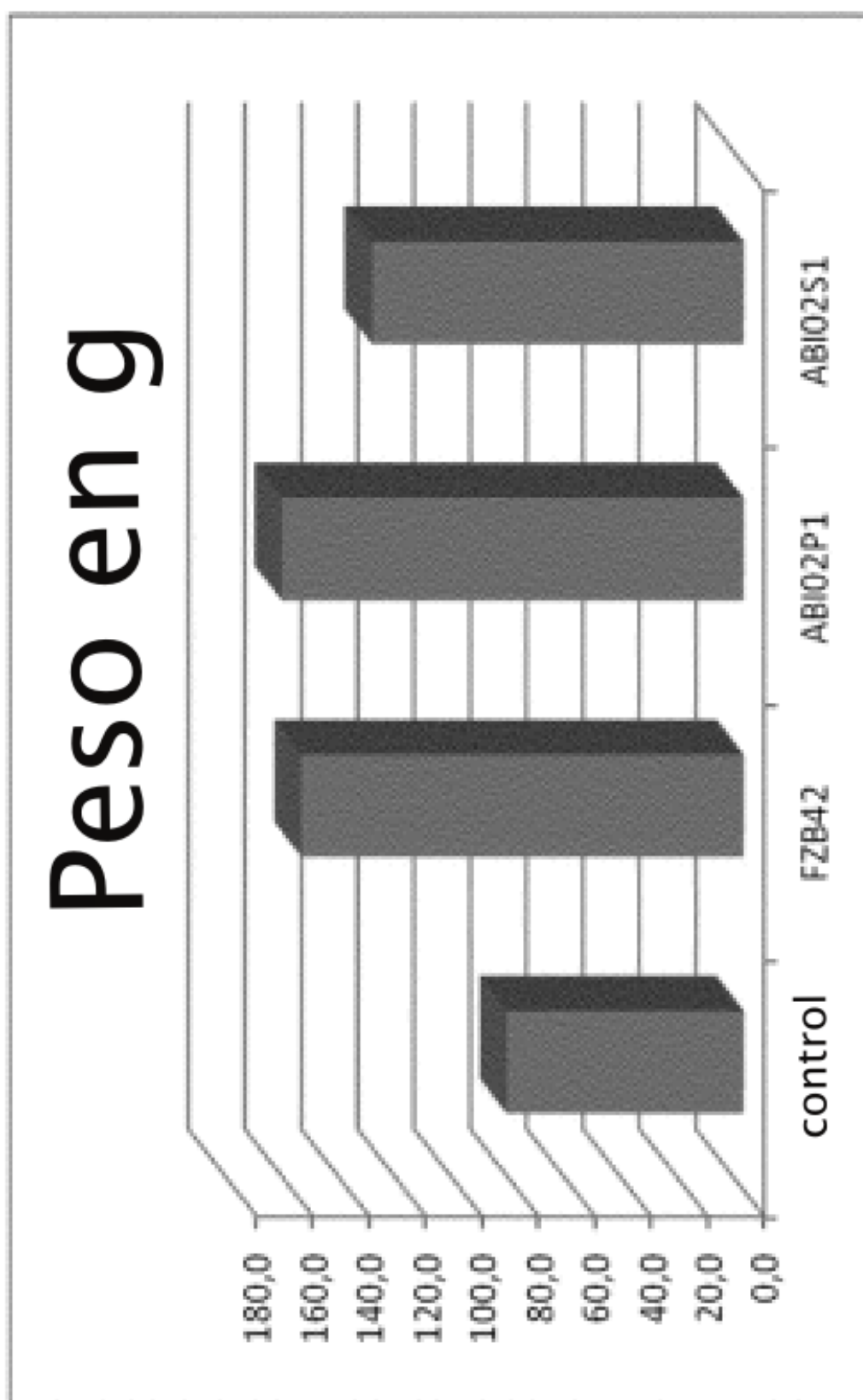


Figura 6

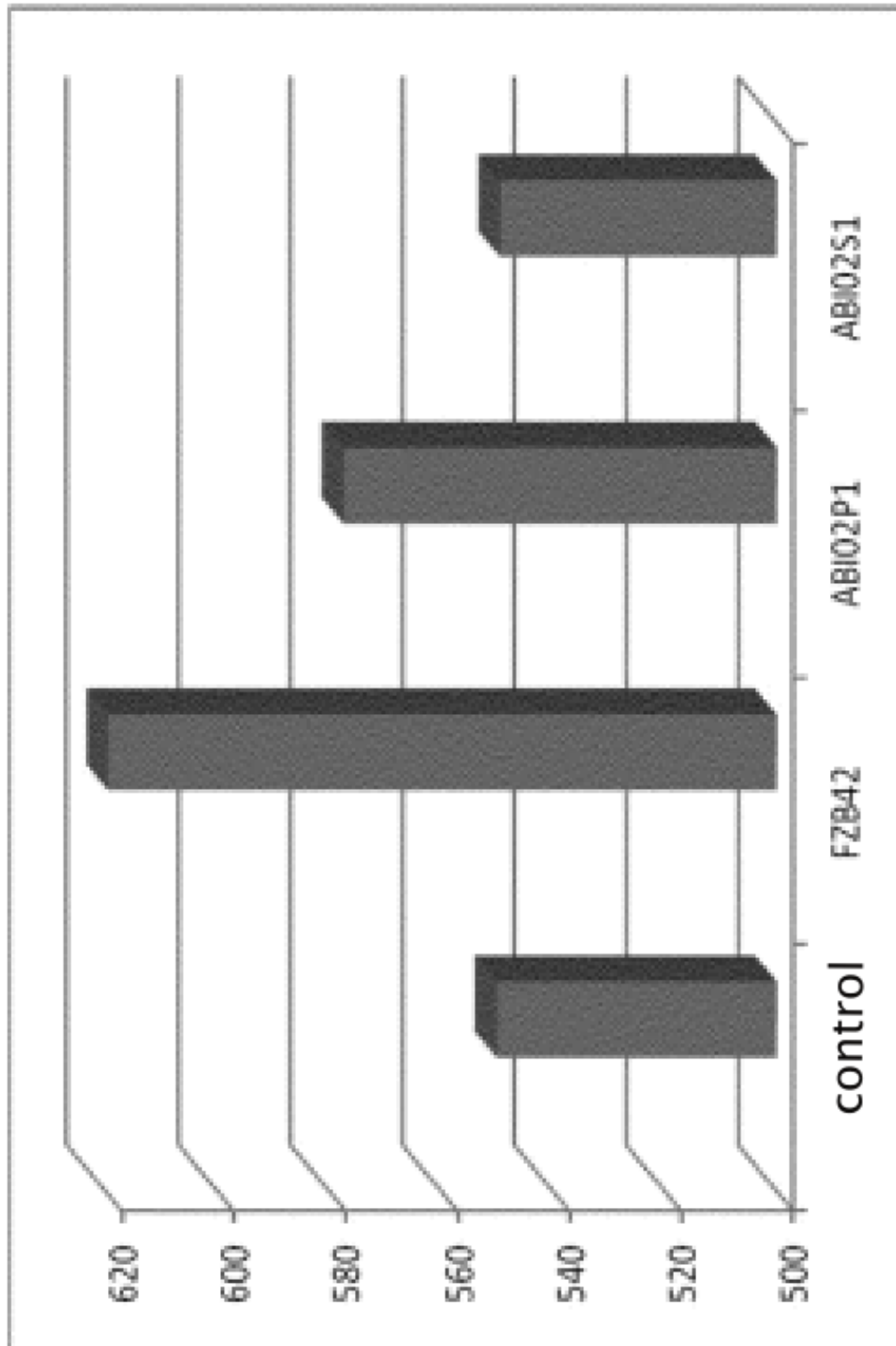


Figura 7

4	7	2	8	11	3	5	10	9
5	9	6	12	1	10	3	11	7
10	8	7	11	9	12	4	2	6
1	2	3	4	5	6	7	8	9
12	10	9	8	7	6	5	4	3
11	12	6	1	9	10	3	5	7
8	3	1	5	2	12	4	11	10
6	1	3	8	10	7	11	9	12
9	12	11	10	9	8	7	6	5

Figura 8

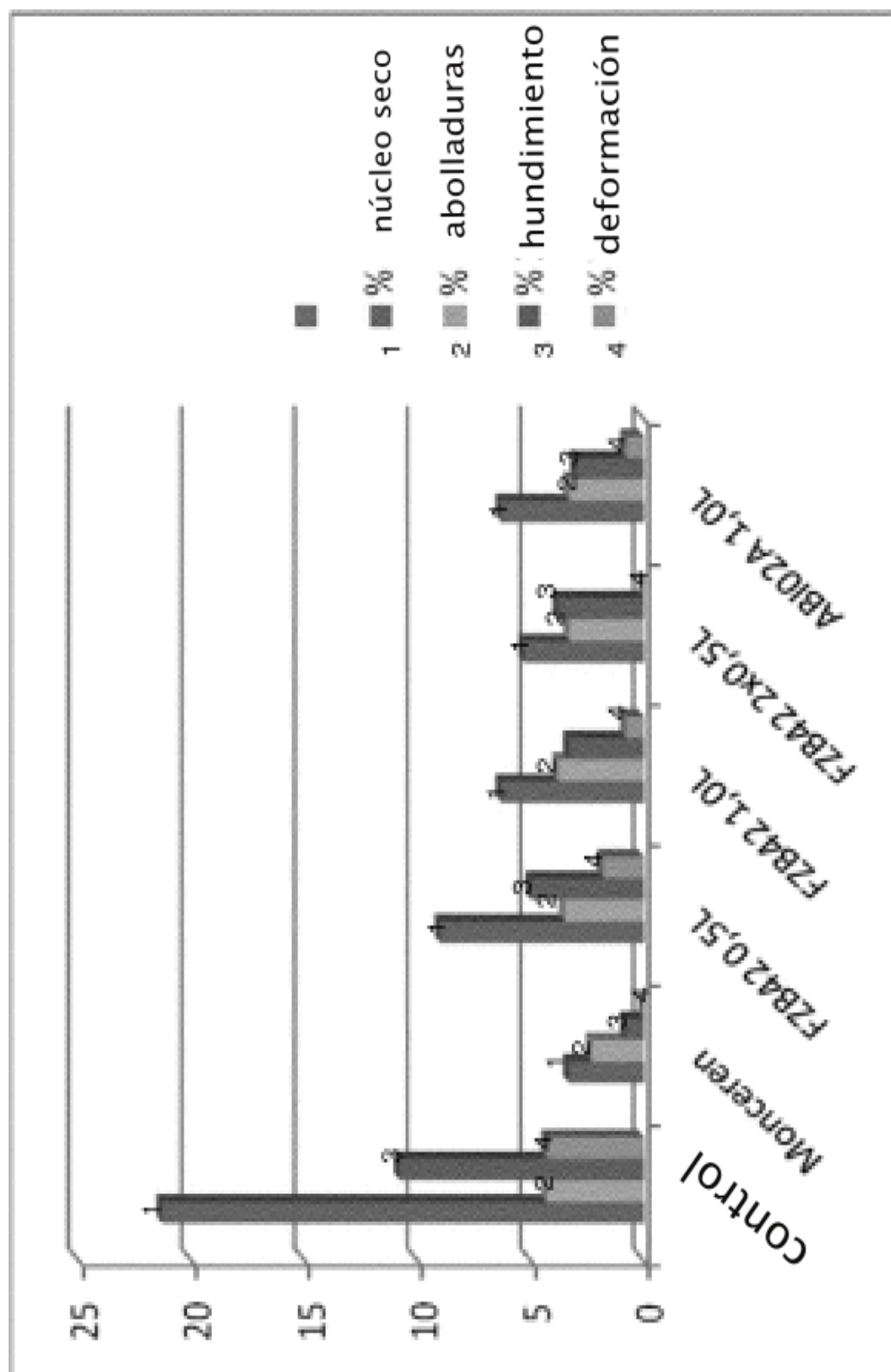


Figura 9

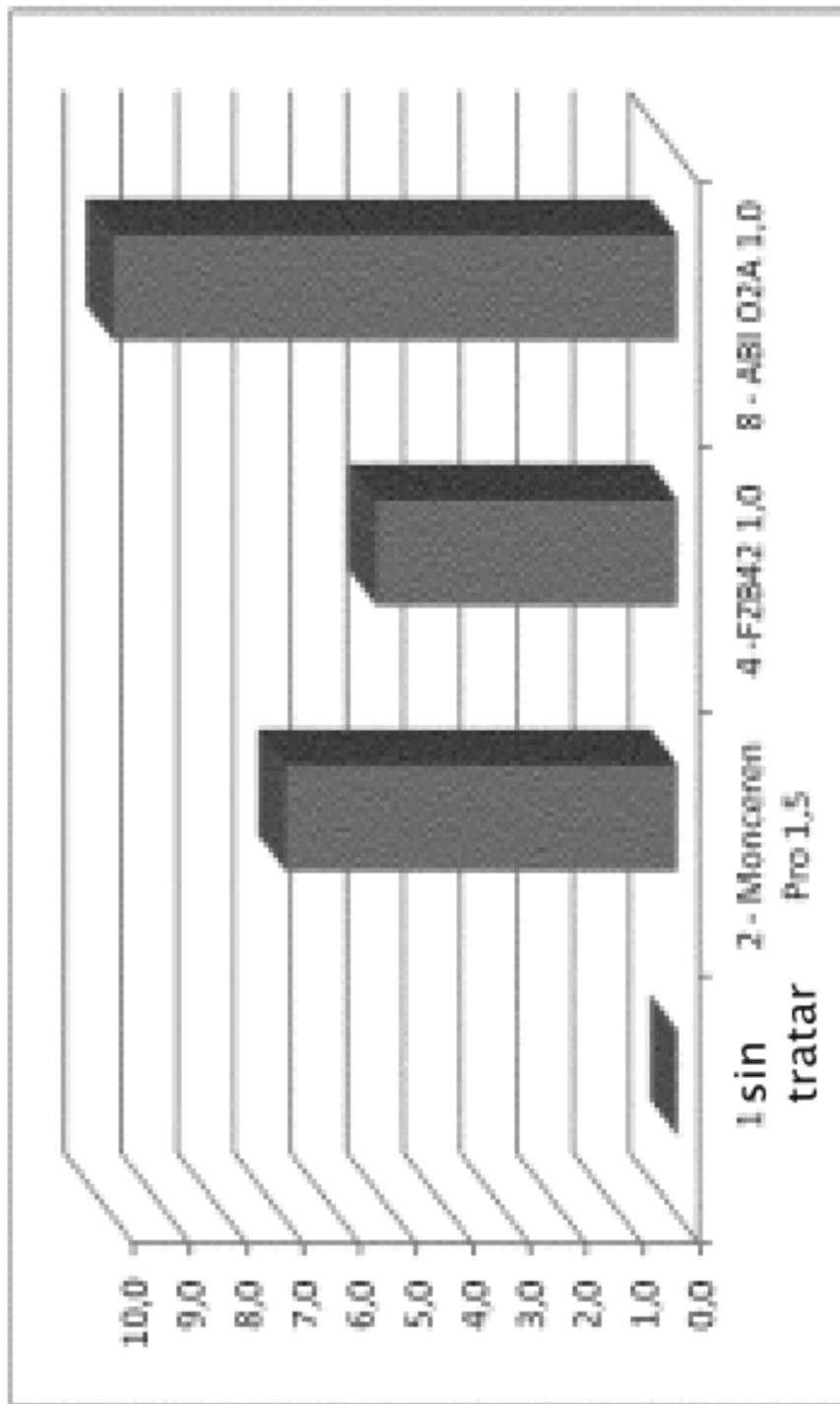


Figura 10

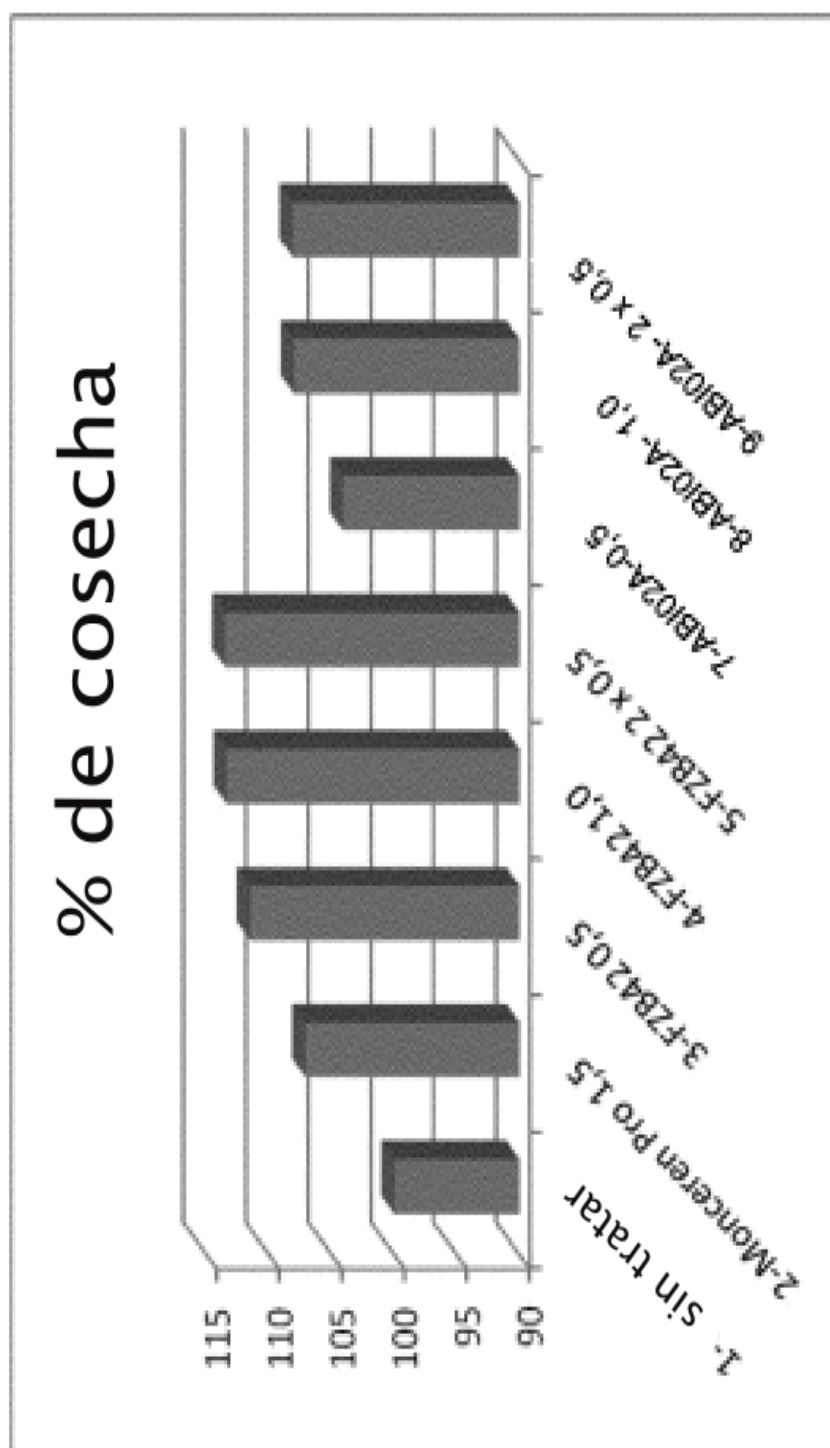


Figura 11

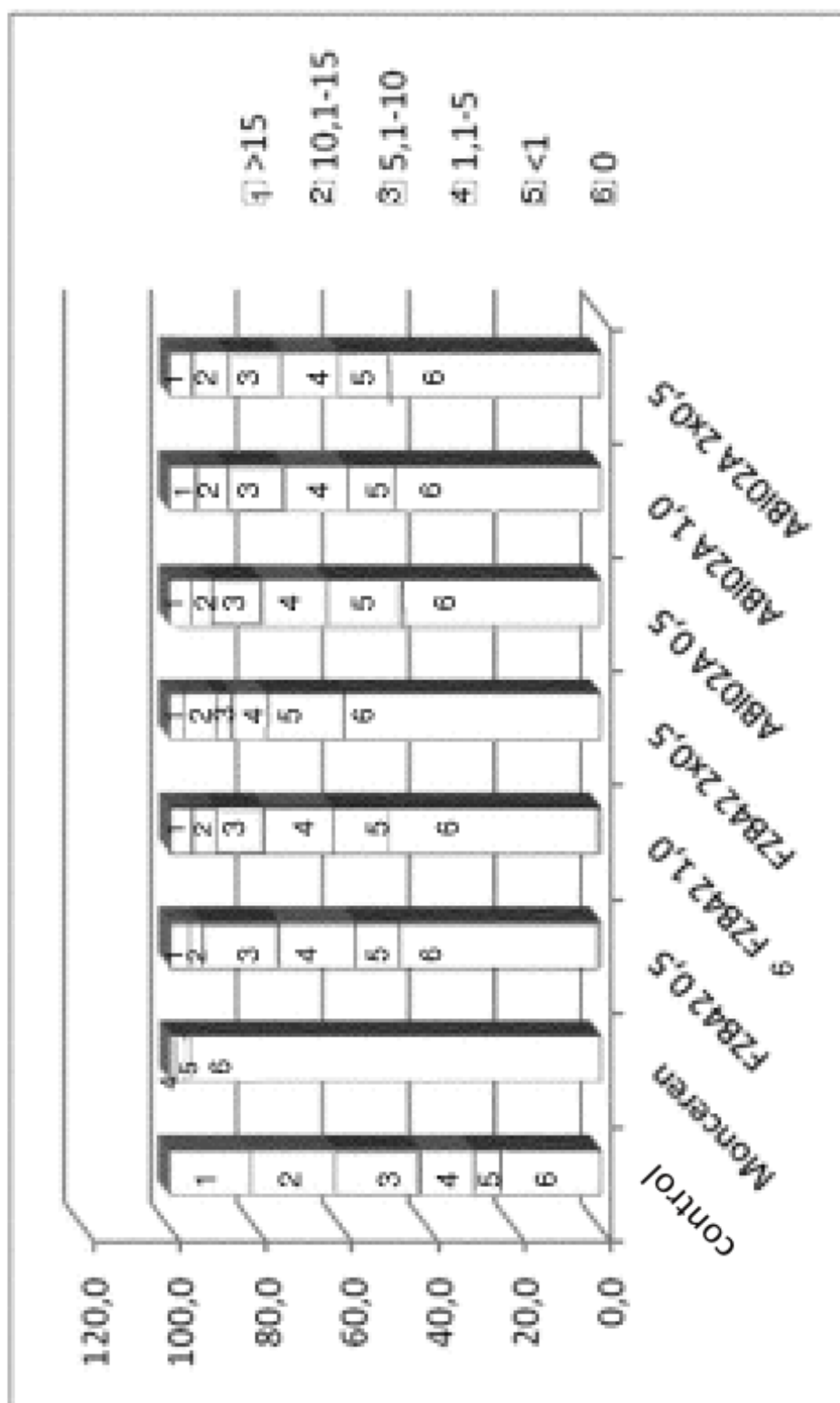


Figura 12