(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 326 779**

(21) Número de solicitud: 200801123

(51) Int. Cl.:
A01N 63/00 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación: **18.04.2008**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **19.10.2009**

Fecha de la concesión: **13.07.2010**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **26.07.2010**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente: **26.07.2010**

(73) Titular/es: **Universidad de Granada**
Cuesta del Hospicio, s/n
18071 Granada, ES

(72) Inventor/es: **Molina Hidalgo, Carlos Alfonso; Osuna Carrillo de Albornoz, Antonio y Vílchez Tornero, Susana**

(74) Agente: **Pons Ariño, Ángel**

(54) Título: **Método para incrementar la efectividad de cepas bacterianas.**

(57) Resumen:
Método para incrementar la efectividad de cepas bacterianas. Se describe un método para incrementar la patogenicidad de cepas bacterianas del género *Bacillus* que comprende exponer la cepa a temperaturas inferiores a la temperatura ambiental u otras situaciones de estrés, una composición de cepas bacterianas obtenidas por dicho método, y el uso de dicha composición en el control biológico de la plaga de *Ceratitis capitata*.

ES 2 326 779 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Método para incrementar la efectividad de cepas bacterianas.

La presente invención se refiere al campo de la biología molecular y biotecnología, específicamente a un método para incrementar la efectividad de cepas bacterianas en el control biológico de plagas, al someterlas a condiciones de estrés. Además se refiere a una composición que incluya estas cepas bacterianas, a las cepas bacterianas en concreto y a sus usos.

Antecedentes de la invención

Las poblaciones de todos los organismos vivos son, en alguna medida, reducidas por la acción natural de sus depredadores, parásitos, antagonistas y patógenos. Este proceso ha sido llamado "control natural"; sin embargo, cuando la densidad de las poblaciones de plagas es manipulada por el hombre se denomina control biológico, y los agentes que llevan a cabo el control son llamados enemigos naturales. Así, los humanos pueden explotar el control biológico de varias maneras para suprimir las poblaciones de las plagas.

El control biológico se define como el uso de organismos vivos para suprimir la población de una plaga específica, haciéndola menos abundante o menos perjudicial de lo que de otra manera podría ser.

El inicio del control biológico data del año 324 DC, cuando en la China cultivaban la hormiga *Oecophylla smaragdina* para proteger los campos de cítricos de las potenciales plagas de coleópteros y lepidópteros; no obstante, el desarrollo y crecimiento del control biológico se produjo en la época en que la aplicación de plaguicidas químicos sintéticos era el método dominante de control de plagas, y aparecieron problemas de especificidad con su uso. Entre las razones para usar plaguicidas biológicos están los efectos secundarios negativos en la salud humana y en la preservación ambiental que causan los plaguicidas químicos, la ausencia de residualidad y su alta especificidad, especialmente en comparación con plaguicidas químicos. Entre otras, las principales ventajas del uso de plaguicidas biológicos son las siguientes:

a) es ambientalmente respetuoso, bastante específico, sin efectos nocivos para los organismo no-diana.

b) existen escasos casos descritos de resistencia, al contrario de lo que ocurre con los insecticidas químicos.

c) es un método económico, la relación coste beneficio es muy favorable.

d) su rentabilidad lo hace un buen candidato como solución a largo plazo.

e) una vez establecidos, los agentes naturales del control biológico pueden reproducirse por si solos, y en pocos casos se requiere de aplicaciones constantes.

Las bacterias entomopatógenas del género *Bacillus* son potenciales agentes naturales de control biológico de insectos, constituyendo la base de varios bioinsecticidas comerciales, que en el caso de algunas plagas han resultado altamente efectivos y específicos. En control biológico de plagas las especies de *Bacillus* más importantes son las patógenos de insectos *B. thuringiensis*, que forma un cuerpo paraesporal tóxico para insectos, *B. sphaericus*, *B. larvae*, *B. lentimorbis*, y *B. popilliae* que son patógenos invasivos. *B. pumilus*, que a pesar de no ser considerada una especie entomopatógena clásica, posee características potenciales para serlo (US6001637). Las bacterias del género *Bacillus* producen toxinas que son diferentes entre especies, y han sido usadas como caracteres diagnósticos para poder clasificarlas (v.g. *B. cereus* de *B. pumilus*); estas toxinas lisan eritrocitos de diferentes especies de animales (hemolisinas), atacan proteínas (actividad proteolítica), degradan lecitinas por acción de lecitinasas, tienen propiedades insecticidas, etc. Hasta el momento no se ha descrito ninguna cepa bacteriana del género *Bacillus* que pueda ser utilizada como bioinsecticida frente a *Ceratitis capitata.*

Cualquier bacteria regula su expresión génica en respuesta a diferentes señales medioambientales, una propiedad esencial para competir con otros organismos. En el caso particular de bacterias patógenas, la regulación génica crucial para permitir la supervivencia de la bacteria al particular ambiente que le ofrece su hospedador. Los genes de virulencia bacterianos están sujetos a complejos mecanismos de regulación para asegurar la expresión del gen apropiado en el momento apropiado.

La expresión de los genes de virulencia en bacterias es un fenómeno que se encuentra afectado por una gran variedad de parámetros, generalmente físicos y químicos, entre los que se encuentran la temperatura, osmolaridad, pH, tensión de O_2 y CO_2, concentración de iones, niveles de hierro, tasa de crecimiento y densidad de población.

Existen numerosos estudios referentes al aumento de la virulencia de las bacterias en condiciones de estrés, bien por la inhibición de la expresión de ciertos genes o por sobre expresión de los mismos. En concreto, las bacterias patógenas sobreviven bajo dos condiciones completamente distintas, esto es, su ambiente natural y su hospedador. Los determinantes de la virulencia de las bacterias patógenas se encuentran bajo el control de activadores transcripcionales que responden a variaciones de temperatura, osmolaridad, concentración de iones metálicos y tensión de oxigeno en el medio ambiente. La regulación de los genes inducidos por el estrés puede ocurrir a nivel de la transcripción, o la

traducción, o por modificaciones post-transduccionales. También, bajo ciertas condiciones de estrés, cambios locales en la superhélice de ADN pueden inducir o reprimir la expresión de genes. Las bacterias patógenas han desarrollado un mecanismo altamente sofisticado para captar las condiciones externas y ajustar su expresión genética convenientemente, activando el conjunto de genes cuyos productos ayudan a su supervivencia, y desechando aquellos productos que no son necesarios en un medioambiente particular. La activación de este sensor permite a la bacteria monitorizar los parámetros medioambientales que permiten distinguir entre el medio exterior y el hospedador, y ajustar su expresión genética convenientemente, particularmente mediante la inducción de factores de virulencia. (Albright *et al* 1989. Prokaryotic signal transduction mediated by sensor and regulator protein pairs; *Annu. Rev. Genet.* 23 311–336; Parkinson and Kofoid 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* 26 71–112). Condiciones de estrés como cambios en la osmolaridad en el medio de crecimiento, anaerobiosis, cambios de temperatura y pH que experimenta la bacteria cuando penetra en el hospedador, pueden controlar la expresión genética induciendo cambios en la topología del ADN (Dorman 1991. DNA supercoiling and environmental regulation of gene expression in pathogenic bacteria; *Infect. Immun.* 59 745-749).

La temperatura es un factor fundamental en la expresión de ciertos genes. Así, se han detectado diferentes niveles de expresión en bacterias creciendo a distintas temperaturas. Por ejemplo, en *Listeria monocytogenes* se han detectado diferentes niveles de expresión en diversos genes (implicados en la respuesta adaptativa al frío, respuesta general al estrés, metabolismo de los aminoácidos, alteraciones en la superficie celular y metabolismo degradativo) cuando crece a 10ºC frente a los 37ºC estándar.

Por tanto, la temperatura es uno de los factores fundamentales que provocan estrés, estimulando principalmente dos fenómenos:

a) *Inducción de los genes de virulencia*

En general, la primera sensación que experimenta una bacteria cuando penetra en un hospedador es un aumento de temperatura. Así, en bacterias patógenas humanas, como *Salmonellae*, *Shigellae*, *Yersinae*, *Bordetella pertusis* (Maurelli 1989. Temperature regulation of virulence genes in pathogenic bacteria: a general strategy for human pathogens?; *Microb. Pathog.* 7 1-10), *Borrelia burgdorferi* (Cluss and Boothby 1990. Thermoregulation of protein synthesis in *Borrelia burgdorferi*; *Infect. Immun.* 58 1038-1042), *Listeria monocytogens*, los casetes de los genes de virulencia se activan a 37ºC, y se encuentran bajo el control de activadores transcripcionales, como, por ejemplo, PrfA (Wachter *et al* 1992. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated; J. BacterioL 174 947-952), lcrF en *Yersinia pestis* y *virF* en *Shigella flexineri* (Cornelis *et al* 1989. Homology between VirF, the transcriptional activator of the *Yersinia virulence* regulon, and AraC, the *Escherichia coli* arbinose operon regulator, *J. Bacteriol.* 171 254-263).

b) *Inducción de genes de choque térmico*

Además de la regulación de los genes de virulencia en organismos patógenos, el estrés por temperatura induce la síntesis de proteínas de choque térmico (*Heat-Shock Proteins* ó HSPs). La inducción de HSPs ocurre primariamente a nivel de la transcripción. Mientras que la inducción de los genes de virulencia está más unida a la temperatura y no decrece aunque disminuya la temperatura, en la respuesta a un choque térmico, el gran incremento inicial de la transcripción es seguido por una fase de adaptación donde los niveles de inducción decrecen (Yura T, Nagai H and Mori H 1993. Regulation of the heat shock response in bacteria; Annu. Rev. Microbiol., 47 321-350).

En resumen, aunque son varios los factores fisicoquímicos que pueden afectar a la expresión de los genes de patogenicidad, generalmente se acepta que su expresión, en bacterias, *se activa con un incremento de temperatura, mientras que su expresión disminuye, llegando incluso a inactivarse, con la disminución de la misma* (Johansson *et al.* 2002. An RNA Thermosensor Controls Expression of Virulence Genes in *Listeria monocytogenes*. Cell, Volume 110, Issue 5, 6 September 2002, Pages 551-561).

La osmolaridad es otro de los factores que induce la expresión de genes relacionados con la virulencia en bacterias. Así, una concentración alta de solutos (alta osmolaridad) estimula la invasión de *Salmonella* y dispara la expresión del osmosensor OmpR, esencial para la virulencia en distintas especies bacterianas (Galán, J.E. 1996. Molecular genetic basis of *Salmonella* entry into host cells. *Mol. Microbiol.* 20:263-271; Dorman, C.J., S. Chatfield, C.F. Higgins, C. Hayward, and G. Dougan. 1989. Characterization of porin and *ompR* mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium:ompR* mutants are attenuated *in vivo*. *Infect. Immun.* 57: 2136-2140; Sleator R.D., and C. Hill. 2005. A novel role for the LisRK two-component regulatory system in listerial osmotolerance. Clinical Microbiology and Infection 11:599-601).

Los cambios extremos de pH son un factor medioambiental común aprovechado por las bacterias patógenas para la inducción de genes de virulencia (Harjai, K., Khandwaha, R. K., Mittal, R., Yadav, V., Gupta, V., Sharma, S. 2005. Effect of pH on production of virulence factors by biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Folia Microbiologica*, 50:99-102).

La carencia de nutrientes induce también una respuesta de estrés global que a su vez regula la expresión de genes de virulencia en *Salmonella* (Fang, F.C., S.J. Libby, N.A. Buchmeier, P.C. Loewen, J. Switala, J. Harwood, and D.G.

Guiney. 1992. The alternative sigma factor *katF* (*rpoS*) regulates *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:11978-11982).

La concentración de iones inorgánicos es también usada por las bacterias para evaluar su localización y para inducir genes requeridos para su virulencia. El hierro juega un papel fundamental en esta regulación, ya que induce la producción de numerosos genes de virulencia incluyendo la producción de toxinas en *Corynebacterium diphtheriae* o la síntesis de sideróforos y aerobactinas en cepas de *E. coli* uropatogénicas.

Por lo general, la expresión de genes de virulencia en una bacteria patógena se encuentra inhibida cuando ésta crece en condiciones normales, pero es activada cuando la bacteria sensa ciertos factores medioambientales como la temperatura, el pH, el aumento de osmolaridad, carencia de iones o nutriente, falta o exceso de O_2 y/o CO_2. Dichos factores medioambientales generalmente suponen una fuente de estrés para la bacteria, por lo que ella reacciona con la síntesis de genes de virulencia que puedan aportarle alguna ventaja.

Ceratitis capitata (Wiedemann) es una de las plagas más eficientes y destructivas del mundo, afecta a numerosos cultivos (ataca a alrededor de 300 especies de cultivos de diferentes vegetales), y por tanto es uno de los insectos con mayor importancia económica en agricultura. Su nombre común es mosca de la fruta del Mediterráneo, ya que en los países mediterráneos es donde su incidencia económica se ha hecho más evidente. Las principales razones por las cuales *C. capitata* se ha convertido en plaga son:

1) Es capaz de resistir bajas temperaturas, y alargar estadios, principalmente el de larva.

2) Por la evolución de oportunidades, la ampliación de las fronteras agrícolas agigantó el hábitat de *C. capitata*.

3) El estadio larvario posee un amplio rango de hospedadores.

4) Posee alta variabilidad genética en secuencias EPIC, que le confieren la capacidad de adaptarse a nuevos ambientes.

5) El transporte de cultivos ha facilitado su dispersión.

Los controles actuales se basan en insecticidas organofosforados (malation) que a pesar de que tiene una toxicidad relativamente baja para los seres humanos y puede ser eliminado por la orina, causa algunos problemas ambientales como ser residuo contenido en alimentos, además de que *C. capitata* ha desarrollado resistencia a este compuesto. Por ello, recientemente se están empleando compuestos con actividad atrayente frente a *C. capitata,* como el Trimedlure (para machos) o aminas que se producen en la degradación de proteínas (para hembras). Sin embargo, al no obtener un compuesto realmente efectivo, se han realizado mezclas de otros previamente sintetizados, sin un resultado óptimo. En cuanto a los controles biológicos, el más utilizado es la Técnica del Insecto Estéril (SIT). Sin embargo, en el caso de *C. capitata*, así como en el caso de otras plagas, el SIT es efectivo solamente cuando se ha localizado el total de la población, sin tener en cuenta la distribución (situación que ocurre a menudo). La mayoría de métodos de control biológico para *C. capitata* (como extractos de plantas usados como insecticidas biológicos, cepas de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, metabolitos excretados de otros hongos como *Mucor hiemalis* o el uso de bacterias entomopatógenas como *Enterobacter cloacae* y *Serratia marcesens*) no han sido probados aún en el campo, por lo que todavía se desconoce si son logística o tecnológicamente posibles a gran escala.

Explicación de la invención

En la presente invención se describe un método que contribuye sustancialmente al incremento de la efectividad de cepas bacterianas del género *Bacillus*, exponiéndolas a condiciones de estrés. Así, se ha visto que exponer cepas del género *Bacillus* a bajas temperaturas, hace que la mortalidad de *C. capitata* se incremente, por término medio, de un 20% a un 100%. En la presente invención, además de describir un nuevo método para aumentar la efectividad de cepas bacterianas del género *Bacillus*, se describen agentes biológicos concretos, activos frente a *C. capitata*, que podrían ser capaces de realizar un control efectivo de sus poblaciones, ambientalmente respetuoso y cuya relación coste - beneficio es favorable.

Las condiciones de estrés vienen determinadas por algunos parámetros, fundamentalmente la temperatura, el pH extremo, el estrés oxidativo, estrés osmótico o hídrico, privación de nutrientes o estrés por iones pesados (Hg, Pb, As).

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método para incrementar la patogenicidad de cepas bacterianas que comprende exponer la cepa a temperaturas suficientemente bajas para inducir la transcripción de genes relacionados con la entomopatogenicidad de dichas cepas. Dichas temperaturas serán, en general, inferiores a la temperatura a la que se encuentran las cepas en su medio natural.

En una realización preferida, las cepas bacterianas son expuestas a temperaturas inferiores a 20ºC. En otra realización más preferida, las cepas bacterianas son expuestas a temperaturas inferiores a 15ºC. En una realización aún más preferida, las cepas bacterianas son expuestas a temperaturas inferiores a 10ºC. En una realización particular de la invención las cepas bacterianas son expuestas a temperaturas iguales o inferiores a 4ºC.

En otra realización preferida, las cepas bacterianas fueron cultivadas en un medio con un pH igual o menor a 5. En otra realización más preferida, las cepas bacterianas se cultivaron en un medio con un pH de entre 2 y 4. En otra realización aún más preferida, las cepas bacterianas se cultivaron en un medio con un pH de aproximadamente 3.

En otra realización preferida, las cepas bacterianas fueron cultivadas en un medio con una concentración de solutos (fuerza iónica) igual o mayor a 250 mM. En otra realización más preferida, las cepas bacterianas fueron cultivadas en un medio con una concentración de solutos de entre 350 mM y 1000 mM. En una realización particular de la invención, las cepas bacterianas fueron cultivadas en un medio con una concentración de solutos de aproximadamente 700 mM.

En otra realización preferida de la invención estas cepas bacterianas pertenecen al género *Bacillus*. En otra realización más preferida de la invención estas cepas bacterianas pertenecen a la especie *B. pumilus*. En otra realización más preferida de la invención estas cepas bacterianas pertenecen a la especie *B. thuringiensis*.

El término "Género", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la categoría de la clasificación biológica (categoría taxonómica) que comprende una o más especies relacionadas filogenéticamente y morfológicamente similares. También se espera que compartan características químicas y metabólicas similares.

Por "categoría taxonómica" se entiende el nivel de jerarquía utilizado para la clasificación de los organismos.

El género *Bacillus* fue descrito en 1872 por Ferdinand Cohn, se encuentra dentro de la familia *Bacillaceae* (orden *Bacillales*: División *Firmicutes*), y actualmente incluye 51 especies válidas. Son bacterias Gram-positivas que poseen una morfología alargada simulando un bastón, son ubicuas en la naturaleza (se encuentran en suelo, agua, polvo, etc.), pueden ser aerobias estrictas o anaerobias facultativas; incluyen tanto especies de vida libre como especies patógenas, y varias especies son parte natural de la flora intestinal humana. La característica única de estas bacterias es su habilidad para producir endosporas bajo condiciones ambientales de estrés (físicas o químicas), en este estadio tienen la capacidad de mantenerse inactivas por largos períodos de tiempo; esta característica definió al género durante mucho tiempo, pero no todas las especies estaban estrechamente relacionadas, y muchas han sido reubicadas en otros géneros. Las únicas bacterias no incluidas en este género, capaces de producir esporas son las pertenecientes a *Clostridium*.

Adicionalmente, en la identificación de un microorganismo como perteneciente al género *Bacillus* son aplicables los parámetros siguientes, sea aisladamente o en combinación con los anteriores. Dado que las cepas de *Bacillus* son afines en cuanto a su evolución, puede esperarse que la homología global de los genomas al nivel de los nucleótidos, y más concretamente a nivel de la región 16S del ARN ribosómico, y más concretamente al polinucleótido de la región 16S del ARN ribosómico que se recoge en la SEQ ID NO: 1, sea de al menos un 70%, más preferiblemente de al menos un 75%, más preferiblemente de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90% y aún más preferiblemente de al menos un 95%. La correspondencia entre la secuencia genómica de la(s) cepa(s) de *Bacillus* putativa(s) y la secuencia de otro microorganismo se puede determinar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, aquéllas se pueden determinar por una comparación directa de la información de secuencia del polinucleótido procedente de *Bacillus* putativo, y la secuencia del polinucleótido de la SEQ ID NO: 1 de esta memoria. Por ejemplo, también, aquéllas se pueden determinar por hibridación de los polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido por digestión con nucleasa(s) específica(s) monocatenaria(s), seguido por determinación del tamaño de los fragmentos digeridos.

El porcentaje de homología se ha determinado midiendo la identidad entre el polinucleótido que se muestra en la SEQ ID NO: 1 (perteneciente a la cepa del género *Bacillus* - cepa 15.1- utilizada para llevar a cabo uno de los ejemplos de la presente invención) y todos los polinucleótidos homólogos del género *Bacillus* que se encontraban recogidos en el momento de escritura de esta memoria, en el GenBank. Para ello, se realizó un alineamiento de los polinucleótidos y se calcularon, mediante métodos conocidos en el estado de la técnica, las distancias genéticas entre el polinucleótidos de la cepa de *Bacillus* utilizada en el ejemplo 1 con la secuencia consenso SEQ ID NO: 1 y los restantes polinucleótidos, y se calculó la identidad entre los polinucleótidos que presentaron la mayor distancia genética con él. La identidad que presentaron fue de al menos un 70%. Por tanto, cabe pensar que un organismo que pertenezca al género *Bacillus* tendrá un polinucleótido homólogo al de la SEQ ID NO:1, perteneciente a la región 16S de su ARN ribosómico, que presente, al menos, una identidad del 70% con éste.

Este género posee características fisiológicas únicas, siendo capaces de esporular en determinadas condiciones. Especies evolutivamente próximas se espera que compartan genes afines, y factores reguladores de la expresión de estos genes, que les permitan reaccionar de forma similar ante determinadas condiciones ambientales, como es el caso de condiciones de estrés. Se podría pensar que otras especies de este género respondan de manera similar, aumentando su entomopatogenicidad, cuando se les somete a condiciones de estrés, y como es el caso de la invención, a bajas temperaturas, durante un periodo de tiempo adecuado. Se espera, además, que cepas de las mismas especies den lugar a fenotipos distintos, en cuanto a su entomopatogenicidad, dependiendo de las condiciones ambientales a las que se sometan, lo que se conoce como norma de reacción. Como se pone de manifiesto en los ejemplos de esta invención, que se han llevado acabo con *B. thuringiensis* y *B. pumilus*, especies que no se encuentran filogenéticamente próximas dentro del género *Bacillus*, se espera que el comportamiento de todas las especies de este género, respecto al objeto de la invención, sea similar desde el punto de vista fenético. El aumento de la entomopatogenicidad puede ocurrir, por tanto, en otras especies del género *Bacillus* como son, pero sin limitarnos a ellas, *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*

(las dos especies filogenéticamente relacionadas con *B. thuringiensis*), *B. sphaericus*, *B. larvae*, *B. lentimorbis*, y *B. popilliae*, entre otras.

Así pues, las condiciones de estrés, y en este caso concreto, y en contra de los criterios generalmente aceptados, el someter las cepas a bajas temperaturas antes de utilizarlas, pueden activar determinados genes de virulencia, o pueden estimular la formación de otras toxinas, bien por la activación de factores transcripcionales, o por la estimulación de las rutas metabólicas que conducen a la formación de dichas toxinas.

El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos secuencias aminoácidicas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12: 287 (1984) Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI); BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1999)). Adicionalmente, el algoritmo de Smith Waterman puede usarse para determinar el grado de identidad de dos secuencias.

El término "homología", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, y más concretamente, a la semejanza entre los pares de bases de dos o más secuencias de polinucleótidos.

Por "norma de reacción" se entiende el conjunto de fenotipos a que da origen un mismo genotipo cuando se desarrolla en distintos ambientes.

El término "genotipo", tal como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la constitución hereditaria o genética de un individuo; todo el material genético contenido en una célula.

El término "fenotipo", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la suma total de las propiedades estructurales y funcionales observables de un organismo; producto de la interacción entre el genotipo y el medio ambiente.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición (de aquí en adelante composición de la invención) que comprende cepas bacterianas tratadas con el método de la invención.

En una realización particular de este aspecto de la invención, las cepas bacterianas que forman parte de la composición pertenecen a la especie *B. pumilus* ó *B. thuringiensis.*

Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso de las cepas bacterianas procedentes del método de la invención o de la composición de la invención, para el control biológico de plagas.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la plaga controlada por las cepas bacterianas procedentes del método de la invención o por la composición de la invención es la "mosca de la fruta del Mediterráneo" (*Ceratitis capitata* Wiedemann, 1824).

En una realización más preferida de este aspecto de la invención, las cepas bacterianas que se emplean en el control de la plaga de *C. capitata* pertenecen a la especie *B. pumilus* ó *B. thuringiensis.*

En otra realización más preferida de este aspecto de la invención, la región 16S del ARN de las cepas bacterianas que se emplean en el control de la plaga de *C. capitata* tienen una identidad de, al menos un 95%, con las cepas de *B. pumilus* ó *B. thuringiensis.*

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un especialista habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. En la práctica de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento. A lo largo de toda la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Otros objetos, ventajas y características de la invención serán evidentes para los especialistas en la técnica tras el examen de la descripción o pueden aprenderse por la práctica de la invención. Los ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar la presente invención.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1a-1k muestran la media del porcentaje de mortalidad de las 115 cepas bacterianas (incluidos controles) en larvas de *C. capitata* 4, 10 y 15 días después de iniciados los bioensayos. La toxicidad fue evaluada en grupos de 10 a 13 cepas, como se representa en estas figuras.

La Figura 2 muestra el porcentaje de mortalidad de larvas de *C. capitata* causadas por un grupo de cepas sometidas a 4ºC durante 72 horas, después de 4, 10 y 15 días después de iniciados los bioensayos.

La Figura 3 muestra la media del porcentaje de mortalidad de cultivos liofilizados de *B. pumilus* (cepa 15.1) y sus controles negativos, no expuestos (0h) y expuestos 96 horas a 4ºC en larvas de *C. capitata*, 15 días después de iniciado el experimento. 15.1 (n=4); Bt78111 (n=2); T3 (n=2).

Exposición detallada de modos de realización

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del método para aumentar la patogenicidad de cepas bacterianas del género *Bacillus*, sometiéndolas a condiciones de estrés. En los ejemplos se han empleado cepas de *B. pumilis* y de *B. thuringensis*.

Las bacterias constituyen un grupo de organismos ampliamente diversificados, que son fácilmente aislables de una gran variedad de medios y superficies, y en los que se ha puesto gran atención como agentes de control biológico de plagas desde la descripción de las propiedades insecticidas de los cristales proteicos o delta endotoxina de *B. thuringiensis* que se activan por efecto enzimático bajo las condiciones de pH alcalino del intestino de las larvas de lepidópteros, causando desbalances osmóticos que rompen la pared del intestino del insecto. Esto produce una septicemia al mezclarse la hemolinfa con la materia fecal causándole la muerte. Aunque este proceso puede tomar de 3 a 4 días, la larva deja de comer minutos después de haber ingerido los cristales por paralización de su aparato bucal, deteniendo el daño al cultivo inmediatamente.

En este sentido, y con el objeto de llevar a cabo la presente invención los inventores decidieron aislar cepas bacterianas del género *Bacillus*, que fueran potencialmente patógenas para *C. capitata*, una de las plagas de insectos que más pérdidas económicas causa a nivel mundial.

Así, se aislaron y seleccionaron un total de 115 cepas bacterianas, 104 a partir de muestras de campo, y 11 a partir de larvas de *C. capitata* muertas encontradas en el interior de chirimoyos recogidos en zonas de cultivo de la Costa Tropical de Granada (Almuñecar). Debido a que varias cepas de bacterias entomopatógenas han sido descritas a partir insectos muertos, se procedió al aislamiento de cepas bacterianas a partir de larvas muertas de *C. capitata*, con objeto de evaluar su posible efecto patógeno. Las cepas bacterianas aisladas de larvas muertas se nombraron DLA y DLB ("*dead larvae*").

A continuación se ensayó la toxicidad de los aislados bacterianos en adultos de *C. capitata*. En los bioensayos realizados con adultos se llevó a cabo una repetición con cada una de las 115 cepas evaluadas. Los bioensayos fueron revisados diariamente durante los 20 días de duración del experimento; sin embargo se muestra el porcentaje de mortalidad a 5, 10, 15 y 20 días después de iniciados los bioensayos (Tabla 1). El valor máximo de porcentaje de mortalidad fueron 10% (varias cepas), 30,0% (cepa 30.3), 60,0% (cepa 8.3) y 80,0% (cepa 33.2) (en negrita) a 5, 10, 15 y 20 días después de haber iniciado los bioensayos respectivamente. Los valores máximos del porcentaje de mortalidad de los controles negativos fueron los siguientes: *Bacillus thuringiens* 78/11, 5 días: 10%, 10 días: 10%, 15 días: 10%, 20 días: 70%; psv10-wt, 5 días: 10%, 10 días: 10%, 15 días: 30%, 20 días: 80%; medio T3 líquido, 5 días: 0%, 10 días: 10%, 15 días: 30%, 20 días: 30%; y H_2O destilada, 5 días: 0%, 10 días: 10%, 15 días: 10%, 20 días: 10%. Al comparar los valores máximos de porcentaje de mortalidad alcanzados por las cepas 8.3 y 33.2, tras 15 y 20 días de transcurrido el bioensayo respectivamente, con los porcentajes de mortalidad de los controles Bt 78/11 y psv10-wt a 20 días de haber iniciado el experimento, se deduce que el alto porcentaje de las cepas antes mencionadas pudo deberse a algún tipo de manipulación errónea del bioensayo, pues en el caso de la cepa 33.2 pertenece al mismo grupo de experimentos que el control Bt 78/11 con 70% de mortalidad.

Estos resultados indican que ninguna de las 115 cepas bacterianas presenta un alto porcentaje de mortalidad frente a adultos de *C. capitata*.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Porcentaje de mortalidad causada por las 115 cepas bacterianas en bioensayos con adultos, 5, 10, 15 y 20 días después de iniciado el bioensayo

Cepa	5 días	10 días	15días	20 días
1.1	10	10	10	10
1.2	10	10	10	10
1.3	10	10	20	20
1.4	0	0	0	0
1.6	0	20	20	20
2.1	0	0	0	0
4.1	0	0	0	40
5.1	0	0	20	20
5.2	0	0	0	0
5.3	10	20	20	20
5.4	0	10	10	10
5.5	0	0	0	0
5.6	0	10	20	20
5.7	0	10	30	30
6.1	0	0	0	0
7.1	0	20	30	30
8.1	0	0	0	0
8.2	0	0	0	0
8.3	10	20	40	40
8.4	0	10	10	10
8.5	0	0	0	10
8.6	0	0	0	0
8.8	0	0	10	20
8.9	0	0	0	20
8.10	0	0	**60**	60
9.1	10	20	20	20
9.2	0	0	10	20
9.3	0	0	0	20
9.5	10	10	10	10
9.6	0	0	20	20
10.1	0	0	10	20
10.2	0	0	10	30
10.3	0	0	10	20

11.1	0	0	0	10
11.2	0	0	20	20
11.4	0	0	10	10
11.5	10	30	40	50
11.6	0	10	10	10
12.1	10	10	20	30
12.2	0	0	10	10
12.3	0	10	10	10
12.4	0	0	0	0
12.5	0	0	0	0
12.6	0	0	10	10
12.7	0	0	10	10
13.1	0	0	0	0
13.2	0	0	0	0
13.3	0	0	0	0
15.1	0	0	0	10
15.2	0	0	0	0
15.3	0	0	0	10
15.4	0	0	0	0
15.5	0	0	0	0
15.6	0	0	0	0
15.7	0	0	0	0
15.9	0	10	10	10
16.2	0	0	0	0
16.3	0	0	0	0
17.1	0	0	0	0
17.2	0	0	0	0
17.3	0	0	0	0
17.4	10	10	10	10
17.5	0	0	0	0
18.1	10	10	30	30
20.1	0	0	20	20
20.2	0	0	0	0
20.3	0	0	0	10
20.4	0	0	30	30
20.5	0	10	10	20
20.6	0	0	10	10

20.7	0	0	30	30
20.8	0	0	0	0
22.1	0	0	40	40
22.2	0	0	0	0
22.3	0	0	0	0
22.4	0	10	10	30
27.1	0	0	0	0
27.2	0	0	0	0
29.1	0	0	0	0
29.2	0	0	0	0
30.1	10	10	10	30
30.2	0	20	20	20
30.3	0	**30**	30	30
30.4	0	0	0	10
30.5	0	0	0	0
31.1	0	0	40	40
33.1	0	0	20	20
33.2	0	0	20	**80**
33.3	0	0	0	20
33.4	0	0	20	20
33.5	0	0	0	20
34.1	0	0	10	10
34.2	0	0	0	10
34.3	0	0	10	20
34.4	0	0	0	0
34.5	0	0	10	10
34.6	0	0	10	10
35.1	0	0	10	10
35.2	0	0	0	0
35.3	0	0	0	0
35.4	0	0	0	0
36.1	0	0	10	20
36.2	0	0	0	0
36.3	0	0	0	20
DLA1	10	10	20	20
DLA4	10	10	10	20
DLA10	10	10	30	30

DLB1	0	0	10	20
DLB2	0	20	20	20
DLB3	0	0	20	20
DLB4	10	10	10	10
DLB5	0	0	40	40
DLB6	0	0	10	10
DLB7	10	20	20	30
DLB8	0	10	10	10

A continuación, se llevaron a cabo unos bioensayos con larvas realizándose dos repeticiones con cada una de las 115 cepas evaluadas. Cada cepa bacteriana se ensayó con 24 larvas. Se calculó la mortalidad media, desviación estándar y coeficiente de variación (CV: desviación estándar/media) entre las dos repeticiones, a 4, 10 y 15 días después de iniciados los experimentos (Tabla 2). En ninguna de las cepas, el coeficiente de variación sobrepasó el valor de 1,5 (considerado como valor limite estándar), lo que significa que las dos repeticiones se consideran replicaciones fiables.

Los valores máximos de porcentaje de mortalidad fueron 27,78% (cepa 8.10), 32,58% (cepa 5.7) y 45,35% (cepa 5.4) (en negrita) a 4, 10 y 15 días después de haber iniciado los bioensayos respectivamente. En ninguno de los casos estos valores se consideran elevados, ya que los controles tuvieron los siguientes valores medios de porcentaje de mortalidad, *B. thuringiens* 78/11, 4 días: 16,67%, 10 días: 21,29%, 15 días: 29,17%; psv10-wt, 4 días: 8,33%, 10 días: 12,59%, 15 días: 21,29%; y medio T3 líquido, 4 días: 8,33%, 10 días:16,85%, 15 días: 27,72%.

TABLA 2

Porcentaje medio, Desviación Estándar y Coeficiente de Variación de la mortalidad causada por las 115 cepas bacterianas en bioensayos con larvas, 4, 10 y 15 días después de iniciado tratamiento

Cepa	**4 días**			**10 días**			**15 días**		
	Media	**DE**	**CV**	**Media**	**DE**	**CV**	**Media**	**DE**	**CV**
1.1	12,50	± 5,89	0,47	18,75	± 8,84	0,47	20,83	± 11,79	0,57
1.2	14,58	± 2,95	0,20	20,83	± 5,89	0,28	21,20	± 5,38	0,25
1.3	16,94	± 5,51	0,33	19,64	± 7,58	0,39	21,73	± 10,52	0,48
1.4	6,34	± 2,82	0,44	12,92	± 11,20	0,87	13,99	± 9,68	0,69
1.6	8,52	± 5,62	0,66	10,42	± 14,73	1,41	10,42	± 14,73	1,41

2.1	6,52	± 9,22	1,41	11,11	± 7,86	0,71	11,67	± 7,07	0,61
4.1	8,71	± 0,54	0,06	14,58	± 2,95	0,20	14,58	± 2,95	0,20
5.1	8,70	± 6,15	0,71	16,39	± 1,42	0,09	22,33	± 6,99	0,31
5.2	6,25	± 2,95	0,47	19,30	± 19,85	1,03	21,38	± 22,79	1,07
5.3	8,33	± 11,79	1,41	20,94	± 0,16	0,01	24,63	± 18,20	0,74
5.4	8,51	± 0,26	0,03	17,76	± 10,23	0,58	**45,35**	± 22,89	0,50
5.5	10,60	± 2,69	0,25	12,50	± 17,68	1,41	39,58	± 2,95	0,07
5.6	16,67	± 11,79	0,71	19,29	± 13,13	0,68	22,22	± 15,71	0,71
5.7	16,67	± 0,00	0,00	**32,58**	± 1,07	0,03	35,42	± 2,95	0,08
6.1	13,04	± 18,45	1,41	15,22	± 21,52	1,41	17,39	± 24,60	1,41
7.1	18,75	± 2,95	0,16	19,24	± 2,25	0,12	22,92	± 2,95	0,13
8.1	20,60	± 4,54	0,22	20,06	± 3,77	0,19	24,03	± 3,24	0,13
8.2	21,20	± 5,38	0,25	15,84	± 2,20	0,14	16,20	± 1,69	0,10
8.3	18,93	± 14,48	0,76	19,05	± 20,20	1,06	21,13	± 23,15	1,10
8.4	16,94	± 5,51	0,33	16,67	± 23,57	1,41	21,88	± 22,10	1,01
8.5	19,22	± 2,59	0,13	16,67	± 23,57	1,41	22,73	± 32,14	1,41
8.6	15,79	± 22,33	1,41	23,33	± 33,00	1,41	23,33	± 33,00	1,41
8.8	19,13	± 14,20	0,74	14,58	± 20,62	1,41	18,15	± 15,57	0,86
8.9	25,27	± 17,29	0,68	27,68	± 25,67	0,93	27,92	± 25,34	0,91
8.10	**27,78**	± 7,86	0,28	21,74	± 30,74	1,41	21,74	± 30,74	1,41
9.1	22,92	± 8,84	0,39	14,58	± 20,62	1,41	14,58	± 20,62	1,41
9.2	14,58	± 8,84	0,61	14,67	± 14,60	1,00	21,02	± 23,30	1,11
9.3	25,36	± 11,27	0,44	25,60	± 22,73	0,89	23,96	± 25,04	1,05
9.5	18,75±	8,84	0,47	20,87	± 1,23	0,06	21,59	± 4,82	0,22
9.6	10,42	± 14,73	1,41	15,18	± 8,00	0,53	22,32	± 2,10	0,09
10.1	14,76	± 8,58	0,58	21,32	± 5,20	0,24	19,58	± 13,55	0,69
10.2	8,70	± 6,15	0,71	8,70	± 6,15	0,71	11,28	± 2,49	0,22
10.3	12,50	± 5,89	0,47	16,94	± 5,51	0,33	21,11	± 11,40	0,54
11.1	8,33	± 5,89	0,71	14,58	± 8,84	0,61	14,58	± 8,84	0,61
11.2	6,25	± 2,95	0,47	8,51	± 0,26	0,03	8,51	± 0,26	0,03
11.4	8,33	± 5,89	0,71	11,31	± 4,21	0,37	11,31	± 4,21	0,37
11.5	13,75	± 10,02	0,73	20,83	± 17,68	0,85	20,83	± 17,68	0,85
11.6	4,17	± 5,89	1,41	8,33	± 11,79	1,41	8,33	± 11,79	1,41
12.1	10,42	± 14,73	1,41	12,50	± 17,68	1,41	15,00	± 14,14	0,94
12.2	16,94	± 5,51	0,33	21,38	± 6,66	0,31	23,27	± 0,77	0,03
12.4	15,63	± 13,26	0,85	16,67	± 23,57	1,41	14,58	± 20,62	1,41

12.5	17,12	± 6,53	0,38	10,42	± 14,73	1,41	10,42	± 14,73	1,41
12.6	16,67	± 11,79	0,71	18,75	± 14,73	0,79	18,75	± 14,73	0,79
12.7	20,83	± 11,79	0,57	22,92	± 8,84	0,39	25,00	± 11,79	0,47
13.1	12,50	± 5,89	0,47	17,12	± 6,53	0,38	20,14	± 10,80	0,54
13.2	8,33	± 0,00	0,00	13,26	± 6,96	0,53	10,42	± 2,95	0,28
13.3	12,50	± 0,00	0,00	16,67	± 0,00	0,00	20,83	± 0,00	0,00
15.1	12,50	± 0,00	0,00	14,58	± 2,95	0,20	16,67	± 0,00	0,00
15.2	6,34	± 2,82	0,44	8,42	± 5,76	0,68	10,87	± 3,07	0,28
15.3	12,77	± 0,38	0,03	13,46	± 5,56	0,41	21,46	± 14,64	0,68
15.4	8,99	± 6,57	0,73	12,17	± 11,07	0,91	17,17	± 18,14	1,06
15.5	13,04	± 12,30	0,94	17,96	± 19,26	1,07	25,51	± 29,92	1,17
15.6	12,50	± 17,68	1,41	14,67	± 14,60	1,00	40,76	± 22,29	0,55
15.7	10,42	± 14,73	1,41	14,67	± 14,60	1,00	14,67	± 14,60	1,00
15.9	22,92	± 20,62	0,90	25,00	± 17,68	0,71	29,17	± 11,79	0,40
16.2	18,75	± 8,84	0,47	18,75	± 8,84	0,47	15,83	± 12,96	0,82
16.3	21,29	± 0,64	0,03	26,35	± 3,99	0,15	14,58	± 20,62	1,41
17.1	14,58	± 8,84	0,61	19,35	± 13,89	0,72	14,58	± 20,62	1,41
17.2	12,50	± 5,89	0,47	12,50	± 5,89	0,47	15,15	± 2,14	0,14
17.3	14,58	± 8,84	0,61	14,76	± 8,58	0,58	21,20	± 5,38	0,25
17.4	14,58	± 4,73	1,01	14,58	± 14,73	1,01	16,76	± 17,55	1,05
17.5	8,33	± 5,89	0,71	10,42	± 8,84	0,85	18,75	± 20,62	1,10
18.1	6,25	± 2,95	0,47	6,67	± 2,36	0,35	4,17	± 5,89	1,41
20.1	14,95	± 3,46	0,23	11,46	± 7,37	0,64	17,56	± 4,63	0,26
20.2	14,58	± 14,73	1,01	15,00	± 14,14	0,94	15,00	± 14,14	0,94
20.3	10,42	± 2,95	0,28	10,42	± 2,95	0,28	10,80	± 2,41	0,22
20.4	8,33	± 5,89	0,71	12,95	± 12,43	0,96	12,95	± 12,43	0,96
20.5	10,42	± 8,84	0,85	10,51	± 8,71	0,83	10,51	± 8,71	0,83
20.6	20,83	± 5,89	0,28	27,08	± 8,84	0,33	19,26	± 6,03	0,31
20.7	8,33	± 5,89	0,71	12,99	± 6,59	0,51	8,01	± 0,45	0,06
20.8	6,25	± 2,95	0,47	6,25	± 2,95	0,47	6,25	± 2,95	0,47
22.1	6,25	± 8,84	1,41	12,50	± 17,68	1,41	12,50	± 17,68	1,41
22.2	8,33	± 5,89	0,71	10,42	± 8,84	0,85	10,61	± 8,57	0,81
22.3	2,08	± 2,95	1,41	6,25	± 2,95	0,47	6,55	± 2,53	0,39
22.4	6,25	± 8,84	1,41	6,25	± 8,84	1,41	6,25	± 8,84	1,41
27.1	6,25	± 8,84	1,41	6,25	± 8,84	1,41	6,25	± 8,84	1,41
27.2	4,17	± 0,00	0,00	4,36	± 0,27	0,06	11,17	± 9,91	0,89
29.2	4,17	± 0,00	0,00	4,17	± 0,00	0,00	2,08	± 2,95	1,41

29.2	2,08	± 2,95	1,41	2,08	± 2,95	1,41	0,00	± 0,00	0,00
30.1	12,50	± 5,89	0,47	12,86	± 6,40	0,50	14,95	± 3,46	0,23
30.2	20,83	± 5,89	0,28	29,17	± 11,79	0,40	29,17	± 11,79	0,40
30.3	6,34	± 2,82	0,44	10,60	± 2,69	0,25	6,25	± 8,84	1,41
30.4	17,23	± 5,09	0,30	17,21	± 16,90	0,98	21,25	± 11,20	0,53
30.5	16,67	± 11,79	0,71	14,58	± 20,62	1,41	14,58	± 20,62	1,41
31.1	12,77	± 0,38	0,03	10,71	± 8,42	0,79	8,33	± 11,79	1,41
33.1	6,25	± 8,84	1,41	10,42	± 14,73	1,41	10,42	± 14,73	1,41
33.2	16,67	± 0,00	0,00	19,35	± 13,89	0,72	21,43	± 16,84	0,79
33.3	10,42	± 2,95	0,28	12,50	± 5,89	0,47	12,68	± 5,64	0,44
33.4	14,58	± 14,73	1,01	18,75	± 20,62	1,10	20,83	± 23,57	1,13
33.5	6,25	± 2,95	0,47	12,59	± 11,66	0,93	14,67	± 14,60	1,00
34.1	10,42	± 2,95	0,28	14,76	± 8,58	0,58	16,85	± 11,53	0,68
34.2	16,67	± 5,89	0,35	18,75	± 8,84	0,47	18,75	± 8,84	0,47
34.3	10,42	± 8,84	0,85	14,58	± 14,73	1,01	14,58	± 14,73	1,01
34.4	6,25	± 8,84	1,41	10,42	± 2,95	0,28	12,50	± 0,00	0,00
34.5	10,42	± 2,95	0,28	8,90	± 6,70	0,75	10,91	± 9,53	0,87
34.6	14,58	± 14,73	1,01	19,13	± 14,20	0,74	19,35	± 13,89	0,72
35.1	18,75	± 2,95	0,16	17,23	± 5,09	0,30	15,18	± 8,00	0,53
35.2	10,42	± 8,84	0,85	14,67	± 14,60	1,00	14,77	± 14,46	0,98
35.3	12,50	± 17,68	1,41	12,50	± 17,68	1,41	14,58	± 20,62	1,41
35.4	10,51	± 8,71	0,83	14,77	± 14,46	0,98	14,58	± 20,62	1,41
36.1	8,33	± 5,89	0,71	8,42	± 5,76	0,68	8,63	± 5,47	0,63
36.2	19,02	± 8,45	0,44	17,76	± 10,23	0,58	18,75	± 8,84	0,47
36.3	13,26	± 6,96	0,53	16,23	± 0,62	0,04	16,67	± 0,00	0,00
DLA1	0,00	± 0,00	0,00	0,00	± 0,00	0,00	0,00	± 0,00	0,00
DLA4	12,77	± 0,38	0,03	0,00	± 0,00	0,00	0,00	± 0,00	0,00
DLA10	12,50	± 0,00	0,00	12,50	± 0,00	0,00	12,50	± 0,00	0,00
DLB1	12,50	± 0,00	0,00	12,50	± 0,00	0,00	12,50	± 0,00	0,00
DLB2	16,67	± 0,00	0,00	18,75	± 8,84	0,47	24,17	± 22,39	0,93
DLB3	12,50	± 0,00	0,00	4,86	± 0,98	0,20	4,86	± 0,98	0,20
DLB4	4,17	± 0,00	0,00	10,83	± 3,54	0,33	10,83	± 3,54	0,33
DLB5	8,33	± 0,00	0,00	4,46	± 0,42	0,09	13,39	± 1,26	0,09
DLB6	8,33	± 0,00	0,00	12,50	± 0,00	0,00	16,67	± 0,00	0,00
DLB7	12,50	± 0,00	0,00	16,67	± 0,00	0,00	16,67	± 0,00	0,00
DLB8	12,50	± 0,00	0,00	5,42	± 1,77	0,33	10,83	± 3,54	0,33

Se llevó a cabo un Análisis de Variancia de una vía, con las dos repeticiones de los bioensayos de las 115 cepas bacterianas a 15 días de iniciados los experimentos en larvas. El análisis mostró que no existen diferencias significativas entre las diferentes cepas (grupos) (p>0,870; F= 0,824; Tabla 3), incluyendo los controles negativos, también tomados en cuenta en el análisis, lo que significa que ninguna cepa difiere significativamente de las otras en cuanto a su porcentaje de mortalidad al final de los bioensayos. Además, se realizó una prueba de significación de Tukey, que dio como resultado un solo grupo, corroborando el resultado del ANOVA.

TABLA 3

Resultados del análisis de variancia (ANOVA) para el porcentaje de mortalidad de las 115 cepas bacterianas, 15 días después de iniciado el bioensayo en larvas de C. capitata

Mortalidad	Suma de cuadrados	df	Cuadrado medio	F	Sign.
Entre grupos	15442,537	116	133,125	,824	,870
Dentro grupos	28612,542	177	161,653		
Total	44055,080	293			

En el transcurso de las repeticiones de los bioensayos con larvas de *C. capitata* con un grupo de cepas hubo una pequeña variación en la metodología seguida. Por circunstancias ajenas a la voluntad de los inventores no se pudo iniciar el bioensayo de las cepas comprendidas entre la 12.7 y 29.1, dado que se carecía de larvas de *C. capitata* de primer estadio. Dado que las placas con dieta contaminada con cada una de las cepas estaban ya preparadas cuando se observó el problema de las larvas, se decidió conservarlas a 4°C a la espera de poder iniciar el experimento.

Sorprendentemente el comportamiento de la cepa 15.1 fue completamente diferente al introducir esta pequeña variación en la metodología. Dicha cepa mostró un porcentaje de mortalidad de 78% y 100% a los 10 y 15 días respectivamente después de iniciado el bioensayo (Fig. 3). Además, se pudo observar que las larvas de este bioensayo mostraron necrosis evidente en todo su cuerpo. Debido a este sorprendente resultado se decidió identificar y caracterizar la cepa 15.1, y comprobar de nuevo que la exposición de esta cepa al frío aumentaba de forma drástica su toxicidad frente a larvas de *C. capitata.*

Para la identificación de esta cepa bacteriana se extrajo el ADN total, y se amplificó una secuencia del gen 16S mediante PCR. Una vez se recuperó el ADN del gel, se realizó otra electroforesis en gel de agarosa (0,8%), con el objetivo de comprobar el éxito de recuperación, para lo cual se usaron 8 μL del ADN.

Posteriormente el fragmento purificado fue cuantificado espectofotométricamente obteniéndose una concentración de 28,3 ng/μL. Dicha preparación de ADN fue secuenciada con los *primers* 533F y 16SB1 en el Servicio de Secuenciación del Departamento de Genética de la Universidad de Granada. La secuencia obtenida fue comparada con la base de datos mediante el programa BLAST, disponible en el servidor del Nacional Center for Biotechnology Information de Estados Unidos. La secuencia mostró un 100 de identidad con el ARN ribosómico 16S de la cepa *B. pumilus* BPT-18.

Los métodos de extracción, amplificación y purificación de ADN se llevaron a cabo mediante protocolos conocidos en el estado de la técnica.

Con objeto de reproducir los resultados de elevada mortalidad en larvas, obtenidos anteriormente con *B. pumilus*, se llevó a cabo un experimento con cultivos liofilizados (concentrados) en placas de bioensayos no expuestas y expuestas a 4°C durante 96 horas. El experimento completo fue repetido dos veces. Los bioensayos se revisaron después de 4, 10 y 15 días después de iniciados. Cada repetición estuvo compuesta por 24 larvas distintas; con *B. pumilus* se realizaron 4 repeticiones, y 2 repeticiones para sus controles negativos (*B. thuringiensis* 78/11 y medio T3 líquido).

Se calculó la media de los porcentajes de mortalidad y se llevó a cabo un análisis de variancia de una vía con los datos de mortalidad a 15 días de iniciado el bioensayo, para 0 y 96 horas de exposición de los cultivos al frío. También se realizó una prueba de significación de Tukey, con los dos tiempos de exposición a 4°C analizados por separado.

Los bioensayos con *B. pumilus* expuestos durante 96 horas a 4°C tienen como promedio de mortalidad 84,38% después de 15 días de iniciado los bioensayos (Figura 3), con valores máximos de 100% y un valor mínimo de 54,17%; mientras que los bioensayos con esta especie bacteriana y *no sometidos al frío* tuvieron de media de porcentaje de

mortalidad un 6,25%. De la misma manera, los resultados de los bioensayos con Bt 78/11 expuestos 96 horas al frío fueron elevados (media de 70,83%, con un valor máximo de 79,17%), mientras que los no sometidos a frío obtuvieron una media de 8,33% de mortalidad (Fig. 3). El medio líquido T3 causó una mortalidad media de 25% a 96 horas de exposición a 4ºC, y 8,51% de mortalidad media los bionsayos no expuestos al frío (Fig. 3). En este experimento, la mortalidad de los bioensayos con *B. pumilus* y *B. thuringiensis* 78/11 sometidos a 96 horas de exposición a 4ºC fue conspicuamente elevada en comparación con la mortalidad de los bioensayos de las mismas especies bacterianas que no fueron sometidos a un tratamiento de frío.

Lo anteriormente expuesto se corrobora con el resultado del ANOVA de una vía, llevado a cabo para este experimento. Existen diferencias significativas entre la mortalidad causada por cultivos liofilizados de *B. pumilus*, Bt 78/11 y medio líquido T3, expuestos 96 horas a 4ºC ($p>0,031$; $F= 7,552$; Tabla 4). De la misma manera, la prueba de significación de Tukey agrupó las medias de la mortalidad *B. pumilus* y Bt 78/11 de los bioensayos que permanecieron a 4ºC durante 96 horas, mientras que T3 conformo un grupo independiente.

Para los bioensayos de los cultivos que no permanecieron a 4ºC, no se registraron diferencias significativas ($p>0,829$; $F= 0,829$; Tabla 4). Así también, los resultados de la prueba de Tukey mostraron que *B. pumilus* y los dos controles fueron colocados dentro del mismo grupo, en relación a la media de la mortalidad registrada 15 días después de iniciado el experimento.

TABLA 4

Resultados del análisis de variancia (ANOVA) del porcentaje de mortalidad de cultivos liofilizados de B. pumilus y controles negativos 0 y 96 horas expuestos a 4ºC, 15 días después de iniciado el bioensayo en larvas de C. capitata

Tiempo	Mortalidad	Suma de cuadrados	df	Cuadrado medio	F	Sign.
0h	Entre grupos	9,494	2	4,747	,195	,829
	Dentro grupos	121,541	5	24,308		
	Total	131,034	7			
96h	Entre grupos	4759,146	2	2379,573	7,552	,031
	Dentro grupos	1575,438	5	315,088		
	Total		7			

Estos resultados demuestran que el aumento de la concentración de los cultivos y la exposición de *B. pumilus* a condiciones de estrés (bajas temperaturas, pH extremo de la dieta y alta osmolaridad) ocasiona el incremento en la mortalidad de larvas de *C. capitata*. También, se registró un aumento de la mortalidad de los bioensayos con *B. thuringiensis* 78/11 expuestos a 4ºC, lo que sugiere un patrón común de comportamiento de estas dos especies pertenecientes al género *Bacillus*.

Mantenimiento de la colonia de C. capitata

Los adultos fueron mantenidos en una habitación insectario en cajas de metacrilato (40 cm x 30 cm x 28 cm), bajo un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, con una humedad relativa de 50 ± 5% y temperatura promedio de 25 ± 2ºC, siguiendo las recomendaciones de Jaldo *et al.* 2001 (Mass rearing of Anastrepha fraterculus (Diptera: Tephritidae): a preliminary strategy. *Florida Entomologist*, 84 (4): 716 - 718). Las moscas adultas fueron alimentadas con dieta artificial de autolisado de levadura y sacarosa, en una relación de 1:4 (w/w). Los huevos depositados a través de una tela (que simula la piel de las frutas) colocada en la pared frontal de la caja, se recogieron en contenedores plásticos con agua destilada. La dieta artificial para larvas contuvo 200 g de salvado de trigo, 50 g de sacarosa, 25 g de levadura de cerveza, 2 g de Nipagin, 2 g de Nipasol, 7,5 mL de HCL 37% y 500 mL de H_2O destilada. Esta cantidad de dieta fue suficiente para alimentar las larvas procedentes de 0,5 mL de huevos de *C. capitata*.

Las larvas se desarrollaron en condiciones de densidad relajada. Cuando las larvas alcanzaron el tercer estadio larvario, los cultivos fueron colocados en cajas de pupación, cuyo suelo está cubierto con 4 cm de arena filtrada estéril, para permitir que las larvas salten del medio donde crecieron, ingresen en la arena y pupen. El tiempo de desarrollo desde huevo a adulto bajo estas condiciones fue de aproximadamente 21 días. Después de 7 a 10 días en la caja de pupación, y antes de que emergieran los adultos, las pupas fueron coladas de la arena, y colocadas en placas Petri,

dentro de una nueva caja de cría para adultos, conteniendo dieta artificial y agua destilada, si eran para continuar con la colonia, o en cajas de caza, sin alimento y sin agua, si los adultos se iban a utilizar en bioensayos.

Recolección de muestras de campo

Se recogieron 37 muestras de campo de distinta naturaleza (tierra de cultivo, agua de acequia, polvo de carretera, insectos muertos, hojas de plantas, restos vegetales, arena de playa, agua de mar, cenizas, etc.) de zonas de cultivo de la localidad de Almuñecar (provincia de Granada). Las muestras fueron almacenadas en bolsas de plástico herméticas previamente rotuladas, llevadas al laboratorio y almacenadas a 4ºC hasta su procesamiento.

Aislamiento y selección de cepas de B. thuringiensis

Para el aislamiento de *B. thuringiensis* se siguió la metodología propuesta por Travers *et al.* 1987 (Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (6): 1263 - 1266). Este método de selección se basa en que la germinación de las esporas de *B. thuringiensis* es inhibida selectivamente por acetato de sodio, mientras que el resto de cepas bacterianas formadoras de esporas germinan. Tras ello, todas las cepas germinadas son eliminadas por un tratamiento de calor. Las esporas que han sobrevivido son sembradas en placas Petri con medio LB, lo que les permite germinar y crecer.

Para el aislamiento de cepas de *B. thuringiensis* de las muestras recolectadas en el campo, se siguió el siguiente procedimiento: medio gramo de muestra se colocó en un matraz conteniendo 10 mL de LB con 0,25 M de acetato sódico. La suspensión se mantuvo 4 horas en agitación a 250 rpm y 30ºC de temperatura. Un mililitro y medio de suspensión se calentó a 80ºC en un baño de agua durante 10 minutos. Posteriormente, 4 diluciones seriadas de la mezcla original se sembraron en placas de LB. Dichas placas fueron incubadas 12-24 horas a 30ºC.

Las cepas obtenidas se sembraron por agotamiento en una placa fresca de LB. Se realizó una primera selección visual eligiendo aquellas colonias que presentaron similitud morfológica con *B. thuringiensis*. Posteriormente, cada cepa fue inoculada en 3 mL de medio de esporulación T3 e incubada a 30ºC y 240 rpm durante 72 horas. Los cultivos fueron observados al microscopio de contraste de fase, bajo el objetivo de 100x, para determinar la morfología de la espora.

Aislamiento de bacterias a partir de larvas muertas de C. capitata

El aislamiento de bacterias del interior del cuerpo de las larvas muertas de *C. capitata* encontradas en muestras de campo se realizó de la siguiente manera:

Inicialmente, cada larva fue esterilizada superficialmente mediante 3 incubaciones de 5 minutos con 1 mL de etanol al 70%. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con 1 mL de H_2O destilada estéril con objeto de eliminar el etanol. Cada larva se maceró en condiciones estériles. El producto de maceración se resuspendido en 1 mL de LB y se sembraron diluciones seriadas de la suspensión original en placas de LB.

Tanto las cepas aisladas de las muestras de campo como las aisladas de las larvas muertas de *C. capitata* fueron conservadas en una solución de Glicerol al 40% (v/v) a -80ºC. Además, a corto plazo, y para la utilización en la evaluación de su entomopatogenicidad fueron conservadas en cultivos en estría en placas Petri de medio LB sólido a 4ºC.

Medios de cultivo de aislados bacterianos

Para el cultivo de bacterias se utilizaron principalmente dos medios, un medio rico y un medio de esporulación. Ambos medios fueron esterilizados en autoclave por calor húmedo antes de su utilización. El medio rico utilizado fue el LB, Luria-Bertani, cuya composición fue: Triptona, 8 g; Extracto de Levaduras, 2 g; NaCl, 2 g; Agar, 6 g (si se requiere medio sólido); H_2O hasta 400 mL. El medio de esporulación utilizado fue T3. La composición de este medio es la siguiente: Triptona, 1,2 g; Triptosa, 0,8 g; Extracto de Levadura, 0,6 g; Fósfato sódico 0.5M (pH 6,8), 40 mL, MnCl 5 g/l, 400 μL; Agar 6 g (si se requiere medio sólido); H_2O hasta 400 mL.

Evaluación de la toxicidad de los aislados bacterianos

a) *Bioensayos con larvas*

Para la evaluación de la toxicidad de los aislados bacterianos en larvas de *C. capitata* se llevaron a cabo bioensayos en laboratorio, utilizando ejemplares de primer estadio larvario, de tamaño uniforme, criadas durante 72 horas en la dieta artificial anteriormente descrita.

Para estos bioensayos, los aislados bacterianos fueron inoculados en 3 mL de medio T3, e incubados a 30ºC y 240 rpm durante 72 horas, hasta completa esporulación del cultivo. Cien microlitros de cada cultivo fueron alicuotados en el pocillo de una Microplaca Cellstar® (Greiner Bio-One), estéril de 48 pocillos y libre de DNasas y RNasas. Se utilizaron 24 pocillos para la evaluación de cada una de las cepas bacterianas. Una vez colocados los 100 μL del cultivo en cada uno de los pocillos, se añadieron 500 μL de una mezcla homogénea de Agar en una concentración de 1,6 g en

100 mL de H_2O destilada, y la siguiente dieta artificial: Salvado de trigo, 52 g; Sacarosa, 20 g; Levadura de cerveza, 10 g; H_2O destilada, 100 mL; HCL 37%, 1,5 mL. Tanto la dieta como el agar estaban previamente autoclavados. Mientras se manipuló y alicuotó la dieta, esta mezcla se mantuvo en Baño María a 50ºC, para evitar su solidificación. Una vez colocada la dieta en la Microplaca se usó un palillo estéril para homogeneizar la dieta con el inóculo, antes de su solidificación. Finalmente, una vez se solidificó la dieta mezclada con agar, con otro palillo se colocó una larva en cada pocillo, y se cerró la Microplaca con film plástico transparente tensado, para evitar que las larvas escapen. Las soluciones y todo el material usado fueron previamente autoclavados.

Los bionsayos se revisaron 4, 10 y 15 días después de iniciados, para registrar la mortalidad de las larvas. Se realizaron dos repeticiones con cada uno de los aislados bacterianos, en cada repetición se usaron 24 larvas. Los bioensayos se mantuvieron en incubador a 25ºC durante todo el experimento.

b) *Bioensayos con adultos*

Para la evaluación de la toxicidad de los aislados bacterianos en adultos de *C. capitata* se usaron individuos eclosionados en un período máximo de 24 horas antes de ser utilizados en el bioensayo y no provistos de dieta.

Para estos bioensayos, las cepas fueron inoculadas en 7 mL de medio T3, e incubadas a 30ºC y 240 rpm durante 144 horas, con el objetivo de obtener un cultivo completamente esporulado. La presencia de esporas fue monitorizada mediante un microscopio óptico de contraste de fase. Todo el volumen del inóculo se colocó en botes de cristal estériles. Se colocó una bayeta absorbente, para que el cultivo pueda ser bebido por las moscas adultas sin ahogarse. El bioensayo se llevo a cabo en cajas de plástico agujereadas para permitir una aireación adecuada. Además, se les proveyó de dieta sólida para adultos, preparada como se describió anteriormente. Por cada aislado bacteriano se utilizaron 10 moscas adultas, 5 machos y 5 hembras, para eliminar el posible efecto de atrayentes diferenciales por sexo. Todo el material usado en el bioensayo fue previamente autoclavado.

Los bionsayos se revisaron diariamente durante 20 días para registrar la mortalidad. Se realizó una repetición con cada uno de los aislados bacterianos. Los bioensayos se mantuvieron en el insectario, bajo las condiciones anteriormente descritas para las cajas de cría de moscas.

c) *Análisis estadísticos de la evaluación de toxicidad de los aislados bacterianos*

Se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación (CV: desviación estándar/media) de las dos repeticiones de bioensayos con larvas, con cada una de las 115 cepas evaluadas, a 4, 10 y 15 días después de iniciados los experimentos. Se tomo en cuenta que más de 1.5% en el CV se considera un valor elevado, que refleja que las repeticiones no son fiables, y no podrían ser consideradas réplicas.

Se utilizaron 24 larvas (o 24 pocillos de Microplaca) por cada tratamiento; se considero como una repetición a 24 pocillos, y se realizaron dos repeticiones de cada tratamiento. Cada aislado bacteriano fue considerado un tratamiento.

Los datos de mortalidad de larvas en las dos repeticiones, con los 115 aislados bacterianos, a 15 días de iniciados los experimentos fueron sometidos a Análisis Variancia de una vía (ANOVA-one way). Además, se realizó una prueba de significación de Tukey, con el objetivo de observar como se agrupan las medias de la mortalidad de las diferentes cepas bacterianas evaluadas.

REIVINDICACIONES

1. Método para incrementar la patogenicidad de cepas bacterianas del género *Bacillus* que comprende exponer la cepa a temperaturas inferiores a 25ºC.

2. Método según la reivindicación 1, donde la exposición se realiza a temperaturas inferiores a 20ºC.

3. Método según la reivindicación 2, donde la exposición se realiza a temperaturas inferiores a 15ºC.

4. Método según la reivindicación 3, donde la exposición se realiza a temperaturas inferiores a 10ºC.

5. Método según la reivindicación 4, donde la exposición se realiza a temperaturas iguales o inferiores a aproximadamente 4ºC.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde las cepas bacterianas se cultivan en un medio con un pH igual o menor a 5.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde las cepas bacterianas se cultivan en un medio con un pH de entre 2 y 4.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde las cepas bacterianas se cultivan en un medio con una concentración de solutos igual o mayor a 250 mM.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde las cepas bacterianas se cultivan en un medio con una concentración de solutos de entre 350 mM y 1000 mM.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde las cepas bacterianas pertenecen a la especie *B. pumilus*.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde las cepas bacterianas pertenecen a la especie *B. thuringiensis*.

12. Cepas bacterianas del género *Bacillus* obtenibles por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1-11.

13. Composición que comprende cepas bacterianas según la reivindicación 12.

14. Uso de las cepas bacterianas según la reivindicación 12, o de la composición según la reivindicación 13, para el control biológico de plagas.

15. Uso de las cepas bacterianas o de la composición según la reivindicación 14, donde la plaga controlada es provocada por la mosca del Mediterráneo (*Ceratitis capitata*).

16. Uso de cepas bacterianas de la especie *Bacillus pumilus*, para el control biológico la plaga de *Ceratitis capitata*.

17. Uso de cepas bacterianas de la especie *Bacillus thuringensis*, para el control biológico de la plaga de *Ceratitis capitata*.

18. Uso de cepas bacterianas del género *Bacillus* con al menos un 95% de identidad con la región 16S del ARN de *Bacillus pumilus*, o un 95% de identidad con la región 16S del ARN de *Bacillus thuringensis*, para el control biológico de la plaga de *Ceratitis capitata*.

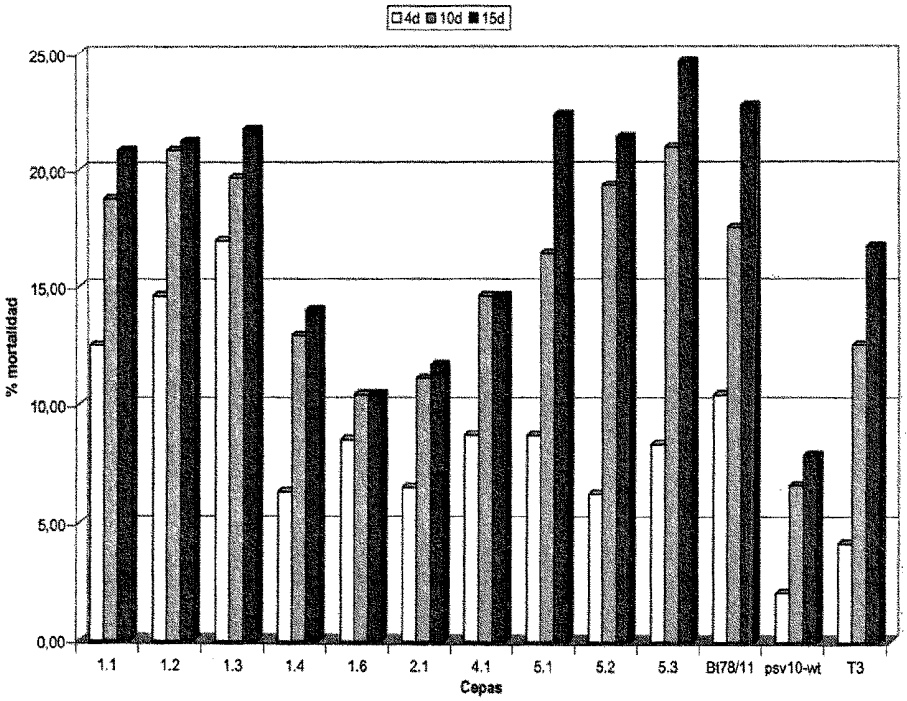
4d 10d 15d
25,00
20,00
15,00
10,00
5,00
0,00
% mortalidad
1.1
1.2
1.3
1.4
1.6
2.1
4.1
5.1
5.2
5.3
Bt78/11
psv10-wt
T3
Cepas

Fig. 1a

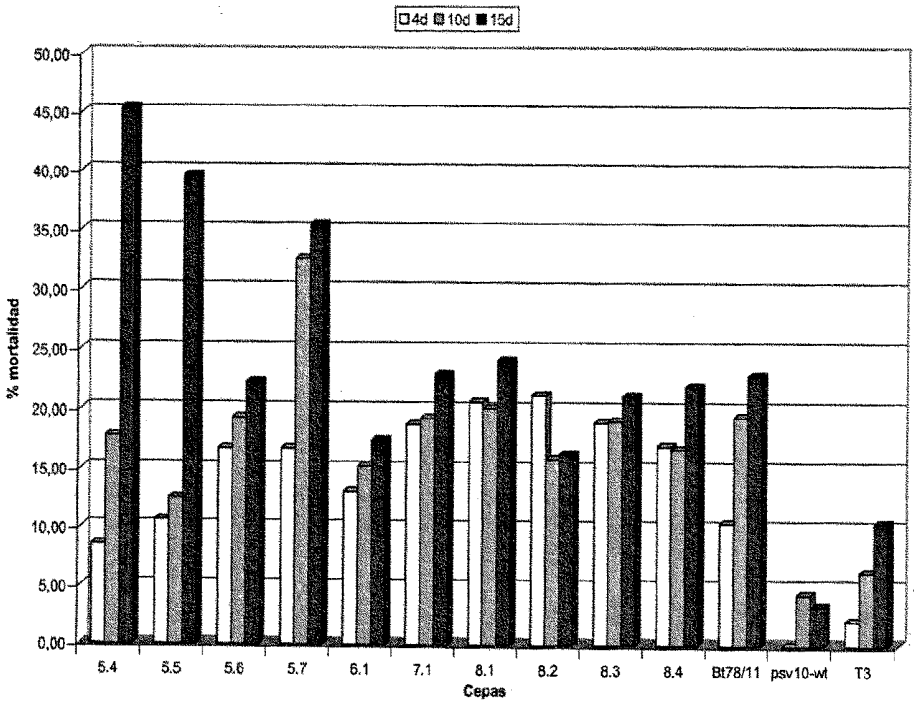
4d 10d 15d
50,00
45,00
40,00
35,00
30,00
25,00
20,00
15,00
10,00
5,00
0,00
% mortalidad
5.4
5.5
5.6
5.7
6.1
7.1
8.1
8.2
8.3
8.4
Bt78/11
psv10-wt
T3
Cepas

Fig. 1b

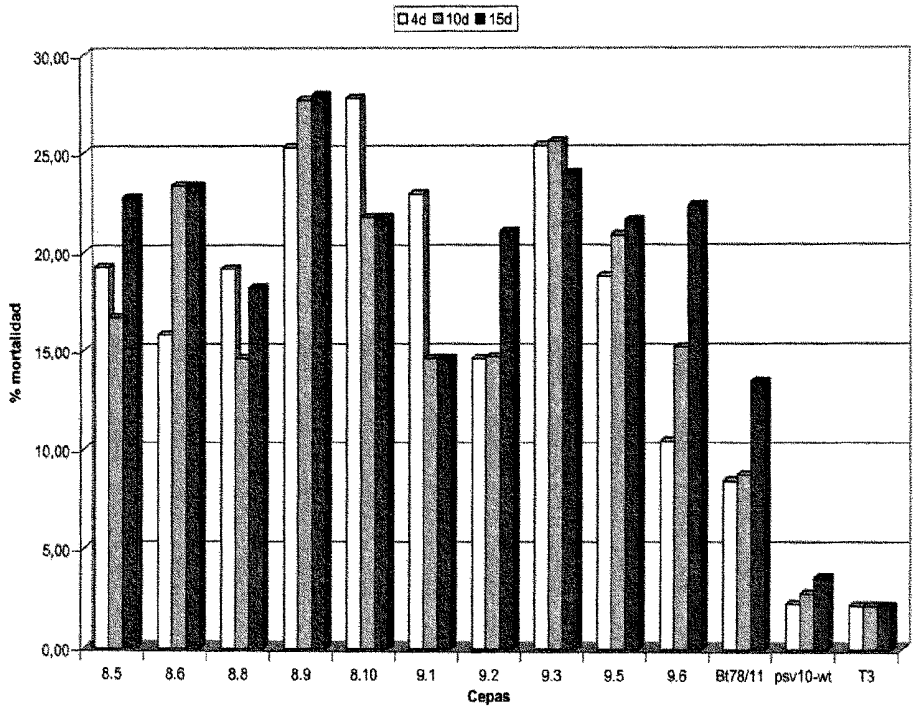
4d 10d 15d
30,00
25,00
20,00
15,00
10,00
5,00
0,00
% mortalidad
8.5
8.6
8.8
8.9
8.10
9.1
9.2
9.3
9.5
9.6
Bt78/11
psv10-wt
T3
Cepas

Fig. 1c

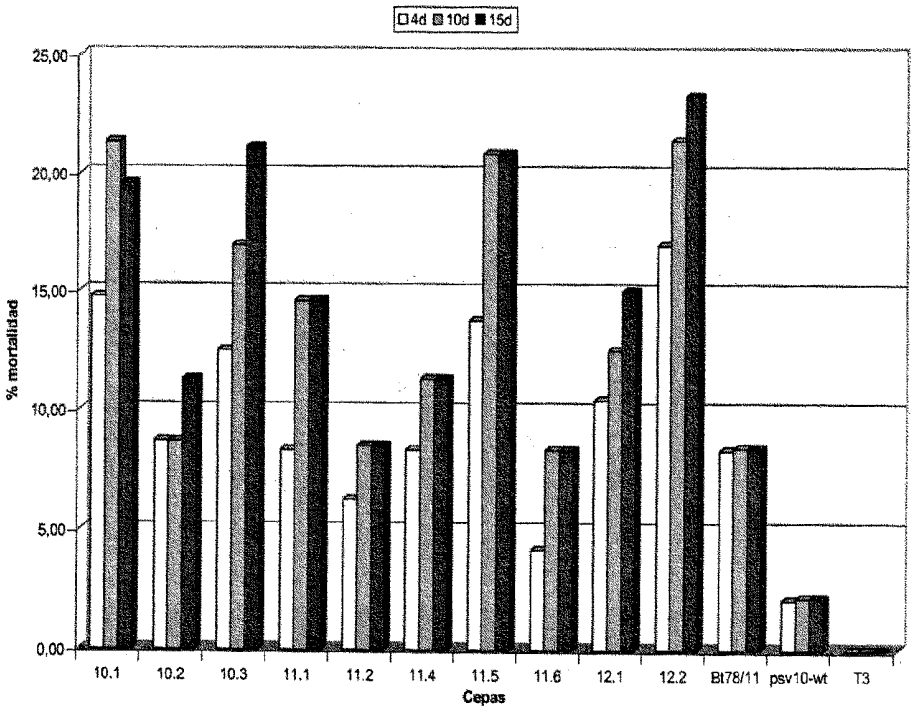
4d 10d 15d
25,00
20,00
15,00
10,00
5,00
0,00
% mortalidad
10.1
10.2
10.3
11.1
11.2
11.4
11.5
11.6
12.1
12.2
Bt78/11
psv10-wt
T3
Cepas

Fig. 1d

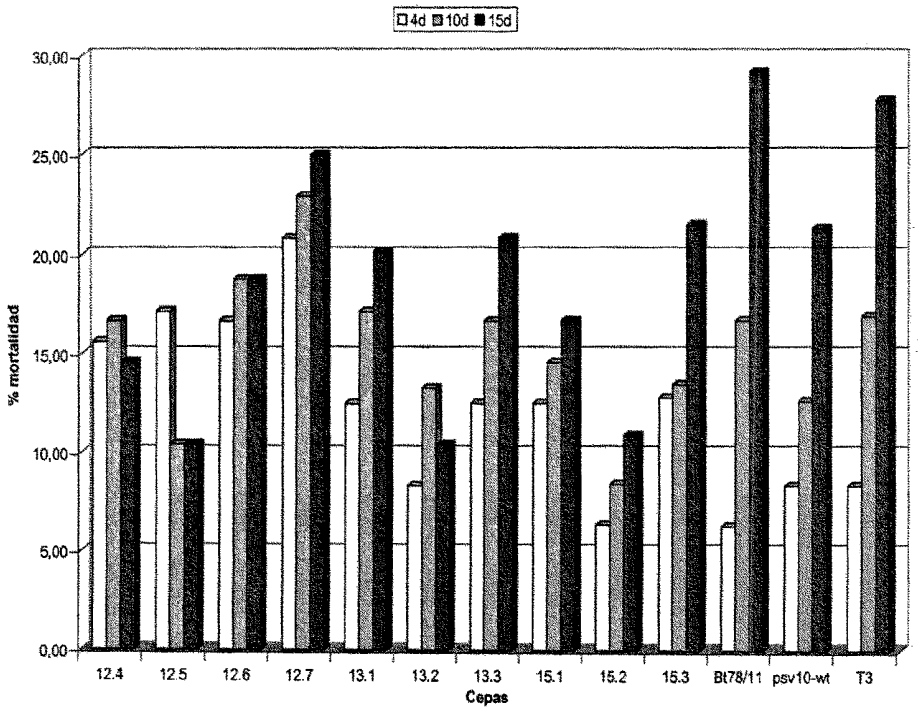
4d 10d 15d
30,00
25,00
20,00
15,00
10,00
5,00
0,00
% mortalidad
12.4
12.5
12.6
12.7
13.1
13.2
13.3
15.1
15.2
15.3
Bt78/11
psv10-wt
T3
Cepas

Fig. 1e

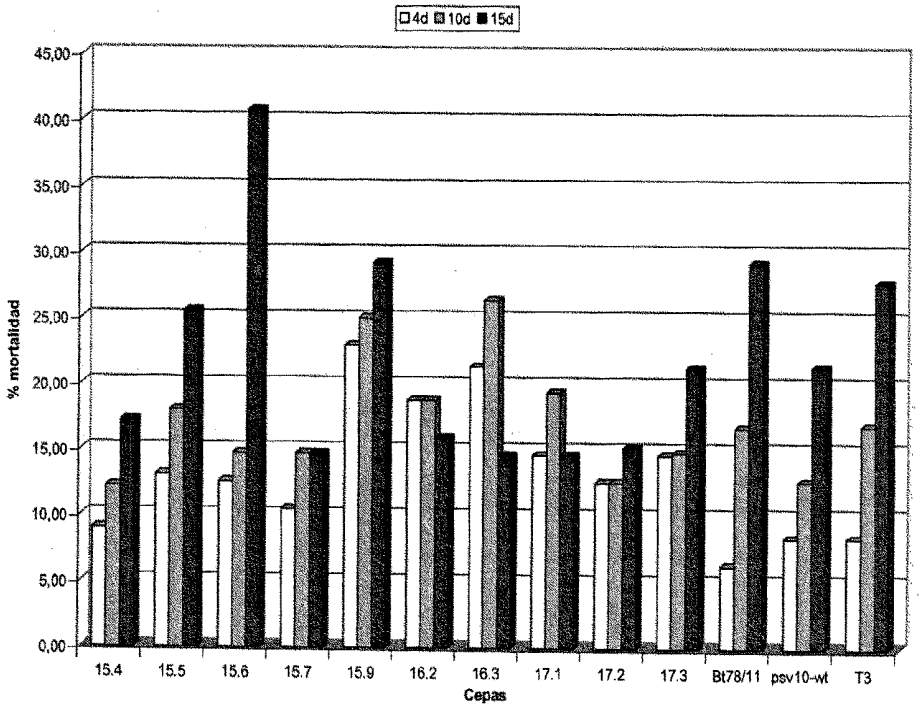
4d 10d 15d
45,00
40,00
35,00
30,00
25,00
20,00
15,00
10,00
5,00
0,00
% mortalidad
15.4
15.5
15.6
15.7
15.9
16.2
16.3
17.1
17.2
17.3
Bt78/11
psv10-wt
T3
Cepas

Fig. 1f

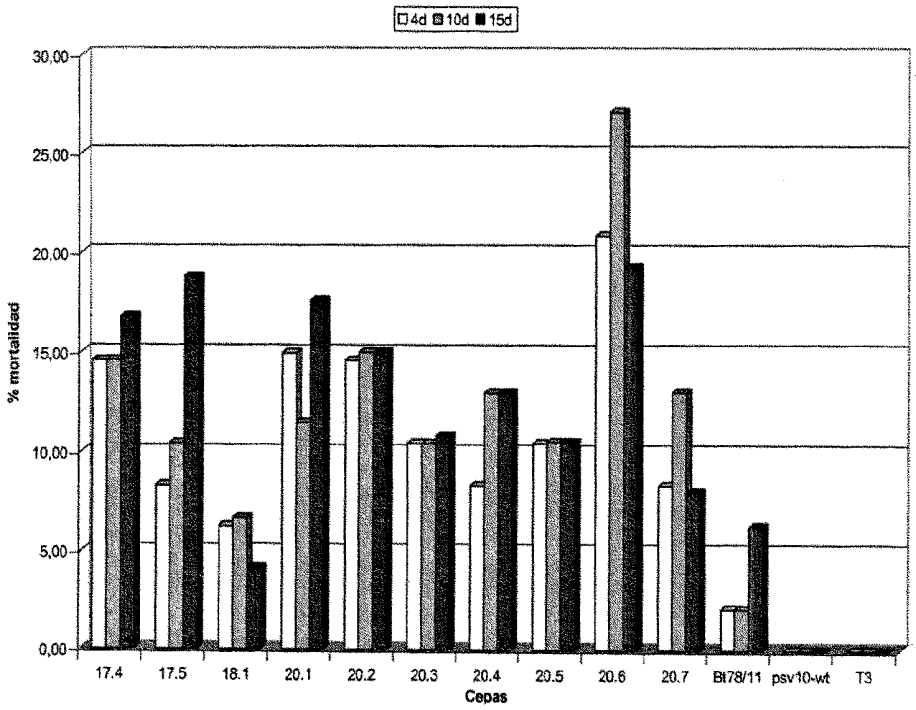
4d 10d 15d
30,00
25,00
20,00
15,00
10,00
5,00
0,00
% mortalidad
17.4
17.5
18.1
20.1
20.2
20.3
20.4
20.5
20.6
20.7
Bt78/11
psv10-wt
T3
Cepas

Fig. 1g

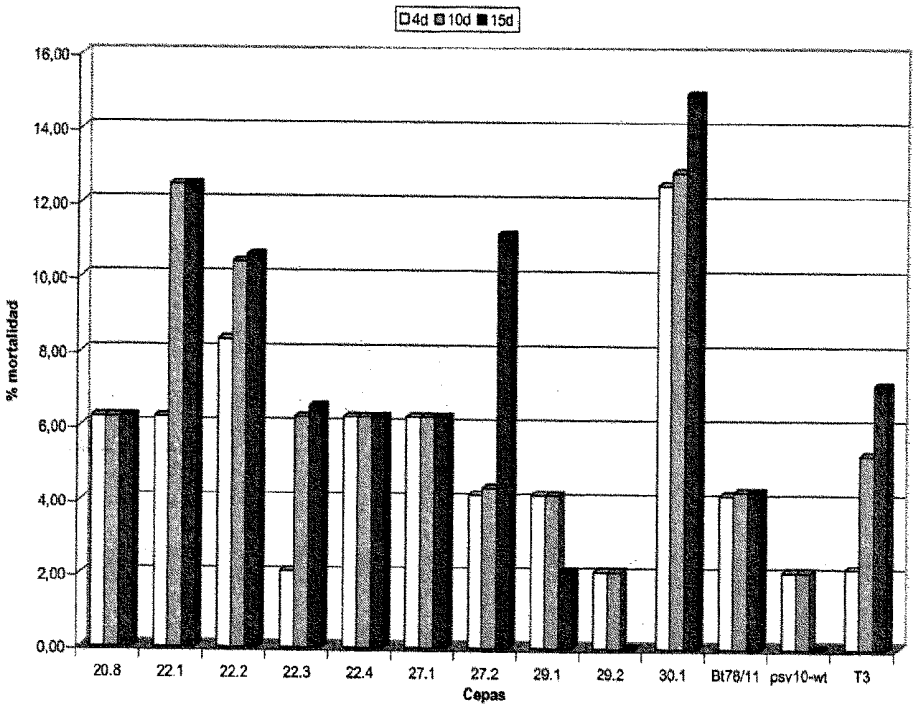
4d 10d 15d
16,00
14,00
12,00
10,00
8,00
6,00
4,00
2,00
0,00
% mortalidad
20.8
22.1
22.2
22.3
22.4
27.1
27.2
29.1
29.2
30.1
Bt78/11
psv10-wt
T3
Cepas

Fig. 1h

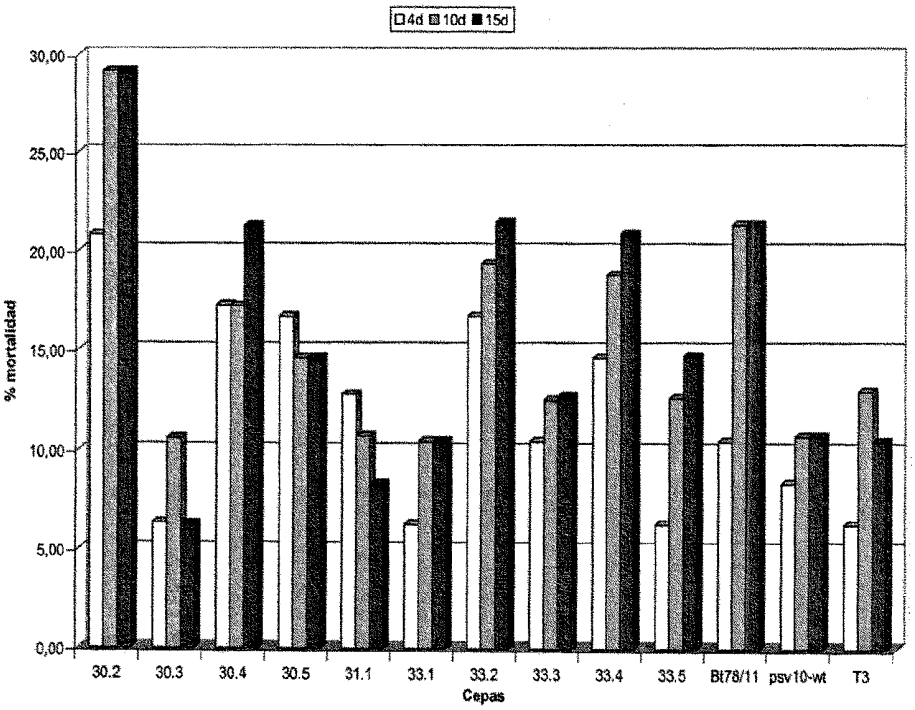
4d 10d 15d
30,00
25,00
20,00
15,00
10,00
5,00
0,00
% mortalidad
30.2
30.3
30.4
30.5
31.1
33.1
33.2
33.3
33.4
33.5
Bt78/11
psv10-wt
T3
Cepas

Fig. 1i

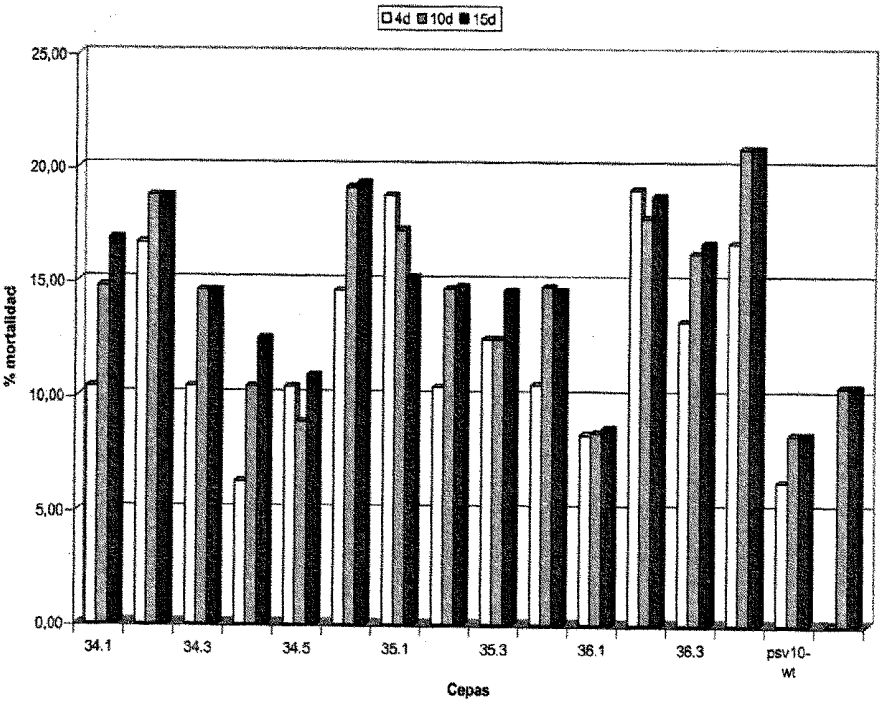
4d 10d 15d
25,00
20,00
15,00
10,00
5,00
0,00
% mortalidad
34.1
34.3
34.5
35.1
35.3
36.1
36.3
psv10-wt
Cepas

Fig. 1j

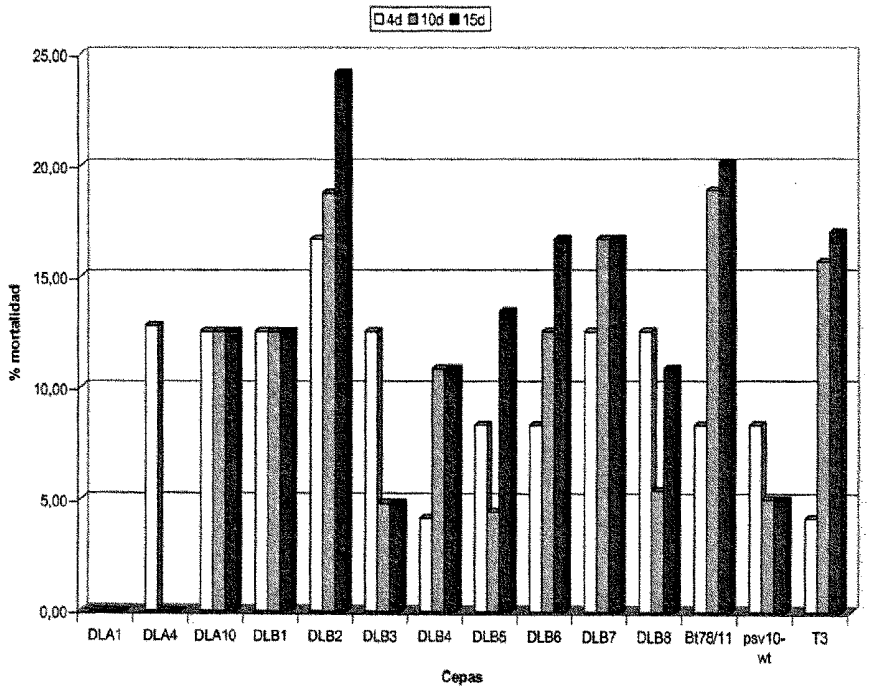
4d 10d 15d
25,00
20,00
15,00
10,00
5,00
0,00
% mortalidad
DLA1
DLA4
DLA10
DLB1
DLB2
DLB3
DLB4
DLB5
DLB6
DLB7
DLB8
Bt78/11
psv10-wt
T3
Cepas

Fig. 1k

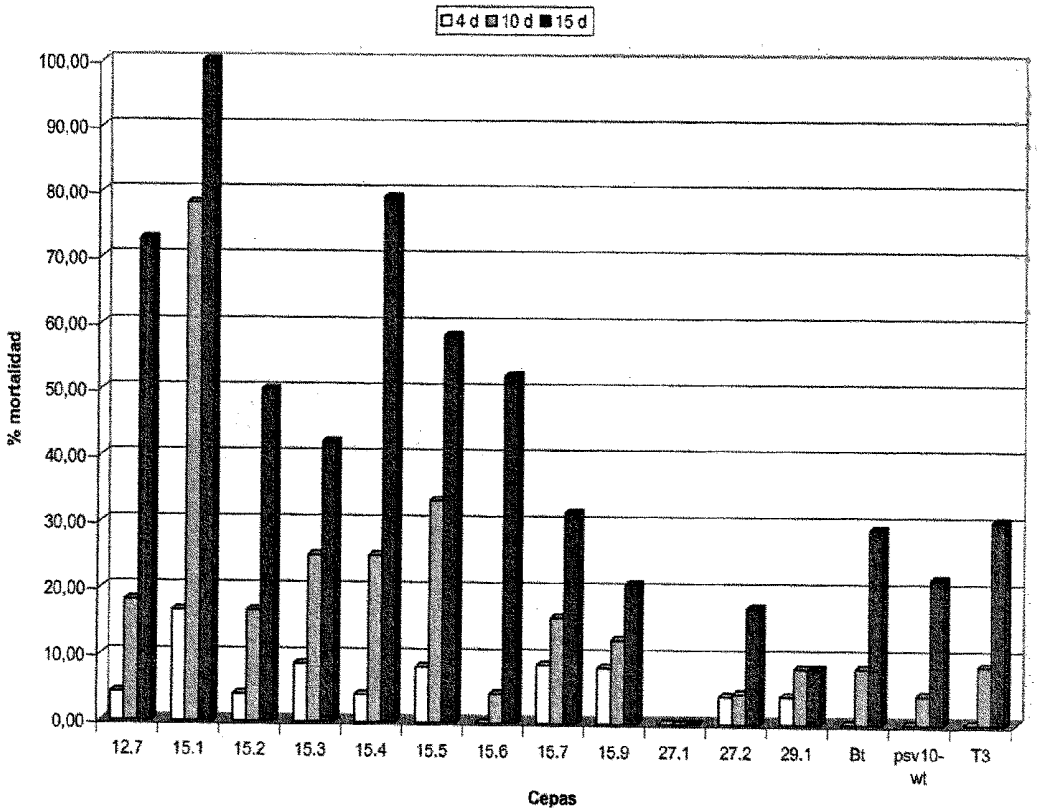
4 d 10 d 15 d
100,00
90,00
80,00
70,00
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
% mortalidad
12.7
15.1
15.2
15.3
15.4
15.5
15.6
15.7
15.9
27.1
27.2
29.1
Bt
psv10-wt
T3
Cepas

Fig. 2

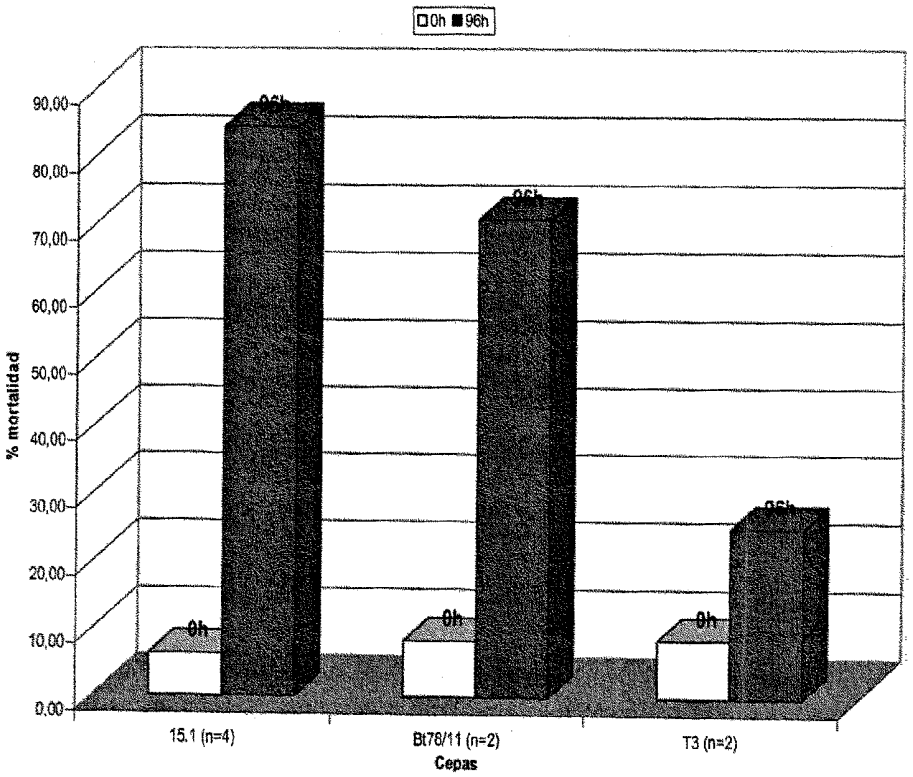
0h 96h
90,00
80,00
70,00
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
% mortalidad
96h
96h
96h
0h
0h
0h
15.1 (n=4)
Bt78/11 (n=2)
T3 (n=2)
Cepas

Fig. 3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Granada

<120> Método para incrementar la efectividad de cepas bacterianas

<130> ES1634.8

<160> 1

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 703
<212> DNA/RNA
<213> *Bacillus pumilus*

<400> 1

```
aagggctcgc aggcggtttc ttaagtctga tgtgaaagcc cccggctcaa ccggggaggg
60

tcattggaaa ctgggaaact tgagtgcaga agaggagagt ggaattccac gtgtagcggt
120

gaaatgcgta gagatgtgga ggaacaccag tggcgaaggc gactctctgg tctgtaactg
180

acgctgagga gcgaaagcgt ggggagcgaa caggattaga taccctggta gtccacgccg
240

taaacgatga gtgctaagtg ttagggggtt tccgcccctt agtgctgcag ctaacgcatt
300

aagcactccg cctggggagt acggtcgcaa gactgaaact caaaggaatt gacgggggcc
360

cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct taccaggtct
420

tgacatcctc tgacaaccct agagataggg ctttcccttc ggggacagag tgacaggtgg
480

tgcatggttg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa
540

cccttgatct tagttgccag cattcagttg ggcactctaa ggtgactgcc ggtgacaaac
600

cggaggaagg tggggatgac gtcaaatcat catgcccctt atgacctggg ctacacacgt
660

gctacaatgg acagaacaaa gggctgcaag accgcaaggt tta
703
```

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 326 779

(21) Nº de solicitud: 200801123

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **18.04.2008**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FINLAY, W.J.J. et al. *Bacillus cereus* Produces Most Emetic Toxin at Lower Temperatures. Letters in Applied Microbiology. 2000, Vol. 31, páginas 385-389. En particular página 387, columna 2, párrafos 3 y 4.	1-3,12-14
A		4-11,15-16
X	BRESOLIN, G. et al. Low Temperature-induced Insecticidal Activity of *Yersinia enterocolitica*. Mol. Microbiol. 2006. Vol. 59, número 2, páginas 503-512. En particular página 504, columna 1; página 507, columna 2; página 508; página 509, columna 1, párrafo 3.	1-3,12-14
A		4-11, 15-18
X	GINGRICH, R. E. Demonstration of *Bacillus thuringiensis* as a Potential Control Agent for the Adult Mediterranean Fruit Fly *Ceratitis capitata* (Wied.) Journal of Applied Entomology. 1987. Vol. 104, Número 4, páginas 378-385.	17-18
A	SONENSHEIN, A.L. CodY, Global Regulator of Stationary Phase and Virulence in Gram-positive Bacteria. Current Opinion in Microbiology. 2005. Vol. 8, páginas 203-207. En particular página 203, columna 2; página 205, cuadro 1 y página 206, columna 1, párrafo 4.	1-18
A	PHADTARE, S. Recent Developments in Bacterial Cold-Shock Response. Curr. Issues Mol. Biol. 2004. Vol. 6, páginas 125-136. En particular página 132.	1-18

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	Examinador	Página
25.09.2009	N. Urquía Fernández	1/7

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 326 779

(21) Nº de solicitud: 200801123

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **18.04.2008**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BAUM J. A. et al. Regulation of Insecticidal Cristal Protein Production in *Bacillus thuringiensis*. Mol. Microbiol. 2005. Vol. 18, número 1, páginas 1-12. En particular página 10, columna 2, párrafos 1 y 3.	1-18

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	Examinador	Página
25.09.2009	N. Urquía Fernández	2/7

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A01N 63/00 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)

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

A01N, C12N

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

INVENES, EPODOC, XPAIP, XPESP, XPOAC, BIOSIS, COMPDX, EMBASE, INSPEC, MEDLINE, PUBCHEM, GOOGLE SCHOLAR

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.09.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	4-11, 15-16	**SÍ**
	Reivindicaciones	1-3, 12-14, 17-18	**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	4-11, 15-16	**SÍ**
	Reivindicaciones	1-3, 12-14, 17-18	**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 ha sido publicada.

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	FINLAY, W.J.J. et al. *Bacillus cereus* Produces Most Emetic Toxin at Lower Temperatures. Letters in Applied Microbiology. 2000, Vol. 31, páginas 385-389. En particular página 387, columna 2, párrafos 3 y 4.	2000
D02	BRESOLIN, G. et al. Low Temperature-induced Insecticidal Activity of *Yersinia enterocolitica*. Mol. Microbiol. 2006. Vol. 59, número 2, páginas 503-512. En particular página 504, columna 1; página 507, columna 2; página 508, página 509, columna 1 párrafo 3.	2006
D03	GINGRICH, R. E. Demonstration of *Bacillus thuringiensis* as a Potential Control Agent for the Adult Mediterranean Fruit Fly *Ceratitis capitata* (Wied.) Journal of Applied Entomology. 1987. Vol. 104, Número 4, páginas 378-385.	1987
D04	SONENSHEIN, A.L. CodY, a Global Regulator of Stationary Phase and Virulence in Gram-positive bacteria. Current Opinion in Microbiology. 2005. Vol. 8, páginas 203-207. En particular página 203, columna 2, página 205, cuadro 1 y página 206 columna 1 párrafo 4.	2005
D05	PHADTARE, S. Recent Developments in Bacterial Cold-Shock Response. Curr. Issues Mol. Biol. 2004. Vol. 6, páginas 125-136. En particular página 132.	2004
D06	BAUM J. A. et al. Regulation of Insecticidal Cristal Protein Production in *Bacillus thuringiensis*. Mol. Microbiol. 2005. Vol. 18, número 1, páginas 1-12. En particular página 10, columna 2, párrafos 1 y 3.	2005

Observaciones sobre documentos:

D01 describe el aumento de la producción de toxina en *Bacillus aureus* con el descenso de temperatura (hasta 12C).

D02 describe el aumento de actividad insecticida inducido por la baja temperatura en *Yersinia enterocolitica* y la homología de las toxinas producidas con aquellas de *Bacillus thuringiensis*.

D03 describe la toxicidad de cepas de *B. thuringiensis* frente a *Ceratitis capitata*.

D04 describe el aumento de la virulencia en bacterias gram-positivas bajo condiciones de estrés nutricional.

D05 describe la producción de moléculas chaperonas y reguladores post-transcripcionales a bajas temperaturas, así como en respuesta a estreses osmóticos, oxidativos o bajo fase estacionaria de la bacteria.

D06 describe la implicación de moléculas chaperonas en la actividad tóxica de *Bacillus thuringiensis*, facilitando la acumulación de protoxinas de nueva síntesis en inclusiones cristalinas que aseguren su estabilidad.

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

1.1 Reivindicaciones 1 a 3.

Hoja adicional

El objeto de la invención recogido en las reivindicaciones 1 a 3 ha sido divulgado idénticamente en el documento D01 que describe un método para aumentar la actividad patogénica de bacterias del género *Bacillus*, que comprende exponer la cepa a bajas temperaturas de hasta 12 °C. De forma sorprendente, la producción de toxina emética en *Bacillus* es muy superior a 12 y 15°C que a cualquiera de las temperaturas mayores ensayadas (página 387, columna 2).

D02 describe un método para inducir la actividad insecticida de *Yersinia enterolítica* a bajas temperaturas, hasta 10°C. Indica igualmente que la producción de toxinas (en particular proteínas similares a Tc, o Tc-like) a baja temperatura se puede obtener no solo en *Yersinia* sino en otras bacterias que poseen genes Tc (página 508, columna 2). D02 indica igualmente que estas bajas temperaturas inducen en *Yersinia* la síntesis de toxinas con actividad insecticida oral comparables a las toxinas de *Bacillus thuringiensis* (proteínas similares a Tc, o Tc-like) (página 504, columna 1). Se considera que un experto en la materia intentaría combinar ambas informaciones divulgadas en D02 y tener una expectativa razonable de éxito en el aumento de la actividad insecticida de *Bacillus thuringiensis* con la bajada de las temperaturas hasta 10°C.

Las reivindicaciones 1 a 3 carecen por tanto de novedad y actividad inventiva conforme a los Artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes respectivamente.

1.2 Reivindicaciones 1 a 3 combinadas con reivindicaciones 12 a 14.

Por las razones descritas en los párrafos anteriores, D01 y D02 atacan la novedad y la actividad inventiva respectivamente de las cepas resultantes del método de las reivindicaciones 1 a 3.

Una composición que contiene dichas cepas carece igualmente de novedad y actividad inventiva.

En D02 se divulga el enorme incremento de la actividad insecticida de *Yersinia* inducida por las bajas temperaturas frente a larvas de *Manduca sexta*, el gusano del tabaco. El uso como plaguicida de las cepas y la composición de las reivindicaciones 12 y 13, carecen por tanto de actividad inventiva.

Las reivindicaciones 12, 13 y 14 no cumplen, por tanto, con los requisitos de novedad y actividad inventiva definidos en los Artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes respectívamente.

1.3 Reivindicaciones 17 y 18.

En D03 se describe la actividad insecticida de cepas de *Bacillus thuringiensis* frente a plagas de *Ceratitis capitata* y su uso potencial como agente biológico para el control de esta plaga. La utilización de la homología con la subunidad 16s del ARN de la bacteria es un indicador estándar de identificación de bacterias conocido por el experto medio en la materia y no aporta nuevas características técnicas a la reivindicación. Las reivindicaciones 17 y 18 carecen por tanto de novedad y no cumplen con los requisitos definidos en el Artículo 8 de la Ley de Patentes

1.4 Reivindicaciones 4 a 11.

Los documentos que mejor definen el estado de la técnica para las reivindicaciones 4 y 5 son los documentos D01 y D02. Sin embargo, en ninguno de ambos documentos se describen actividades patógenas inducidas por debajo de 10°C.

En D04 se divulga que la limitación de nutrientes en bacterias gram-positivas, incluyendo en *B. thuringiensis*, implica la síntesis de la proteína CodY que ayuda a la célula a adaptarse a dichas condiciones de estrés nutricional, aumentando la virulencia de la bacteria para favorecer la liberación por lisis de los nutrientes de la célula eucariótica que la bacteria necesita. D04 no divulga sin embargo el papel de otros factores de estrés como la disminución del pH, o el estrés osmótico en el aumento de dicha virulencia.

D05 y D06 describen la síntesis de proteínas chaperonas en cepas bacterianas, incluidas de *Bacillus thuringiensis* tras un tratamiento de frío hasta 4°C, así como en situaciones de estrés osmótico u oxidativo, y el rol de dichas proteínas en el mantenimiento de la estabilidad de las proteínas tóxicas. Esto podría explicar el mecanismo fisiológico que permite la existencia de actividad patogénica de las cepas descritas a tan bajas temperaturas, o bajo condiciones de estrés. Sin embargo esta información tomada por si sola o en combinación con otros documentos del estado de la técnica no llevaría a un experto en la materia a dar choques de frío por debajo de 10°C a las cepas bacterianas, o a someterlas a condiciones de estrés osmótico con el fin de provocar un aumento significativo de su actividad patogénica en general, ni frente a *Ceratitis captitata* en particular. Las reivindicaciones 6 a 11 cumplen por tanto con los requisitos de novedad y actividad inventiva definidos en los Artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes.

Hoja adicional

1.5 Reivindicaciones 1 a 14 en combinación con las reivindicaciones 15 y 16.

Los documentos que mejor definen el estado de la técnica, D01, D02 y D03 no describen el uso de cepas bacterianas tratadas con frío para el control biológico de la plaga de *Ceratitis capitata*.

Ninguno de dichos documentos describe asimismo el uso de *Bacillus pumilus* en el control de plagas de *Ceratitis capitata*.

Las reivindicaciones 15 y 16 cumplen por tanto con los requisitos de novedad y actividad inventiva definidos en los 6 y 8 de la Ley de Patentes.

2. Aplicación Industrial conforme al Artículo 9 de la Ley de Patentes.

Se considera que las Reivindicaciones 1 a 18 cumplen con los requisitos previstos en el Artículo 9 de la Ley de Patentes y son por tanto susceptibles de aplicación industrial.