

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 362 035**

21 Número de solicitud: 200931119

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación: **04.12.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2011**

Fecha de la concesión: **02.11.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **15.11.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
15.11.2011

73 Titular/es:
**UNIVERSIDAD DE GRANADA
CUESTA DEL HOSPICIO, S/N
18071 GRANADA, ES**

72 Inventor/es:
**MANZANERA RUÍZ, MAXIMINO;
GONZÁLEZ LÓPEZ, JESÚS JUAN;
NAVÁEZ REINALDO, JUAN JESÚS y
VÍLCHEZ MORILLAS, JUAN IGNACIO**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **CEPA BACTERIANA CECT7624, USOS Y PRODUCTO XEROPROTECTOR PRODUCIDO POR LA MISMA.**

57 Resumen:

Cepa bacteriana CECT7624, usos y producto xeroprotector producido por la misma.

Microorganismo de la especie bacteriana *Microbacterium* sp. con número de acceso CECT7624. La presente invención también se refiere al uso de dicho microorganismo o de una población del mismo para aumentar la tolerancia al estrés hídrico de una planta o para aumentar el crecimiento de una planta en condiciones óptimas de contenido hídrico de dicha planta. Además, la presente invención se refiere al uso de dicho microorganismo o de una población del mismo para la producción de una composición xeroprotectora, donde dicha composición comprende trehalosa, ácido oxoglucurónico, lactato, glutamato, glutamina y piruvato, o además comprende fucosa. La presente invención también se refiere al método para aumentar la tolerancia al estrés hídrico de una planta o para producir la composición xeroprotectora de la presente invención.

ES 2 362 035 B2

DESCRIPCIÓN

Cepa bacteriana CECT7624, usos y producto xeroprotector producido por la misma.

5 La presente invención se refiere a un microorganismo de la especie bacteriana *Microbacterium sp.* con número de acceso CECT7624. Asimismo la presente invención se refiere al uso de dicho microorganismo o de una población del mismo para aumentar la tolerancia al estrés hídrico de una planta o para aumentar el crecimiento de una planta en condiciones óptimas de contenido hídrico de dicha planta. Además, la presente invención se refiere al uso de dicho microorganismo o de una población del mismo para la producción de una composición xeroprotectora, donde
10 dicha composición comprende trehalosa, ácido oxoglucurónico, lactato, glutamato, glutamina y piruvato, o además comprende fucosa. La presente invención también se refiere al método para aumentar la tolerancia al estrés hídrico de una planta o para producir la composición xeroprotectora de la presente invención.

Estado de la técnica anterior

15 La búsqueda de mejores fenotipos y genotipos de plantas de cultivo para aumentar la producción, mejoras nutricionales, calidad en el fruto y planta, es de gran interés para la comunidad científica. La selección de fenotipos ha mostrado buenos resultados en la obtención de mejores variedades, sin embargo, el papel de la biotecnología tiene especial importancia ya que la utilización de microorganismos a las raíces de las plantas ha propiciado que se logren
20 grandes avances en la comprensión del efecto de los microorganismos de la rizosfera en la regulación metabólica y genética del las plantas como por ejemplo, la utilización de *Agrobacterium* para la obtención de plantas transgénicas, o el empleo de bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a las plantas leguminosas.

25 En las plantas de cultivo, la rizosfera constituye una de las principales fuentes de materia orgánica en los suelos. Dicha rizosfera estimula la actividad microbiana. En la rizosfera se dan complejas interacciones entre los microorganismos y las raíces de las plantas. El potencial hídrico de la rizosfera es un aspecto clave que determina la biodisponibilidad de agua, oxígeno y sustratos de plantas y microorganismos. Los exudados de determinados microorganismos pueden proteger a bacterias del estrés hídrico. El la agricultura mediterránea, el estrés hídrico es uno de los principales factores que limitan la producción de los cultivos.

30 Es conocido que los hongos micorrízicos colonizan las raíces de la mayoría de las plantas. Estos hongos son simbioses obligados y reciben compuestos carbonados en forma de energía de las plantas hospedantes; durante esta asociación les transfieren nutrientes, generalmente fósforo y cinc (Ryan y Angus, 2003. *Plant and Soil*, 250(2): 225-239). Los hongos micorrízicos aumentan significativamente la superficie de absorción del sistema radical de las plantas, mejorando la habilidad de las mismas para absorber agua y nutrientes, mantener la estructura del suelo e incrementar la resistencia a estreses y enfermedades. Hay evidencias que indican la influencia de estos hongos en las relaciones hídricas de las plantas hospedantes y el incremento a la resistencia a sequía de las mismas. Se ha sugerido que los hongos podrían tener efectos positivos sobre las plantas hospedantes en condiciones de campo durante períodos de estrés para las mismas como es el estrés hídrico (Allen y Allen, 1986. *New Phytologist*, 104: 559-71; Fitter, 1986. *New Phytologist*, 103: 767-776).

45 Está demostrado que algunas cepas bacterianas no patógenas son capaces de estimular el metabolismo defensivo de la planta de tal forma que cuando existe el ataque de un patógeno, las plantas se encuentran protegidas y pueden sobrevivir con una mortalidad mucho menor que si no estuvieran tratadas con la bacteria. En algunos casos, el efecto es muy específico, y solo es efectivo frente a determinados patógenos, mientras que en otros, el efecto es mucho más amplio, siendo incluso efectivo frente a factores abióticos como puede ser el estrés salino o hídrico.

50 En este sentido, la aplicación de bacterias en ciertos cultivos resulta una alternativa biotecnológica respetuosa con el medioambiente ya que la bacteria produciría un doble efecto beneficioso, por una parte, estimula las defensas de planta frente a un patógeno, disminuyendo por tanto el uso de sustancias químicas, y por otra, permite obtener mejores rendimientos bajo determinadas condiciones de estrés. Sin embargo, la selección de dicho microorganismo es un aspecto complejo que requiere el ensayo y caracterización de numerosas especies y cepas para lograr obtener un microorganismo capaz de producir beneficios de importancia a las plantas.

55 Por otra parte, la conservación de materiales biológicos mediante deshidratación y osmoconcentración es una tecnología conocida. Sin embargo, los métodos actuales de conservación requieren de gran costo en energía y generalmente necesitan de almacenaje a bajas temperaturas. En ocasiones, después de su conservación, el material biológico tiene una actividad y/o viabilidad que no alcanza los niveles satisfactorios. Los métodos de conservación, tales como el secado a temperatura ambiente, formulaciones en líquido, el congelado con crioprotectores o la liofilización producen reducciones significativas en la actividad/viabilidad del material conservado.

65 Los procesos usados actualmente son lentos e implican un elevado consumo de energía. Además, la liofilización confiere sólo un nivel modesto de termotolerancia en el producto final, y se requiere aún refrigeración para reducir el deterioro durante el almacenamiento.

Durante la selección natural evolutiva, ciertas especies de plantas y animales adquirieron la notable capacidad de tolerar la deshidratación extrema, permaneciendo latentes en medios hostiles durante períodos muy largos de tiempo y aún capaces de adquirir una actividad vital completa una vez hidratadas nuevamente. Ejemplos incluyen la "planta

de la resurrección” *Selaginella lepidophylla*, el camarón de mar *Artemia salina*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* o el tardígrado *Macrobiotus hufelandi*. Estos organismos se denominan criptobióticos y el procedimiento por el que sobreviven se conoce como anhidrobiosis. Todas las especies de animales y plantas que presentan esta capacidad, contienen moléculas protectoras formadoras de cristales amorfos como el disacárido trehalosa (α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosido).

La formación y uso de los cristales amorfos está bien documentada (Manzanera *et al.*, 2002. *Appl Environ Microbiol*, 68: 4328-4333). Algunos de los conservantes que forman estos cristales son adecuados para este tipo de conservación e incluyen hidratos de carbono no reductores como la trehalosa, hidroxiectoina, maltitol, lactitol (4-O- α -D-glucopyranosyl-D-glucitol), palatinit [mezcla de GPS (α -D-glucopiranosil-1-6-sorbitol) y GPM (α -D-glucopiranosil-1-6-manitol)] y sus componentes individuales GPS y GPM. Los glicósidos no reductores de compuestos polihidroxilados pueden ser neotrehalosa, laconeotrehalosa, galactosil-trehalosa, sacarosa, lactosacarosa, rafinosa, etc. Otros conservantes formadores de cristales amorfos incluyen aminoácidos tales como la hidroxiectoina.

La presencia de agua en el estado seco es generalmente inferior a 0,2 g/g de peso celular seco en la mayoría de los criptobiontes. Estos niveles de agua son suficientes para que estos organismos invertebrados o microorganismos resistan la deshidratación extrema, temperaturas elevadas, radiaciones ionizantes o también, en algunas especies de tardígrados, presiones de hasta 600 MPa.

Es conocido que las biopelículas (*subaerial biofilms*), formadas por bacterias del género *Rhodococcus sp* entre otras, son capaces de producir compuestos osmoprotectores, es decir, sustancias extracelulares poliméricas (EPS) (Gorbushina, 2007. *Environmental Microbiology*, 9(7): 1613-1631). Asimismo, LeBlanc (2008) (LeBlanc, 2008. *Applied and environmental microbiology*, 74(9): 2627-2636), se refiere al microorganismo *Rhodococcus jostii* RHA1, un actinomiceto con capacidades metabólicas favorables para la biorremediación de suelos contaminados, capaz de secretar los osmoprotectores ectoina y trehalosa.

Explicación de la invención

La presente invención se refiere a un microorganismo de la especie bacteriana *Microbacterium sp.* con número de acceso CECT7624. Asimismo la presente invención se refiere al uso de dicho microorganismo o de una población del mismo para aumentar la tolerancia al estrés hídrico de una planta o para aumentar el crecimiento de una planta en condiciones óptimas de contenido hídrico de dicha planta. Además, la presente invención se refiere al uso de dicho microorganismo o de una población del mismo para la producción de una composición xeroprotectora, donde dicha composición comprende trehalosa, ácido oxoglucurónico, lactato, glutamato, glutamina y piruvato, o además comprende fucosa. La presente invención también se refiere al método para aumentar la tolerancia al estrés hídrico de una planta o para producir la composición xeroprotectora de la presente invención.

La capacidad para aumentar la tolerancia al estrés hídrico de una planta es de importancia en el sector agrícola para la obtención de frutos en condiciones de bajo contenido de agua en los suelos o en otras condiciones que limiten la capacidad de absorción de agua de dichas plantas. En la presente invención se ofrecen herramientas para prevenir o combatir los efectos negativos que padecen las plantas sometidas a condiciones de estrés hídrico. Además, en la presente invención se ofrece tanto el contenido como la proporción de varias composiciones xeroprotectoras obtenidas de cultivos de la cepa CECT7624.

Por tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a un microorganismo de la especie bacteriana *Microbacterium sp.* con número de acceso CECT7624. Dicho microorganismo es tolerante a la desecación. Dicha cepa ha sido depositada en la colección española de cultivos tipo (CECT) el 10 de noviembre de 2009 y le correspondió el nº de depósito CECT7624. La dirección de dicha Autoridad Internacional de depósito es: Universidad de Valencia/Edificio de investigación/Campus de Burjassot/46100 Burjassot (Valencia).

La clasificación científica de la cepa CECT7624 de la presente invención es: Reino: *Bacteria*/Filo: *Actinobacteria*/Orden: *Actinomycetales*/Familia: *Micrococcineae*/Género: *Microbacterium*.

Las características de dicha cepa son:

- Los sustratos que la bacteria CECT7624 oxida o fermenta son: Dextrina, glicógeno, manan, tween 40, tween 80, L-arabinosa, D-arbulina, D-celobiosa, D-fructosa, L-fucosa, D-galactosa, ácido D-galacturónico, gentiobiosa, ácido D-glucónico, α -D-glucosa, maltosa, maltotriosa, D-manitol, D-manosa, D-melezitosa, 3-metil glucosa, palatinosa, D-psicosa, salicina, sedoheptulosa, D-sorbitol, sacarosa, D-trehalosa, turanosa, xilosa, ácido acético, ácido α -hidroxibutírico, α -cetoglutárico, ácido L-láctico, metil piruvato, ácido succinámico, L-alaninamida, L-alanina, L-alanil-glicina, L-aspargina, ácido L-glutámico, ácido glicil-L-glutámico, L-serina, putrescina, glicerol, adenosina, 2'-deoxiadenosina, inopina, timidina, adenosina-5'-monofosfato, timidina-5'-monofosfato, D-L- α -glicerolfosfato.

- La temperatura máxima tolerada para el crecimiento de esta cepa se encontraron entre 35°C y 40°C. La temperatura mínima para detectar crecimiento se encontró entre 15°C y 20°C, mientras que su temperatura óptima de crecimiento fue de entorno a 35°C. Fue incapaz de crecer a pH igual o superior a 13 aunque si proliferó a pH 12.

- El pH mínimo tolerado para el crecimiento de esta cepa se encontró entre pH 5 y pH 7, considerándose alrededor de 12 como pH óptimo para el crecimiento de esta cepa.

5 - Igualmente fue capaz de proliferar en medio LB en ausencia de NaCl aunque fue incapaz de crecer en este medio con una concentración de NaCl igual o superior a 1,2 M, quedando la concentración máxima tolerada entre 0,8 M y 1,2 M de NaCl. Esta cepa mostró un crecimiento óptimo a una concentración de 0,2 M de NaCl.

10 - Ensayos de sensibilidad a antibióticos mostraron halos de inhibición del crecimiento en los cinco antibióticos ensayados en disco: rifampicina₃₀ (3,37 cm); estreptomina₂₅ (2,07 cm); tetraciclina₂₀ (1,07 cm); cloramfenicol₅₀ (4,28 cm); kanamicina₃₀ (1,53 cm).

15 Asimismo, la presente invención también se refiere a un microorganismo derivado del microorganismo depositado con n° de acceso CECT7624. El microorganismo derivado puede producirse de forma intencionada, por métodos mutagénicos conocidos en el estado de la técnica como por ejemplo, el crecimiento de dicho microorganismo original en exposición con conocidos agentes capaces de forzar mutagénesis.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una población bacteriana que comprende el microorganismo depositado con n° de acceso CECT7624. La población bacteriana puede estar formada por otras cepas de microorganismos de cualquier especie. La población bacteriana es un conjunto de células de microorganismos donde al menos hay una célula de dicho microorganismo depositado con n° de acceso CECT7624, en cualquier fase del estado de desarrollo y en cualquier fase de crecimiento, estacional o estacionaria, independientemente de la morfología que presente, en forma de coco, bacilo o morfologías intermediarias de las anteriores.

25 En adelante se podrá hacer referencia al microorganismo o a la población bacteriana como el “microorganismo de la presente invención” o el “microorganismo de la invención”.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del microorganismo de la presente invención para aumentar la tolerancia al estrés hídrico de una planta, respecto de un control.

30 En la presente invención, el control hace referencia a una planta de la misma especie, subespecie o variedad que la planta anterior, que no ha sido expuesta a dicho microorganismo o a una planta que ha sido expuesta a la rizobacteria *P. putida* KT2440.

35 El término “estrés hídrico” tal como se entiende en la presente invención se refiere a la reducción del contenido de agua en los tejidos vegetales que provoca alteraciones en los procesos metabólicos, originando efectos negativos en el crecimiento y desarrollo de las plantas. La magnitud de dichas alteraciones en los procesos metabólicos involucrados dependen de la especie, momento del ciclo de desarrollo de la planta afectada, de la intensidad y duración de la situación que provoca dicho estrés, entre otros factores. Las técnicas para estimar el estrés hídrico en una planta son conocidas por el experto en la materia como por ejemplo, pero sin limitarse, medida de la expansión de las hojas, medida del cierre estomático, medida de la muerte foliar.

40 El estrés hídrico puede ser provocado por diversas causas, entre las que se encuentra el estrés salino, ya que es conocido que la concentración de sales solubles en el suelo eleva la presión osmótica de la solución de dicho suelo. Puesto que el agua tiende a pasar de las soluciones menos concentradas a las más concentradas, igualando las presiones osmóticas de ambas, cuando la concentración salina de la solución del suelo es superior a la de las células de la planta, el agua tenderá a salir de éstas últimas hacia la solución del suelo. Por tanto, en medios salinos, aunque exista agua disponible suficiente, la planta sufre estrés hídrico.

45 Las características de una planta que pueden aumentar su tolerancia al estrés hídrico pueden ser, entre otras, pero si limitarse, el mantenimiento de la turgencia de los tejidos mediante el aumento del índice de retención de agua o, el mantenimiento o aumento de la absorción de agua.

50 Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso del microorganismo de la invención para aumentar la cantidad de agua absorbida (recuperada) por una planta, respecto de un control, en condiciones de estrés hídrico. En la presente invención se mide la cantidad de agua recuperada por una planta por medio de (ver en ejemplos de realización de la invención):

- La medida del peso de la planta totalmente túrgida.

60 - La medida del potencial de recuperación de agua o índice de recuperación de agua, que consiste en calcular la diferencia entre el agua recuperada por la planta y su peso fresco.

65 - La medida del contenido relativo de agua. Este dato indica la relación entre el agua presente en las plantas en el momento de la extracción respecto del agua total. De esta forma, el valor máximo de 1 se daría en la situación teórica en que por su buen estado hídrico, la planta no pudiera o no necesitara recuperar agua en su estado totalmente túrgido con respecto al peso fresco.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso del microorganismo de la invención para aumentar el índice de retención de agua de una planta, respecto de un control, en condiciones de estrés hídrico. El índice de retención de agua en una planta es la diferencia entre el peso fresco y el peso seco de dicha planta.

5 Una realización preferida de la presente invención se refiere al uso del microorganismo de la invención para aumentar la biomasa de una planta, respecto de un control, en condiciones de estrés hídrico. En la presente invención, el aumento de la biomasa se determina fundamentalmente mediante el cálculo del peso seco de la planta, así como por la medida de la longitud de tallo y raíces en condiciones de estrés hídrico.

10 La cantidad de agua recuperada por una planta, el índice de retención de agua o el aumento de la biomasa de dicha planta pueden ser determinados por medio de la medida de otros parámetros diferentes a los que se especifica anteriormente y en el apartado de ejemplos de realización.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del microorganismo de la presente invención para aumentar el crecimiento de una planta respecto de un control. Este aspecto de la invención se refiere a condiciones en las que la planta no experimenta estrés hídrico, es decir, en condiciones hídricas óptimas para el desarrollo y crecimiento de dicha planta.

20 Una realización preferida de la presente invención se refiere al uso del microorganismo de la invención para aumentar el crecimiento de una planta respecto de un control, donde el aumento del crecimiento se refiere al aumento de la longitud del tallo o al aumento de la longitud de la raíz de dicha planta.

25 El término “planta” engloba cada una de las partes de la misma, que pueden ser conservadas o cultivadas de forma aislada o en combinación, así como el germoplasma. El germoplasma queda definido por aquel material biológico que contiene la variabilidad genética intraespecífica o a los materiales genéticos que pueden perpetuar una especie o una población de un organismo. Así pues germoplasma es la semilla, tejido de cualquier parte de la planta o plantas establecidas en colecciones *ex situ*, sin excluir cualquier otro material que entre en esta definición.

30 La planta de la presente invención puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, cualquier planta destinada al consumo humano o animal, plantas cuyo fruto tenga interés para su consumo fresco o procesado industrial, plantas que se utilicen en la generación de productos beneficiosos para la salud humana, como por ejemplo fármacos (*biofarms*), plantas que se utilicen para la generación de biomasa para fabricar biodiesel, plantas utilizadas en la biorremediación de diferentes tipos de sustratos (fitorremediación). En este sentido, la planta se puede seleccionar de la lista que comprende, pero sin limitarse, del género *Solanum*, *Cucumis*, *Citrullus*, *Cucurbita*, *Capsicum*, *Brasica*, *Nicotiana*,
35 *Citrullus* o *Lactuca*.

Otra realización preferida se refiere al uso del microorganismo de la invención para aumentar la tolerancia al estrés hídrico de una planta respecto de un control, o al uso del microorganismo de la invención para aumentar el crecimiento de una planta respecto de un control, donde la planta es del género *Capsicum*. La especie de planta del género
40 *Capsicum* se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, *Capsicum angulosum*, *Capsicum annuum*, *Capsicum pendulum*, *Capsicum minimum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum abbreviatum*, *Capsicum anomalum*, *Capsicum breviflorum*, *Capsicum buforum*, *Capsicum brasilianum*, *Capsicum campylopodium*, *Capsicum cardenasii*, *Capsicum chacoense*, *Capsicum chinense*, *Capsicum chlorocladium*, *Capsicum ciliatum*, *Capsicum coccineum*, *Capsicum cordiforme*, *Capsicum cornutum*, *Capsicum dimorphum*, *Capsicum duseunii*, *Capsicum exile*, *Capsicum eximium*, *Capsicum fasciculatum*, *Capsicum fastigiatum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum flexuosum*, *Capsicum galapagoensis*, *Capsicum geminifolium*, *Capsicum hookerianum*, *Capsicum lanceolatum*, *Capsicum leptopodium*, *Capsicum luteum*, *Capsicum microcarpum*, *Capsicum minutiflorum*, *Capsicum mirabile*, *Capsicum parvifolium*, *Capsicum praetermissum*, *Capsicum pubescens*, *Capsicum schottianum*, *Capsicum scolnikianum*, *Capsicum stramonifolium*, *Capsicum tetragonum*,
45 *Capsicum tovarii*, *Capsicum villosum* o *Capsicum violaceum*. Según una realización más preferida, la planta es de la especie *Capsicum annuum*.
50

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para aumentar la tolerancia al estrés hídrico de una planta respecto de un control, que comprende inocular el microorganismo de la invención a una célula vegetal, cualquier parte de una planta o a una semilla. Mediante este método se aumenta el crecimiento de una planta que no
55 está en condiciones de estrés hídrico, respecto del control.

El término “inocular” tal como se emplea en la presente invención se refiere a introducir el microorganismo de la invención en una planta mediante cualquier técnica conocida en el estado de la técnica, como por ejemplo, pero sin limitarse, a través de una solución en hidroponía, a través de una solución aplicada al suelo, por medio de la aplicación
60 del microorganismo de la invención por pulverización de cualquier parte aérea de la planta, mediante la germinación de semillas de la planta en presencia de dicho microorganismo, mediante cultivo de material vegetal *in vitro* en contacto con el microorganismo de la invención o mediante microinyección del microorganismo de la invención en al menos una célula vegetal o protoplasto.

65 Una realización preferida de la presente invención se refiere al método descrito en los párrafos anteriores, que comprende poner en contacto el microorganismo de la invención con al menos una raíz de dicha planta. Una realización más preferida se refiere al método donde dicho microorganismo o población bacteriana se ponen en contacto con al menos una raíz por medio de una solución acuosa.

Otra realización preferida se refiere a cualquier método descrito en párrafos anteriores, para aumentar el crecimiento de una planta respecto de un control, donde la planta es del género *Capsicum*. Según una realización más preferida, la planta es de la especie *Capsicum annuum*.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del microorganismo de la invención para la producción de una composición xeroprotectora.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a la composición xeroprotectora producida por el microorganismo de la invención.

10 Para referirse a la composición xeroprotectora de la presente invención se puede emplear el término Producto de Ordeñado Bacteriano (POB). El término "composición xeroprotectora" tal como se entiende en la presente invención, se refiere a una composición que previene los efectos adversos del estrés hídrico, que disminuye los efectos de dicho estrés hídrico en una planta o que promueve el crecimiento de una planta.

15 Una realización preferida de la presente invención se refiere a la composición xeroprotectora producida por el microorganismo de la invención, o a una composición xeroprotectora sintética, que comprende trehalosa, ácido oxoglucurónico, lactato, glutamato, glutamina, fucosa y piruvato.

20 Una realización más preferida de la presente invención se refiere a la composición xeroprotectora producida por el microorganismo de la invención, o a una composición xeroprotectora sintética, que comprende una proporción de entre 0,5 y 1,5 de trehalosa: 0,15 y 0,45 de ácido oxoglucurónico: 0,7 y 1,7 de lactato: 0,1 y 0,2 de glutamato: 0,15 y 0,45 de glutamina: 1,2 y 3,4 de fucosa: 0,15 y 0,3 de piruvato. Es decir, una proporción(trehalosa):(ácido oxoglucurónico):(lactato):(glutamato):(glutamina):(fucosa):(piruvato), de (0,5 a 1,5) : (0,15 a 0,45) : (0,7 a 1,7) : (0,1 a 0,2) : (0,15 a 0,45) : (1,2 a 3,4) : (0,15 a 0,3), respectivamente. Una realización aún más preferida se refiere a la composición xeroprotectora donde la proporción de (trehalosa):(ácido oxoglucurónico):(lactato):(glutamato):(glutamina):(fucosa):(piruvato), es de (0,7 a 1,3) : (0,25 a 0,35) : (0,9 a 1,6) : (0,12 a 0,18) : (0,2 a 0,4) : (1,8 a 2,8) : (0,2 a 0,25). Preferiblemente la composición xeroprotectora tiene una proporción de (trehalosa):(ácido oxoglucurónico):(lactato):(glutamato):(glutamina):(fucosa):(piruvato) de (1) : (0,31) : (1,18) : (0,14) : (0,28) : (2,26) : (0,23), respectivamente.

30 Otra realización preferida de la presente invención se refiere a la composición xeroprotectora producida por el microorganismo de la invención, o a una composición xeroprotectora sintética, que comprende trehalosa, ácido oxoglucurónico, lactato, glutamato, glutamina y piruvato.

35 Una realización más preferida de la presente invención se refiere a la composición xeroprotectora producida por el microorganismo de la invención, o a una composición xeroprotectora sintética, que comprende una proporción de entre 0,5 y 1,5 de trehalosa: 0,03 y 0,09 de ácido oxoglucurónico: 0,3 y 0,9 de lactato: 0,05 y 0,15 de glutamato: 0,05 y 0,15 de glutamina: 0,1 y 0,3 de piruvato. Es decir, una proporción (trehalosa):(ácido oxoglucurónico):(lactato):(glutamato):(glutamina):(piruvato), de (0,5 a 1,5) : (0,03 a 0,09) : (0,3 a 0,9) : (0,05 a 0,15) : (0,05 a 0,15) : (0,1 a 0,3), respectivamente. Una realización aún más preferida se refiere a la composición xeroprotectora donde la proporción de (trehalosa):(ácido oxoglucurónico):(lactato):(glutamato):(glutamina):(fucosa):(piruvato), es de (0,7 a 1,3) : (0,05 a 0,07) : (0,5 a 0,7) : (0,07 a 0,12) : (0,07 a 0,12) : (0,15 a 0,25). Preferiblemente la composición xeroprotectora tiene una proporción de (trehalosa):(ácido oxoglucurónico):(lactato):(glutamato):(glutamina):(piruvato) de (1) : (0,06) : (0,62) : (0,1) : (0,1) : (0,21), respectivamente.

40 El término "proporción" tal como se entiende en la presente invención se refiere a la correspondencia debida de los elementos de la composición relacionados entre sí. Es decir, se refiere a una relación matemática que vincula los elementos de la composición. Para que sirva de ejemplo, la composición xeroprotectora que tiene una proporción de (trehalosa):(ácido oxoglucurónico):(lactato):(glutamato):(glutamina):(piruvato) de (1) : (0,06) : (0,62) : (0,1) : (0,1) : (0,21), respectivamente, puede tener por ejemplo, concentraciones de (2) : (0,12) : (1,24) : (0,2) : (0,2) : (0,42) mg de cada elemento respectivamente/ml.

55 En adelante se podrá hacer referencia a cualquier composición descrita en los párrafos anteriores como "composición de la presente invención" o "composición de la invención".

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la composición de la invención para la conservación de material biológico con un contenido de humedad residual igual o inferior al 10%. El contenido de humedad residual del material biológico puede ser igual o inferior al 9, 8, 7, 6 5, 4, 3, 2 ó 1% de humedad residual. La conservación de dicho material puede llevarse a cabo mediante la estabilización del mismo. En la presente invención, para referirse a este tipo de material biológico se puede emplear la expresión "material biológico en estado seco". En estas condiciones, el conservante o estabilizador coalesce para alcanzar un estado no-cristalino, vítreo, y sólido (por ejemplo un cristal amorfo). Las partículas de cristal orgánico que están formadas al secar el material biológico con el estabilizador están cubiertas por el estabilizador que produce una alta estabilidad al reducir drásticamente las reacciones químicas. De esta forma el material biológico seco está incrustado en el cristal amorfo formado por el estabilizador.

65 El material biológico seco en presencia del estabilizador que forma el cristal amorfo es resistente a plásticos en estado líquido, mientras que el material que no está seco en presencia de estos estabilizadores no es resistente a plásticos en estado líquido.

El material biológico seco en estas formas puede encontrarse en estado no particulado y puede suministrarse en formas por ejemplo, pero sin limitarse, molduras o sólidos en 3 dimensiones como por ejemplo, pero sin limitarse, bloques, pastillas, parches, hojas, bolas, o pepitas de material biológico seco.

5 El término “humedad residual” tal como se emplea en la presente invención se refiere a la cantidad de humedad que contiene un producto después de pasado por algún tipo de proceso capaz de eliminar agua del mismo. La humedad residual es el porcentaje de masa del producto que corresponde a agua respecto del total de la masa. Es decir un valor de humedad residual de un producto igual a un 10% significa que 10 g de cada 100 g del producto corresponden a agua. La humedad residual puede ser medida mediante métodos conocidos en el estado de la técnica como por ejemplo, pero
10 sin limitarse, mediante el método titrimétrico, el método azeotrópico o el método gravimétrico.

El término “conservación de material biológico” hace referencia al mantenimiento o cuidado de la permanencia de las características intrínsecas del material biológico.

15 Una realización preferida se refiere al uso de la composición de la invención para la conservación de material biológico en estado seco, donde el material biológico es un organismo invertebrado, una semilla, una plántula, un microorganismo, un órgano aislado, un tejido biológico aislado o una célula. La célula puede ser procariota o eucariota. La célula puede ser una célula de un microorganismo en cualquier estado de desarrollo. La célula puede ser somática o germinal, vegetal o animal. Dicha célula puede proceder de cualquier organismo o microorganismo y puede presentarse
20 en cualquier estado de diferenciación, como por ejemplo, pero sin limitarse, procedente de un cultivo de un tejido celular o de órganos, esperma, óvulos o embriones. La célula puede ser una célula madre totipotente, multipotente o unipotente. El microorganismo puede ser unicelular o multicelular. El microorganismo unicelular se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. putida*., *Salmonella spp*, *Rhizobium spp*, *Pseudomonas spp*, *Rhodococcus spp*, *Lactobacillus spp*. o *Bifidobacterium spp*. El microorganismo pluricelular puede
25 ser por ejemplo, pero sin limitarse, un nematodo.

La célula conservada por la composición de la presente invención es una célula viable es decir, es capaz de realizar las funciones normales de la célula incluyendo la replicación y división celular. Por otra parte la célula puede haber sido tratada, manipulada o mutada antes de su conservación. Por ejemplo, pero sin limitarse, una célula puede haberse
30 hecho competente para transformaciones o transfecciones, o puede contener ácidos nucleicos recombinantes. Las células que se conservan pueden formar una población homogénea o heterogénea, por ejemplo, pero sin limitarse, una librería de células en las que cada célula contiene una variación de algún ácido nucleico. Preferentemente las células son células no anhidrobióticas (células sensibles a desecación) como por ejemplo, pero sin limitarse, células procedentes de microorganismos procariotas no anhidrobiontes que generalmente no sean esporulantes.

35 La conservación del microorganismo puede mejorarse mediante cultivo bajo condiciones que aumenten la concentración intracelular de trehalosa o de otros estabilizadores formadores de cristales amorfos. Por ejemplo, pero sin limitarse, en condiciones de alta osmolaridad (alta concentración de sales) que estimulen la producción intracelular de trehalosa o de otros estabilizantes formadores de cristales amorfos.

40 El organismo invertebrado es pero sin limitarse, una larva de insecto o un crustáceo. Dichos organismos invertebrados pueden ser preservados en condiciones de desecación, permitiendo la actividad vital del mismo, de modo que, cuando se rehidratan, dichos organismos presentan la capacidad de movimiento. La plántula es una planta en sus primeros estadios de desarrollo, desde que germina hasta que se desarrolla.

45 La composición de la invención puede usarse para la conservación de material biológico en estado seco, donde el material biológico es un organismo vertebrado perteneciente a la Superclase Tetrapoda (con cuatro extremidades),

50 Clase Amphibia (anfibios) o Clase Reptilia (reptiles), o cualquiera de sus partes (Vernon y Jackson, 1931. The biological bulletin, 60: 80-93). Vernon y Jackson llevaron a cabo un estudio sobre la rana Leopardo (*Rana pipiens*), en el que de forma natural se seca su piel, lengua, bazo, e hígado con una pérdida de agua de entre un 43-81 % del contenido de agua total.

55 Un órgano aislado, o un tejido biológico aislado (incluida la sangre) pueden conservarse mediante la composición de la presente invención. En Serrato *et al.* (2009) pueden observarse resultados de protocolos de criopreservación de tejidos biológicos (Serrato *et al.*, 2009. Histology and histopathology, 24: 1531-1540).

60 Una realización más preferida se refiere al uso de la composición de la invención, donde el material biológico es una molécula con actividad biológica. El término “molécula con actividad biológica” tal como se entiende en la presente invención se refiere a una molécula biológica cuyo origen sea un organismo vivo o que haya estado vivo, o derivados o análogos de dicha molécula. El término “derivados” se refiere a moléculas obtenidas por la modificación de una molécula con actividad biológica, que presentan una funcionalidad similar. Por otra parte, el término “análogos” se refiere a moléculas que presentan una función similar a la molécula con actividad biológica.

65 Según otra realización aún más preferida de la composición de la presente invención la molécula con actividad biológica es una enzima. Una realización todavía más preferida de la presente invención se refiere al uso de la composición de la invención, donde la enzima es una enzima con actividad lipasa. La enzima con actividad lipasa se selecciona de la lista de enzimas con números EC (*Enzyme Commission numbers*) que comprende las hidrolasas de

éster carboxílico (EC 3.1.1) EC 3.1.1.1 (Carboxilesterasa), EC 3.1.1.2 (Arilesterasa), EC 3.1.1.3 (Triacilglicerol lipasa), EC 3.1.1.4 (Fosfolipasa A(2)), EC 3.1.1.5 (Lisofosfolipasa), EC 3.1.1.23 (Acilglicerol lipasa), EC 3.1.1.24 (3-oxoadipato enol-lactonasa), EC 3.1.1.25 (1,4-lactonasa), EC 3.1.1.26 (Galactolipasa), EC 3.1.1.32 (Fosfolipasa A(1)), EC 3.1.1.33 (6-acetilglucosa deacetilasa), EC 3.1.1.34 (Lipoproteína lipasa). Preferiblemente la enzima lipasa tiene actividad Triacilglicerol lipasa (EC 3.1.1.3).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de obtención de la composición xeroprotectora de la invención que comprende:

- 10 a) cultivar el microorganismo de la invención en un medio de cultivo con glucosa como fuente de carbono,
- b) deshidratar los microorganismos obtenidos en el cultivo del paso (a) hasta que tengan una humedad residual igual o inferior al 10%,
- 15 c) rehidratar los microorganismos deshidratados del paso (b) en un medio hipotónico y
- d) seleccionar la fracción líquida del producto obtenido en el paso (c) que comprende la composición xeroprotectora.

20 El medio de cultivo es cualquier medio de cultivo conocido en el estado de la técnica para el crecimiento de un microorganismo de la presente invención, por ejemplo pero sin limitarse, el medio mineral M9. Medios ricos como el medio Luria Bertani (LB) en los que hay presentes xeroprotectores, u osmolitos naturales no sirven, porque la bacteria preferiría tomarlos del exterior a sintetizarlos.

25 Una realización preferida de la presente invención se refiere al método de obtención de la composición xeroprotectora, donde el medio de cultivo del paso (a) es sólido. El término "sólido" tal como se entiende en la presente invención se refiere a un medio de cultivo gelificado en mayor o menor grado, es decir, que comprende agar para facilitar su gelificación o cualquier compuesto gelificante.

30 La deshidratación de los microorganismos del paso (b) se lleva a cabo por medio de cualquier técnica conocida en el estado de la técnica. Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método, donde la deshidratación de los microorganismos según el paso (b) se lleva a cabo por medio de una solución hipertónica o por medio de una corriente de aire. Preferiblemente la solución hipertónica o la corriente de aire tienen condiciones de esterilidad. La solución hipertónica es una solución que tiene mayor concentración de soluto en el medio externo que en el citoplasma de la células del microorganismo de la presente invención, por tanto, la célula libera agua, es decir, se deshidrata.

35 La rehidratación de los microorganismos, descrita en el paso (c), se lleva a cabo en un medio hipotónico. El medio hipotónico o solución hipotónica es una solución que tiene menor concentración de soluto en el medio externo que en el citoplasma de la célula del microorganismo de la presente invención, por tanto, la célula recupera agua, es decir, se rehidrata. Una realización preferida más se refiere al método, donde el medio hipotónico para la rehidratación de los microorganismos según el paso (c) es agua, parcial o totalmente destilada, parcial o totalmente desionizada o parcial o totalmente desmineralizada.

45 Las células y el medio hipotónico han de estar en contacto al menos 5 minutos. Preferiblemente estarán en contacto al menos 20 minutos en agitación. La obtención del medio que contiene las sustancias estabilizantes se realizará por cualquier método que garantice la separación de células del contenido líquido, preferiblemente mediante centrifugado suave, seguido de un paso de filtración. Preferiblemente se utilizarán filtros de 0,4 micrómetros de diámetro de poro.

50 Otra realización preferida se refiere al método, donde además, la fracción líquida del paso (d) se deshidrata hasta que el producto xeroprotector tenga una humedad residual igual o inferior al 10%.

55 El producto xeroprotector de la invención se puede separar del medio de cultivo por cualquier método de concentración. Preferiblemente se utilizarán secadores de tipo liofilizador que produzcan el estabilizador en estado seco. Las moléculas estabilizadoras se podrán disolver o dispersar en una proporción de entre el 10 y el 30%. Esta disolución o dispersión se añade al material biológico que se desee conservar y se someterá a desecación.

60 Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método de obtención de la composición xeroprotectora, donde la deshidratación de los microorganismos según el paso (b) se lleva a cabo por medio de una solución hipertónica o por medio de una corriente de aire.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método de obtención de la composición xeroprotectora, donde el medio hipotónico para la rehidratación de los microorganismos según el paso (c) es agua parcial o totalmente destilada, desionizada o desmineralizada.

65 Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método de obtención de la composición xeroprotectora, donde además, la fracción líquida del paso (d) se deshidrata hasta que el producto xeroprotector tenga una humedad residual igual o inferior al 10%.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Con la intención de complementar la descripción que se ha llevado a cabo, así como de ayudar a un mejor entendimiento de las características de la invención, de acuerdo con algunos ejemplos realizados, se muestran aquí, con carácter ilustrativo y no limitante, las siguientes figuras:

Fig. 1. Muestra la viabilidad de los distintos aislados bacterianos seleccionados mediante exposición a cloroformo tras 24 horas de secado al aire.

Las barras de error muestran la desviación estándar de al menos tres réplicas.

Las cepas de microorganismos representadas en esta figura son: 1J3A, 1J14, 2J2, 2J8A, 2J12B, 2J15B, 2J16A, 2J30, 3J18, 6J30, *Acitenobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas putida*, además de la cepa *Microbacterium sp.* 3J1.

Fig. 2. Muestra la actividad lipasa (en porcentaje relativo a un 100% de actividad del control positivo) tras secado de la enzima lipasa en presencia de los distintos componentes de productos del ordeñado bacteriano al 10% (p/v).

El control positivo es trehalosa al 10%. El control negativo (-) se corresponde con la ausencia de compuesto alguno como aditivo previo a la desecación de la enzima. 3J1 es el valor de actividad lipasa registrada tras la estabilización por secado y posterior reconstitución de la enzima en presencia de POB extraídos de la cepa 3J1 mediante choque hiper/hiposmótico respectivamente. 3J1D es la actividad lipasa registrada tras la estabilización por secado y posterior reconstitución de la enzima en presencia de POBSIA (Producto de Ordeñado Bacteriano extraído por Secado mediante Incubación al Aire) extraídos de la cepa 3J1 mediante tratamiento de secado y posterior hidratación.

Fig. 3. Muestra el estado de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1, *P. putida* KT2440 y de las plantas sin inocular tras 33 días sin riego.

Se muestran dos plantas de cada tipo de muestra en el último punto de muestreo que incluyen plantas no inoculadas (Agua); inoculadas con *P. putida* e inoculadas con 3J1.

Fig. 4. Muestra el Peso Fresco de las plantas inoculadas con cada una de las cepas a los diferentes tiempos del ensayo tras el cese del riego.

En ordenadas se muestra el peso en mg de las plantas. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro, al día 14 el gris oscuro al 20 y el negro al día 33.

Fig. 5. Muestra el Peso Seco de las plantas inoculadas con cada una de las cepas a los diferentes tiempos del ensayo tras el cese del riego.

En ordenadas se muestra el peso en mg de las plantas. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro, al día 14 el gris oscuro al 20 y el negro al día 33.

Fig. 6. Muestra el Peso Totalmente Túrgido de las plantas inoculadas con cada una de las cepas a los diferentes tiempos del ensayo tras el cese del riego.

En ordenadas se muestra el peso en mg de las plantas. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro, al día 14 el gris oscuro al 20 y el negro al día 33.

Fig. 7. Muestra el Contenido Relativo de Agua en plantas inoculadas con las distintas cepas a los diferentes tiempos del ensayo tras el cese del riego.

En ordenadas se muestran los valores adimensionales del CRA. En abscisas se indican los tiempos de muestreo.

Fig. 8. Muestra el Potencial de retención agua de las plantas inoculadas con cada una de las cepas a los diferentes tiempos del ensayo tras el cese del riego.

En ordenadas se muestra el agua retenida estructuralmente por las plantas en mg. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro, al día 14 el gris oscuro al 20 y el negro al día 33.

Fig. 9. *Muestra la altura tallo de las plantas inoculadas con cada una de las cepas a los diferentes tiempos del ensayo tras el cese del riego.*

5 En ordenadas se muestra la altura en cm de la planta. En abscisas se indican los inóculos utilizados. La escala de grises de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro, al día 14 el gris oscuro al 20 y el negro al día 33.

10 Fig. 10. *Muestra la longitud de la raíz de las plantas inoculadas con cada una de las cepas a los diferentes tiempos del ensayo tras el cese del riego.*

10 En ordenadas se muestra la altura en cm de la planta. En abscisas se indican los inóculos utilizados. La escala de grises de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro, al día 14 el gris oscuro al 20 y el negro al día 33.

15 Fig. 11. *Muestra la altura tallo de las plantas inoculadas con cada una de las cepas a los diferentes tiempos del ensayo en condiciones de humedad.*

20 En ordenadas se muestra la altura en cm de la planta. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro, al día 14 el gris oscuro al 20 y el negro al día 33.

25 Fig. 12. *Muestra la longitud de la raíz de las plantas inoculadas con cada una de las cepas a los diferentes tiempos del ensayo en condiciones de humedad.*

25 En ordenadas de muestra la longitud en cm de las raíces. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro, al día 14 el gris oscuro al 20 y el negro al día 33.

30 Fig. 13. *Muestra el Peso Fresco de las plantas inoculadas con cada una de las cepas a los diferentes tiempos del ensayo en condiciones de humedad.*

35 En ordenadas se muestra el peso en mg de las plantas. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro, al día 14 el gris oscuro al 20 y el negro al día 33.

Fig. 14. *Muestra el Peso Seco de las plantas inoculadas con cada una de las cepas a los diferentes tiempos del ensayo y cultivadas en condiciones de humedad.*

40 En ordenadas se muestra el peso en mg de las plantas. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro, al día 14 el gris oscuro al 20 y el negro al día 33.

45 Fig. 15. *Muestra el Peso Totalmente Túrgido de las plantas inoculadas con cada una de las cepas a los diferentes tiempos del ensayo y cultivadas en condiciones de humedad.*

45 En ordenadas se muestra el peso en mg de las plantas. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro, al día 14 el gris oscuro al 20 y el negro al día 33.

50 Fig. 16. *Muestra el Potencial de retención agua de las plantas inoculadas con cada una de las cepas a los diferentes tiempos del ensayo y cultivadas en condiciones de humedad.*

55 En ordenadas se muestra el agua retenida estructuralmente por las plantas en mg. En abscisas se indican los inóculos utilizados. Los colores de las barras hacen referencia al tiempo de muestra, siendo el blanco correspondiente al día 7 de muestreo, el gris claro, al día 14 el gris oscuro al 20 y el negro al día 33.

Ejemplos

60 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos ilustrativos y de carácter no limitante, realizados por los inventores que describen el aislamiento de la cepa de la presente invención así como sus usos.

65

Ejemplo 1

Aislamiento del microorganismo perteneciente a la cepa 3J1, extracción de POB (Productos del Ordeñado Bacteriano)

5 1.2. Aislamiento de la cepa 3J1 (CECT7624)

Se homogeneizó 1 g de suelo seco, procedente de Granada (37.182 Latitud N y 3.624 Longitud O), no expuesto a lluvia, ni riego, por un periodo superior a tres meses. El suelo se tomó del área circundante a raíces de adelfa (*Nerium oleander*). Las muestras fueron homogeneizadas para obtener un grano de tierra fino que garantizara su contacto con el cloroformo. La tierra se depositó en viales de vidrio a los que se les añadió 3 ml de cloroformo puro. Tras la adición del cloroformo se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación esporádica para maximizar el contacto de la muestra con el disolvente. Para eliminar el cloroformo de las muestras una vez transcurrido el tiempo de contacto, las muestras de suelo fueron depositadas en placa petri de vidrio estéril sin tapadera hasta completar la evaporación del cloroformo. Una vez secas las muestras de suelo se resuspendieron en 10 ml de TSB. Con las suspensiones de suelo se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en placas de TSA que se incubaron 48 horas a 30°C. Trascurrido este tiempo se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de cada muestra. Así, se detectaron $2 \cdot 10^5$ UFC/g de suelo en las muestras sin tratar, mientras que estas se redujeron a $1,3 \cdot 10^5$ UFC/g de suelo tras 30 minutos de tratamiento.

Se seleccionaron aleatoriamente 36 cepas y para identificar las cepas que producían esporas se realizó un ensayo basado en la diferente sensibilidad de las células vegetativas con respecto a las esporas al tratamiento con calor y en base al método descrito por Vilchez y colaboradores (Vilchez *et al.*, 2008. *Extremophiles*, 12: 297-299). De esta forma se tomaron colonias independientes procedentes de placas de TSA de al menos 24 horas de crecimiento. Estas colonias se resuspendieron en 1 ml de solución M9 en microtubos estériles de 1,5 ml. Seguidamente se sembraron 10 μ l de esta suspensión en TSA. Acto seguido se incubó el resto de la suspensión en termobloque *Mixing Block* MB-102 a 72°C durante 30 minutos. Nuevamente se tomaron 10 μ l de cada muestra y se sembraron en placa de TSA. Aquellas cepas con capacidad para tolerar el tratamiento con calor se consideraron como esporulantes, mientras que aquellas que no toleraron el tratamiento por calor se consideraron no esporulantes. Como controles positivos y negativos se utilizaron colonias de *Bacillus pumilus* y de *Burkholderia cepacia* respectivamente. La proporción de cepas esporulantes pasó de niveles inferiores al 40% para muestras no tratadas a niveles superiores al 50% tras 30 min de exposición de las muestras de suelo al cloroformo.

Con el fin de analizar la capacidad de tolerar la desecación de las cepas aisladas no esporulantes se realizó un estudio de desecación al aire. En este ensayo se incluyó una cepa de *Acinetobacter calcoaceticus* (PADD68) aislada del desierto de Tabernas (Almería) identificada como tolerante a la desecación en un estudio previo y que se utilizó como control positivo. Además también se incluyó en el estudio células de *Pseudomonas putida* KT2440 que se utilizaron como controles negativos al ser una cepa sensible a la desecación (Antheunisse *et al.*, 1981. *Antonie Leeuwenhoek*, 47: 539-545; Manzanera *et al.*, 2002. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 4328-4333). Para este ensayo se utilizaron colonias independientes de las 17 cepas identificadas como no esporulantes aisladas en el estudio anterior y procedentes de placas de TSA de 72 horas para calcular su nivel de tolerancia a la desecación tal y como se indica a continuación.

Para calcular la tolerancia a la desecación se partió de colonias aisladas procedentes de placas de TSA de 48 horas de crecimiento. Utilizando un asa estéril se tomó una única colonia que se resuspendió en 1 ml de solución M9 estéril. Partiendo de esta suspensión celular se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en placas de TSA con objeto de identificar el número de UFC/ml de partida. Por otra parte se tomaron 100 μ l de cada suspensión y se depositaron en gotas de 5-10 μ l sobre microplacas de petri estériles sin medio. Las microplacas se situaron bajo una corriente de aire estéril en una campana de flujo laminar durante 24 horas. Las placas quedaron secas tras 2-3 horas de incubación. Trascurridas 24 horas de incubación se resuspendieron en 1 ml de solución M9 estéril. Partiendo de esta solución se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en placas de TSA. Del recuento de UFC/ml de esta segunda siembra se calcularon las proporciones de supervivencia en referencia al primer conteo. Estos ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como la media de los tres ensayos en porcentaje, tomando como referencia del 100% los datos húmedos. La desviación estándar a la media permitió el cálculo de la T de student para estudiar si las diferencias en supervivencia fueron significativas. Se aislaron 17 cepas en estas condiciones con niveles de tolerancia significativamente superiores a los del control positivo *Acinetobacter calcoaceticus* (PADD68). Una de las cepas aisladas se nombró como 3J1 y pertenece al género *Microbacterium* sp. Esta cepa se caracterizó mediante secuenciación del ADNr 16S y comparación de la secuencia con los presentes en la bases de datos, así como mediante estudios metabólicos BIOLOG e hibridación del ADN-ADN con la especie más cercana. La Fig. 1 muestra los valores de tolerancia de las cepas aisladas.

60 1.2. Extracción de productos del ordeñado bacteriano

Para la extracción de los productos del ordeñado bacteriano y con el fin de identificar las moléculas acumuladas con capacidad para proteger biomoléculas sensibles a la desecación se recurrió a una estrategia basada en tres pasos. En un primer paso se realizó una extracción de las moléculas acumuladas mediante una variación de la técnica conocida como "ordeñado bacteriano" generada por los inventores. En un segundo paso se realizó un ensayo de xeroprotección con las sustancias obtenidas para identificar la capacidad de las mismas para proteger enzimas frente a la desecación.

Dado que la producción y acúmulo de sustancias xeroprotectoras se realizó en medio con minerales, se procedió a identificar las fuentes de carbono más apropiadas para el cultivo de las cepas en medio mineral M9. Para la obtención de sustancias con capacidad xeroprotectora se cultivaron en medio mineral con la fuente de carbono apropiada (glucosa) las células de dicha cepa hasta la obtención de una biomasa suficiente. Tras este acúmulo, las células se depositaron sobre placas del mismo medio con agar para la producción de medio sólido. Entre las células y el medio se depositó un filtro estéril de 0,4 micras para permitir el paso de nutrientes a las células y su posterior recogida y manipulación. Las placas con filtros y células se sometieron a un secado por corriente de aire estéril durante 24 horas. Como control positivo se incluyó *Halomononas elongata*, dado que es una cepa reconocida como halotolerante (Sauer y Galinski, 1998. Biotechnol. Bioeng., 57: 306-313) ya *P. putida* KT2440 como cepa halosensible (De Castro *et al.*, 2000. Appl. Environ. Microbiol., 66:4142-4144).

Con este fin se inoculó la cepa seleccionada (3J1), hipertolerante a desecación. Además se incluyó a *H. elongata* como control positivo dado que ya había sido empleada por Sauer y Galinski para la obtención de hidroxiectoína, y como control negativo se incluyó *E. coli* como ejemplo de cepa halo y xerosensible. Dichos inóculos se incubaron en agitación durante 48 horas. A continuación, se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 10.000 rpm en una centrifuga Beckman Avanti-J25 y se retiró la fracción sobrenadante, resuspendiendo el sedimento bacteriano en 20 ml de solución M9 estéril y se depositaron sobre filtros. Tras 24 horas, los filtros, sometidos a desecación mediante una corriente de aire estéril, se separaron del medio y se depositaron en tubos con agua destilada estéril dejando incubar 20 minutos a 30°C y 150 rpm. Consecutivamente se repitió el mismo proceso de centrifugado, se desechó el precipitado bacteriano y se filtró el sobrenadante (utilizando un filtro de 0,22 µm). El producto filtrado de cada muestra se dividió en dos fracciones, una de las cuales se utilizó para determinar la actividad xeroprotectora del sobrenadante (fracción de ordeñado) y la otra para la identificación y caracterización de los compuestos presentes en esta fracción. Ambas fracciones se sometieron a un proceso de secado utilizando un liofilizador (*Labconco Freezone 6*) durante 48 horas obteniéndose un sedimento que fue resuspendido en 100 µl de agua milliQ estéril. Una vez liofilizado, el Producto de Ordeñado Bacteriano (POB), éste se solubilizó en 100 microlitros de agua. Estas soluciones de POBs se utilizaron en estudios de xeroprotección.

En la tabla 1 se pueden observar las composiciones de los productos de ordeñado bacteriano de la cepa 3J1 tras su extracción mediante choque hiper/hiposmótico (3J1), o tras su extracción por secado mediante incubación al aire (3J1D).

TABLA 1

Composición del producto de ordeñado bacteriano (POB) de la cepa 4J27

3J1		3J1D	
Trehalosa	1	Trehalosa	1
Ac. oxoglucurónico	0,31	Ac. oxoglucurónico	0,06
Lactato	1,18	Lactato	0,62
Glutamato	0,14	Glutamato	0,1
Glutamina	0,28	Glutamina	0,1
Fucosa	2,26	-	-
Piruvato	0,23	Piruvato	0,21

3J1 es la composición del POB de dicha cepa tras su extracción mediante choque hiper/hiposmótico.

3J1D es la composición del POB de dicha cepa tras su extracción por secado mediante incubación al aire.

Ejemplo 2

Ensayo de xeroprotección de enzimas

El objetivo de este ensayo fue determinar la capacidad de la fracción producto del ordeñado bacteriano para proteger enzimas frente a la desecación. Para ello se utilizó la enzima lipasa. Partiendo de 1 µl que contenía 0,00554 unidades de lipasa de *Burkholderia cepacia* (Sigma-Aldrich 62309-100 mg) se adicionaron 15 µl de la fracción producto del ordeñado bacteriano a estudiar. Como control positivo se adicionaron 15 µl de una solución al 10% de

trehalosa a 1 μ l (0,00554 U) de solución de lipasa y como control negativo se añadió 15 μ l de agua a 1 μ l (0,00554 U) de solución de lipasa. Las mezclas de 16 μ l con lipasa se depositaron en un microtubo de 2 ml de capacidad y se secaron a 50°C durante 120 minutos. Una vez secas se incubaron a 100°C durante 5 minutos. Finalmente fueron almacenadas en un desecador a temperatura ambiente durante 24 horas. Pasado el tiempo de incubación, las reacciones se resuspendieron en 50 μ l de una solución de TrisHCl (50 mM) y se transfirieron a un microtubo junto con 950 μ l de Tris HCl (50 mM) pH8 y 1 ml de Solución de Sustrato. La determinación de la capacidad xeroprotectora de cada fracción producto de ordeñado bacteriano (POB) se determinó por el ensayo de medición de la actividad lipasa.

Para la medida de la actividad lipasa se utilizó una variación del método descrito por Gupta y colaboradores (2002) consistente en la cuantificación espectrofotométrica del *p-nitrofenol* liberado por la enzima lipasa de *Burkholderia cepacia* (Sigma-Aldrich 62309-100 mg) a partir del sustrato *p-nitrofenol palmitato* (pNPP) (Gupta *et al.*, 2002. Analytical Biochemistry, 311: 98-99). Para ello se utilizó 1 ml de medio libre de células (985 μ l de Tris-HCl 0,05M junto a 15 μ l de POB obtenido por el método del “ordeñado bacteriano”) mezclado con 1 ml de solución sustrato de un cultivo en fase estacionaria. Esta mezcla de ensayo se incubó a 30°C durante 30 minutos en microtubos estériles de 2 ml. La reacción se paró mediante incubación a 100°C durante 4 minutos en termobloque y 2 minutos a -20°C. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Hitachi U-2000 a una longitud de onda de 410 nm. La solución sustrato (SS) se preparó mezclando 10 ml de solución A (30 mg de pNPP en 10 ml de isopropanol) con 90 ml de solución B (0,1 g de goma arábiga y 0,4 ml de Tritón X-100 en 90 ml tampón Tris-HCl 50 mM pH8). La mezcla de solución A y B se agitó suavemente hasta su total disolución. La Fig. 2 muestra los valores de protección de la enzima lipasa al secado generados por los POBs y POBSIAs producidos por la cepa.

Ejemplo 3

Ensayo del aumento de la tolerancia al estrés hídrico de plantas

Se estudió la capacidad que tenía la cepa 3J1 sobre las plantas para protegerlas frente a condiciones de sequía y/o de promocionar el crecimiento de las mismas. En esta primera fase de experimentación, se utilizaron plantas de pimiento dulce (*Capsicum annuum*).

14 días después de la germinación de las semillas de dichas plantas, se cesó el riego de todas las macetas para comenzar a provocar condiciones de estrés por sequía en las plantas considerando este momento como el tiempo 0. A partir de este momento se tomaron muestras a los 7, 14, 20 y 33 días, mediante la toma de tres plantas inoculadas con la cepa bacteriana *Microbacterium sp.* 3J1. Como control positivo se utilizaron plantas inoculadas con la rizobacteria *P. putida* KT2440 y como control negativo se utilizaron plantas a las que se añadió el volumen equivalente de inóculo en forma de agua y por tanto, no inoculadas. En cada extracción se procedió a la toma de parámetros de Peso Fresco (PF) como el peso de la planta recién extraída; Peso Totalmente Túrgido (PTT) como el peso de la planta después de 48 horas incubada en oscuridad y a una humedad del 100% justo después de su extracción; Peso Seco (PS) como el peso después de incubar la planta durante 48 horas a 75-80°C y el Contenido Relativo de Agua (CRA) definido a través de la ecuación $CRA = (PF-PS)/(PTT-PS)$. Los datos obtenidos se desglosan a continuación.

En general, transcurridos 33 días en ausencia de riego las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 toleraron mejor la sequía mostrando una mejor apariencia y tamaño que las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 o que las plantas no inoculadas como se puede observar en la Fig. 3.

Así, el Contenido Relativo de Agua (CRA) de las plantas de estudio, fue el valor numérico que indicó el grado de resistencia al estrés por sequía que tienen las plantas con sus respectivos tratamientos. Aunque también se llevaron a cabo otros cálculos con los parámetros tomados inicialmente para estudiar todos los aspectos que reflejaron los efectos de la escasez de agua para las plantas. Así, se obtuvo el Índice de Retención de Agua (IRA) determinado como la diferencia entre el Peso Fresco (PF) y el Peso Seco (PS) así como el Potencial de Recuperación de Agua (PRA) por las plantas dada por la diferencia entre el Peso Totalmente Túrgido (PTT) y el Peso Fresco (PF).

Como se puede observar en la Fig. 4 el Peso Fresco (PF) de las plantas inoculadas con cada una de las cepas, sufrió un incremento regular en todas las condiciones durante los primeros puntos de muestreo correspondientes a los días 7 y 20. En las muestras tomadas el día 33 únicamente las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 mostraron un peso fresco superior al registrado el día 20. Así, en las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1, sus valores de PF fueron cuatro veces superiores a los de *P. putida* KT2440 y a los de las plantas no inoculadas.

Análogamente se midió el Peso Seco (PS) de las plantas a los días 7, 14, 20 y 33 después de cesar el riego. El PS de las distintas plantas fue muy inferior al PF, con valores siempre por debajo de 12 mg. Como se observa en la Fig. 5, el peso seco de las distintas plantas inoculadas aumentó ligeramente de forma más o menos regular en todas las condiciones durante los primeros puntos de muestreo. Nuevamente las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 mostraron los valores más elevados, llegando a duplicar al día 33 los valores finales de las plantas inoculadas tanto con *P. putida* KT2440, así como a los de las plantas no inoculadas.

También se tomaron los valores correspondientes al peso totalmente túrgido (PTT) de las plantas a los días 7, 14, 20 y 33 tras el cese del riego. Como se observa en la Fig. 6, el peso totalmente túrgido de las plantas inoculadas con los distintos inóculos estas siguieron un patrón similar al del peso fresco, pero con unidades más altas. Así, aumentó

regularmente en todas las condiciones durante los puntos de muestreo de los días 7, 14 y 20.

En el punto de muestreo del día 33 es cuando se comenzó a apreciar diferencias, ya que a partir del mismo únicamente las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 aumentaron su PTT, llegando a triplicar a los 33 días a los de *P. putida* y los de las plantas no inoculadas.

Un dato más representativo para conocer el estado de estrés hídrico de las plantas es el Contenido Relativo de Agua (CRA), dado que indica la relación entre el agua presente en las plantas en el momento de la extracción respecto del agua total. De esta forma, el valor máximo de 1 se daría en la situación teórica en que por su buen estado hídrico, la planta no pudiera o no necesitara recuperar agua en su estado totalmente túrgido (PTT) con respecto al Peso Fresco (PF).

En general se observa que para el punto de muestreo del día 14, en todas las plantas inoculadas, salvo en las no inoculadas, el parámetro CRA descendió aunque de manera leve respecto al valor que se registró en el día 7 aunque este parámetro volvió a aumentar entre los días 14 y 20. Respecto a las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1, el valor de CRA aumentó entre los días 14 y 20. Para las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, el valor de CRA se redujo levemente entre los días 14 y 20 (menos del 5%) y aumentó algo más del 5% entre los días 20 y 33. Para las plantas no inoculadas, el valor de CRA se redujo muy levemente entre los días 7 y 14, y se mantuvo prácticamente estable entre los días 14 y 20. Sin embargo al día 33, sólo el valor de CRA en las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 mostró una tendencia a seguir aumentando, generando valores en torno a 0,95. Cabe destacar que el aumento en el valor de CRA para las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 se produjo tanto en el día 20 como en el 33. Los resultados pueden observarse en la Fig. 7.

Para poder cuantificar el índice de retención de agua estructural (IRA) en las distintas plantas, se calculó la diferencia entre PF y PS, aunque este valor no sea tan representativo como el CRA, también permite conocer el estado hídrico de las plantas. Así, como puede observarse en la Fig. 8, los valores más altos se dieron en las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1. Para las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 y las plantas no inoculadas, también se observó un marcado descenso tras el día 20, llegando a tener el día 33 cerca de la mitad del valor que tenían en el día 20.

De esta forma, los valores de IRA de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 para el día 33 de muestreo fueron aproximadamente cinco veces superiores a los de las plantas inoculadas con *P. putida* así como a los de las plantas no inoculadas.

Ejemplo 4

Ensayo del aumento de la biomasa de las plantas inoculadas con Microbacterium sp en condiciones de estrés hídrico

Con objeto de identificar si la cepa bacteriana 3J1 tenía algún tipo de efecto promotor de crecimiento sobre las plantas en condiciones de estrés hídrico, se decidió cuantificar la longitud de las plantas y de sus raíces.

Así, para los datos de altura se tomó como medida la longitud en cm desde la base blanquecina de tallo o el punto donde se encontrarán las primeras raíces, hasta el plano horizontal formado por el primer par de hojas (hojas seminales). Para las raíces se tomó como medida la longitud en cm desde la base blanquecina de tallo o el punto donde se encontrarán las primeras raíces, hasta la punta del ápice radical más largo sin forzar el estiramiento del mismo.

Para el tratamiento de los datos de altura de las plantas, se optó por calcular la diferencia de altura respecto a un punto inicial (tiempo 0). Estos aumentos de altura de las plantas se realizaron en cada punto de muestreo en el momento de la extracción de las mismas a la vez que se tomaba el peso fresco y comparando la altura en ese punto de muestreo con la altura inicial de la planta.

En la Fig. 9 se puede observar cómo, en las condiciones de déficit hídrico, las plantas inoculadas alcanzaron mayor altura que las plantas no inoculadas. Las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 crecieron de forma sostenida incluso hasta 33 días tras iniciar el proceso de déficit hídrico, caso que no se observó en las plantas inoculadas con *P. putida* así como en las plantas no inoculadas. En estos últimos casos se pudo observar que tanto en las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 como en las plantas no inoculadas el crecimiento fue muy reducido e incluso se redujo en el último punto de muestreo (día 33). De este modo, a día 33 del ensayo, la diferencia de altura de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 fue más de tres veces superior a los valores de las plantas inoculadas con *P. putida* así como los de las plantas no inoculadas.

Para el tratamiento de los datos de longitud de las raíces, se optó por la medida de las longitudes de las raíces de cada planta inoculada en los puntos de muestreo de los días 7, 14, 20 y 33. La medida se realizó como en el caso de la altura de las plantas en el momento de la extracción de las plantas para la medida del peso fresco. Los datos obtenidos se muestran en la Fig. 10. La longitud de las raíces de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 aumentó hasta el último punto (día 33), mientras que en las plantas inoculadas con la cepa *P. putida* y en las plantas no inoculadas, el crecimiento incluso se redujo en este mismo punto de muestreo.

Ejemplo 5

Ensayo del aumento del crecimiento de las plantas inoculadas con Microbacterium sp en condiciones hídricas óptimas

5 En este ensayo se aplicó la misma metodología empleada con los anteriores con la excepción de que el riego se mantuvo periódicamente (40 ml cada 48-72 horas) desde t=0. A partir de este momento se tomaron muestras a los 7, 14, 20 y 33 días, mediante la toma de tres plantas inoculadas con la cepa bacteriana *Microbacterium sp.* 3J1. Como control positivo se utilizaron plantas inoculadas con la rizobacteria promotora del crecimiento de plantas *P. putida* KT2440 y como control negativo se utilizaron plantas a las que se añadió el volumen equivalente de inóculo en forma de agua y por tanto, no inoculadas.

15 Para los datos de altura se tomó como medida la longitud en cm desde la base blanquecina de tallo o el punto donde se encontraran las primeras raíces, hasta el plano horizontal formado por el primer par de hojas (hojas seminales). Para las raíces se tomó como medida la longitud en cm desde la base blanquecina de tallo o el punto donde se encontraran las primeras raíces, hasta la punta del ápice radical más largo sin forzar el estiramiento del mismo.

20 Para el tratamiento de los datos de altura de las plantas, se optó por calcular la diferencia de altura respecto a un punto inicial (tiempo 0). Estos aumentos de altura de las plantas se realizaron en cada punto de muestreo en el momento de la extracción de las mismas a la vez que se tomaba el peso fresco y comparando la altura en ese punto de muestreo con la altura inicial de la planta.

25 Como puede observarse en la Fig. 11, las alturas alcanzadas por las plantas inoculadas con cepas fueron en todos los casos mayores que las obtenidas por las plantas sin inocular al día 33 del experimento. Los mayores aumentos de altura se dieron entre los días 20 y 33 del ensayo, llegando a ser de casi 4 veces para las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1. Este aumento no fue significativo para las plantas no inoculadas. Al día 33 del experimento, los valores obtenidos por las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 llegaron a ser 1,5 veces superiores a los obtenidos por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, y 6 veces superiores a los obtenidos por plantas no inoculadas. Los valores obtenidos por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 al día 33 del ensayo llegaron a ser tres veces superiores a los obtenidos por plantas no inoculadas.

30 Para el tratamiento de los datos de longitud de las raíces, se optó por la medida de las longitudes de las raíces de cada planta inoculada en los puntos de muestreo de los días 7, 14, 20 y 33. La medida se realizó como en el caso de la altura de las plantas en el momento de la extracción de las plantas para la medida del peso fresco. Los datos obtenidos se muestran en la Fig. 12.

35 Únicamente los datos obtenidos por las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 fueron estadísticamente superiores respecto al resto de valores obtenidos por las plantas con otro inóculo. De tal modo, los valores obtenidos por las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 fueron casi 1,5 veces superiores a los valores obtenidos por las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, así como por los obtenidos por las plantas sin inocular.

40 Como parámetros indirectos relacionados con el tamaño de la planta se tomaron medidas de Peso Fresco (PF), Peso Seco (PS), Peso Totalmente Túrgido (PTT), así como la combinación de los mismos para obtener los parámetros de Contenido Relativo de Agua (CRA), Potencial de Recuperación de Agua (PRA) e Índice de Retención del Agua (IRA), descritos también para el ensayo anterior.

45 Como se puede observar en la Fig. 13, el Peso Fresco (PF) de las plantas inoculadas con cada una de las cepas, sufrió un incremento regular en todas las condiciones durante los primeros puntos de muestreo correspondientes a los días 7 y 20. En las muestras tomadas el día 33, las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 mostraron un peso fresco superior al resto, en torno a 10% superior al de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 y casi el doble superior al de las plantas no inoculadas.

50 Análogamente se midió el Peso Seco (PS) de las plantas a los días 7, 14, 20 y 33. El PS de las distintas plantas fue muy inferior al PF, con valores siempre por debajo de 12 mg. Como se puede observar en la Fig. 14, el peso seco de las distintas plantas inoculadas aumentó ligeramente de forma más o menos regular en todas las condiciones durante los primeros puntos de muestreo. En el día 14 del ensayo las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 tuvieron una disminución leve en sus valores de PS. Las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 y con *P. putida* KT2440 mostraron los valores más elevados que los obtenidos por las plantas no inoculadas, llegando a ser en el día 33 del ensayo en torno al 40% superiores.

55 También se tomaron los valores correspondientes al peso totalmente túrgido (PTT) de las plantas a los días 7, 14, 20 y 33. Como se puede observar en la Fig. 15, el peso totalmente túrgido de las plantas inoculadas con los distintos inóculos siguió un patrón similar al del peso fresco, pero con unidades más altas. Así, aumentó más o menos regularmente en todas las condiciones durante los puntos de muestreo de los días 7, 14 y 20.

60 En el punto de muestreo del día 33 se alcanzó el mayor valor en este crecimiento en las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.*, llegando a ser este cerca del 10% mayor al obtenido por las plantas inoculadas con *P. putida*, y en torno al 75% respecto al de las plantas no inoculadas.

Respecto al índice de retención de agua estructural (IRA) en las distintas plantas, nos muestra que la retención de agua aumentó muy levemente entre los días 1 y 20 del experimento en todas las plantas, pero que en el día 33 se produjo un aumento de la retención estructural de agua en las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1 y con *P. putida* KT2440 de entre el 25 y el 50%. No se observa tal aumento en el valor de IRA para las plantas no inoculadas, llegando a ser el valor de IRA de las mismas incluso la mitad que el de las plantas inoculadas con *Microbacterium sp.* 3J1. Los datos pueden observarse en la Fig. 16.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Microorganismo de la especie bacteriana *Microbacterium sp.* con número de acceso CECT7624.
- 5 2. Población bacteriana que comprende el microorganismo según la reivindicación 1.
3. Uso del microorganismo según la reivindicación 1 o de la población bacteriana según la reivindicación 2 para aumentar la tolerancia al estrés hídrico de una planta, respecto de un control.
- 10 4. Uso del microorganismo según la reivindicación 1 o de la población bacteriana según la reivindicación 2 para aumentar la biomasa de una planta, respecto de un control, en condiciones de estrés hídrico.
- 15 5. Uso del microorganismo según la reivindicación 1 o de la población bacteriana según la reivindicación 2 para aumentar la cantidad de agua absorbida por una planta, respecto de un control, en condiciones de estrés hídrico.
- 20 6. Uso del microorganismo según la reivindicación 1 o de la población bacteriana según la reivindicación 2 para aumentar índice de retención de agua de una planta, respecto de un control, en condiciones de estrés hídrico.
7. Uso del microorganismo según la reivindicación 1 o de la población bacteriana según la reivindicación 2 para aumentar el crecimiento de una planta respecto de un control.
8. Uso según la reivindicación 7, donde el aumento del crecimiento se refiere al aumento de la longitud del tallo de dicha planta.
- 25 9. Uso según la reivindicación 7, donde el aumento del crecimiento se refiere al aumento de la longitud de la raíz de dicha planta.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, donde la planta es del género *Capsicum*.
- 30 11. Uso según la reivindicación 10, donde la planta es de la especie *Capsicum annuum*.
12. Método para aumentar la tolerancia al estrés hídrico de una planta respecto de un control, que comprende inocular el microorganismo según la reivindicación 1 o la población bacteriana según la reivindicación 2 a una célula vegetal, a cualquier parte de una planta o a una semilla.
- 35 13. Método según la reivindicación 12, donde el microorganismo según la reivindicación 1 o la población bacteriana según la reivindicación 2 se pone en contacto con al menos una raíz de dicha planta.
14. Método según la reivindicación 13, donde dicho microorganismo o población bacteriana se ponen en contacto con al menos una raíz por medio de una solución acuosa.
- 40 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, donde la planta es del género *Capsicum*.
16. Método según la reivindicación 15, donde la planta es de la especie *Capsicum annuum*.
- 45 17. Uso del microorganismo según la reivindicación 1 o de la población bacteriana según la reivindicación 2 para la producción de una composición xeroprotectora.
18. Composición xeroprotectora producida por el microorganismo según la reivindicación 1 o por la población bacteriana según la reivindicación 2.
- 50 19. Composición según la reivindicación 18, que comprende trehalosa, ácido oxoglucurónico, lactato, glutamato, glutamina y piruvato.
- 55 20. Composición según la reivindicación 19, que comprende una proporción de trehalosa:ácido oxoglucurónico:lactato:glutamato:glutamato:glutamato:piruvato, de entre (0,5 y 1,5) : (0,03 y 0,09) : (0,3 y 0,9) : (0,05 y 0,15) : (0,05 y 0,15), (0,1 y 0,3), respectivamente.
21. Composición según la reivindicación 20, donde la proporción de trehalosa: ácido oxoglucurónico:lactato: glutamato:glutamato:glutamato:piruvato es de entre (0,7 y 1,3) : (0,05 y 0,07) : (0,5 y 0,7) : (0,07 y 0,12) : (0,07 y 0,12) : (0,15 y 0,25), respectivamente.
- 60 22. Composición según la reivindicación 18 que comprende trehalosa, ácido oxoglucurónico, lactato, glutamato, glutamina, fucosa y piruvato.
- 65 23. Composición según la reivindicación 22 que comprende una proporción de trehalosa:ácido oxoglucurónico:lactato:glutamato:glutamato:glutamato:fucosa:piruvato, de entre (0,5 y 1,5) : (0,15 y 0,45) : (0,7 y 1,7) : (0,1 y 0,2) : (0,15 y 0,45), (1,2 y 3,4), (0,15 y 0,3), respectivamente.

24. Composición según la reivindicación 23, donde la proporción de trehalosa:ácido oxoglucurónico:lactato:glutamato:glutamina:fucosa:piruvato es de entre (0,7 y 1,3) : (0,25 y 0,35) : (0,9 y 1,6) : (0,12 y 0,18) : (0,2 y 0,4) : (1,8 y 2,8) : (0,2 y 0,25), respectivamente.

5 25. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 24 para la conservación de material biológico con un contenido de humedad residual igual o inferior al 10%.

26. Uso según la reivindicación 25, donde el material biológico es un organismo invertebrado, una semilla, una plántula, un microorganismo, un órgano aislado, un tejido biológico aislado o una célula.

10 27. Uso según la reivindicación 25, donde el material biológico es una molécula con actividad biológica.

28. Uso según la reivindicación 27, donde la molécula con actividad biológica es una enzima.

15 29. Uso según la reivindicación 28, donde la enzima es una lipasa.

30. Método para obtener la composición xeroprotectora según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 24 que comprende:

20 a) cultivar el microorganismo de la reivindicación 1 o la población de la reivindicación 2 en un medio mineral con fructosa como fuente de carbono,

b) deshidratar los microorganismos obtenidos en el cultivo del paso (a) hasta que tengan una humedad residual igual o inferior al 10%,

25 c) rehidratar los microorganismos deshidratados del paso (b) en un medio hipotónico, y

d) seleccionar la fracción líquida del producto obtenido en el paso (c) que comprende la composición xeroprotectora.

30 31. Método según la reivindicación 30, donde la deshidratación de los microorganismos según el paso (b) se lleva a cabo por medio de una solución hipertónica o por medio de una corriente de aire.

35 32. Método según cualquiera de las reivindicaciones 30 ó 31, donde el medio hipotónico para la rehidratación de los microorganismos según el paso (c) es agua parcial o totalmente destilada, desionizada o desmineralizada.

40 33. Método según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 32, donde además, la fracción líquida del paso (d) se deshidrata hasta que el producto xeroprotector tenga una humedad residual igual o inferior al 10%.

45

50

55

60

65

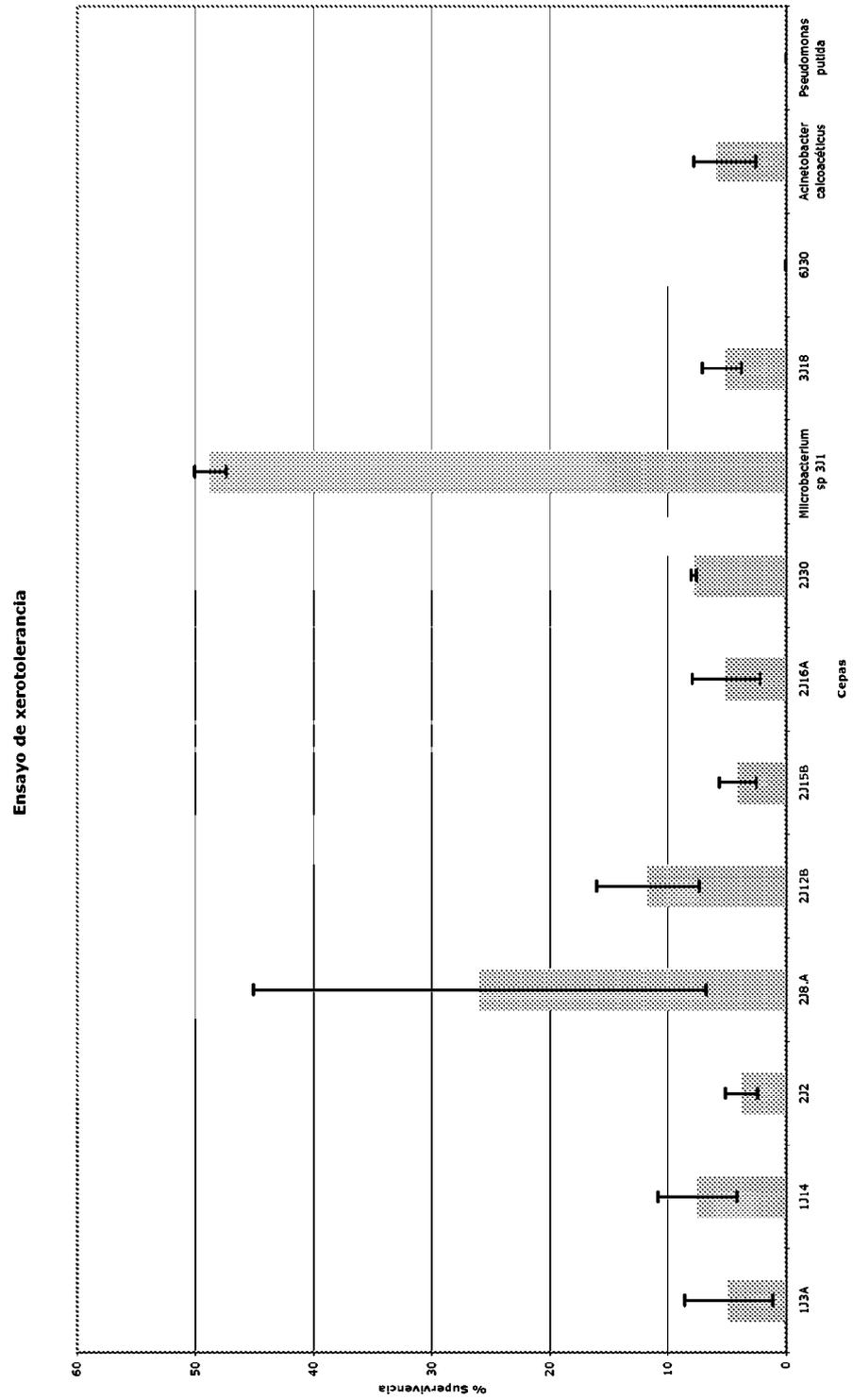


FIG. 1

Ensayo de xeroprotección

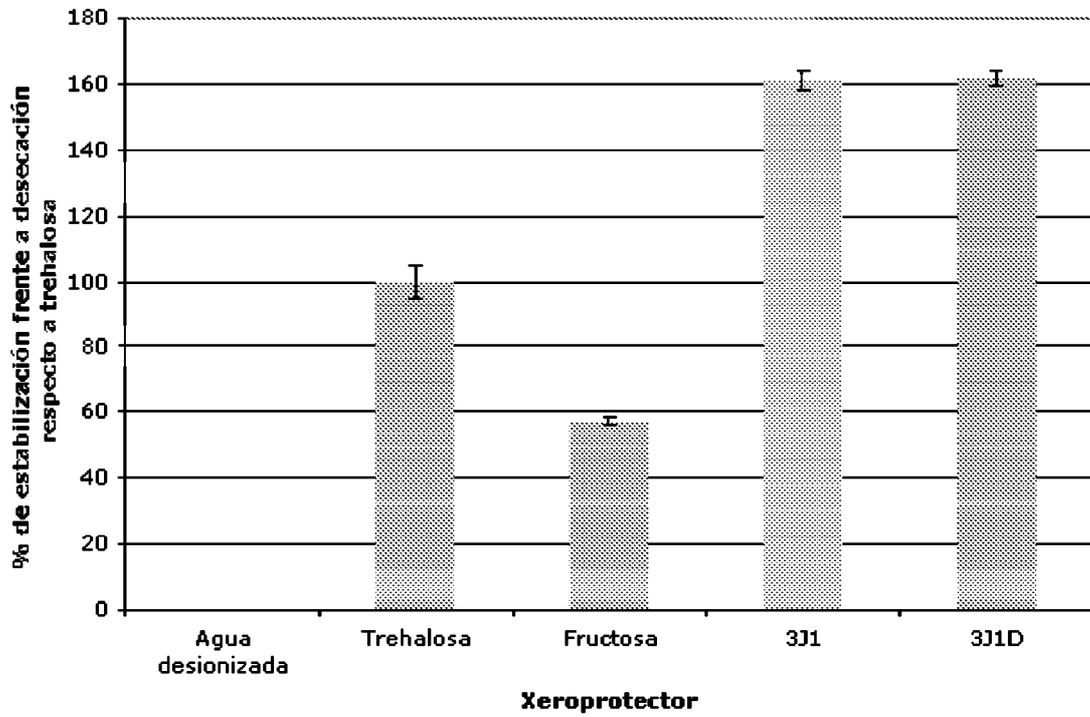


FIG. 2

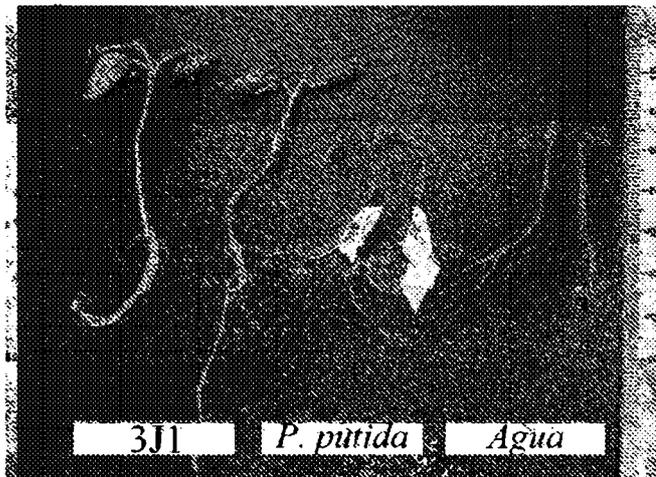


FIG. 3

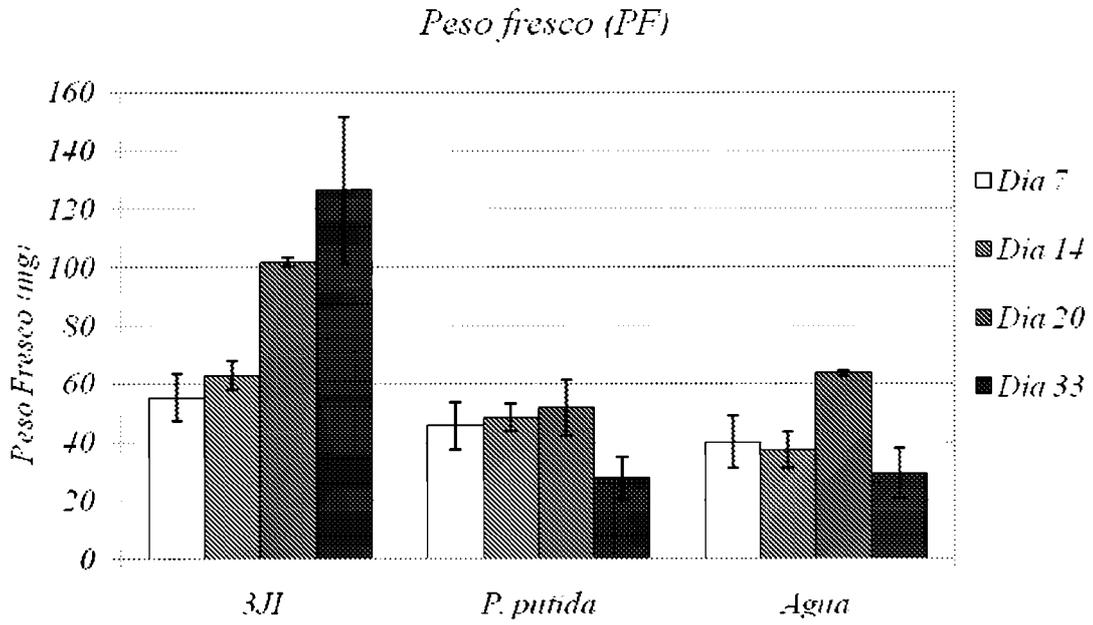


FIG. 4

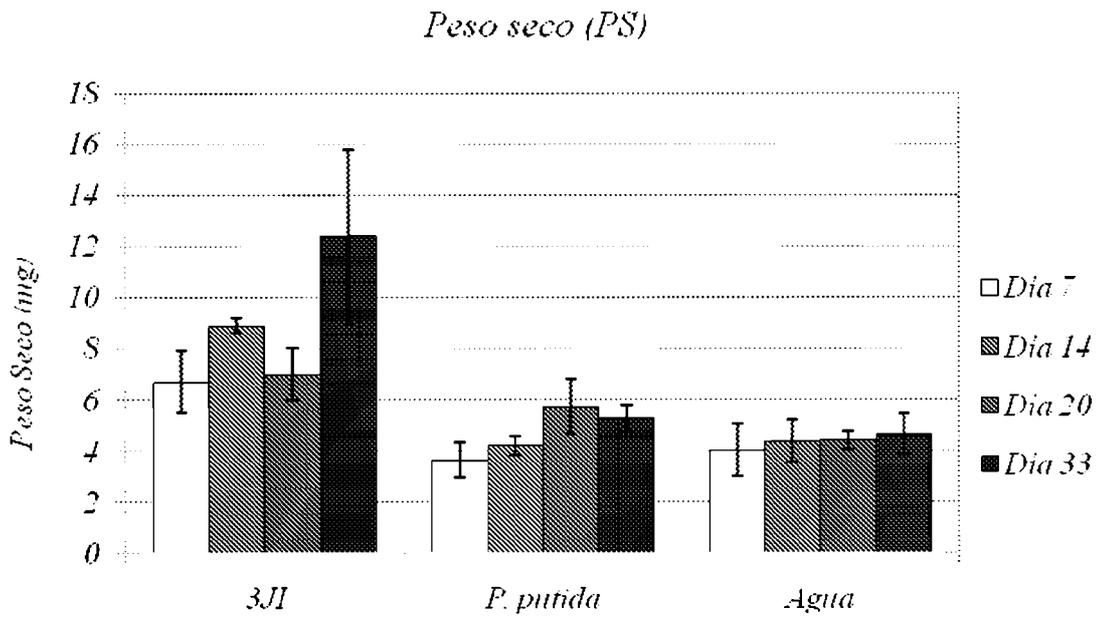


FIG. 5

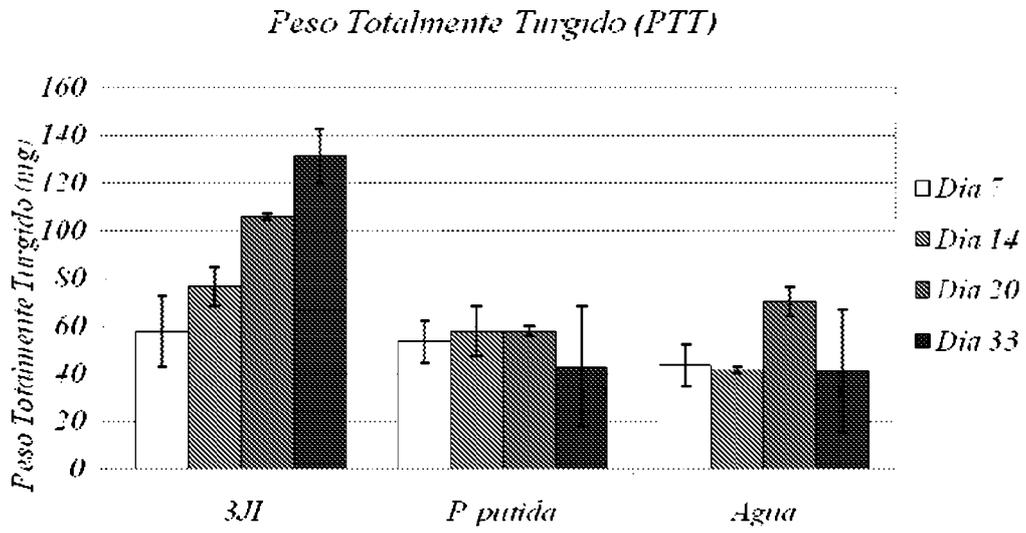


FIG. 6

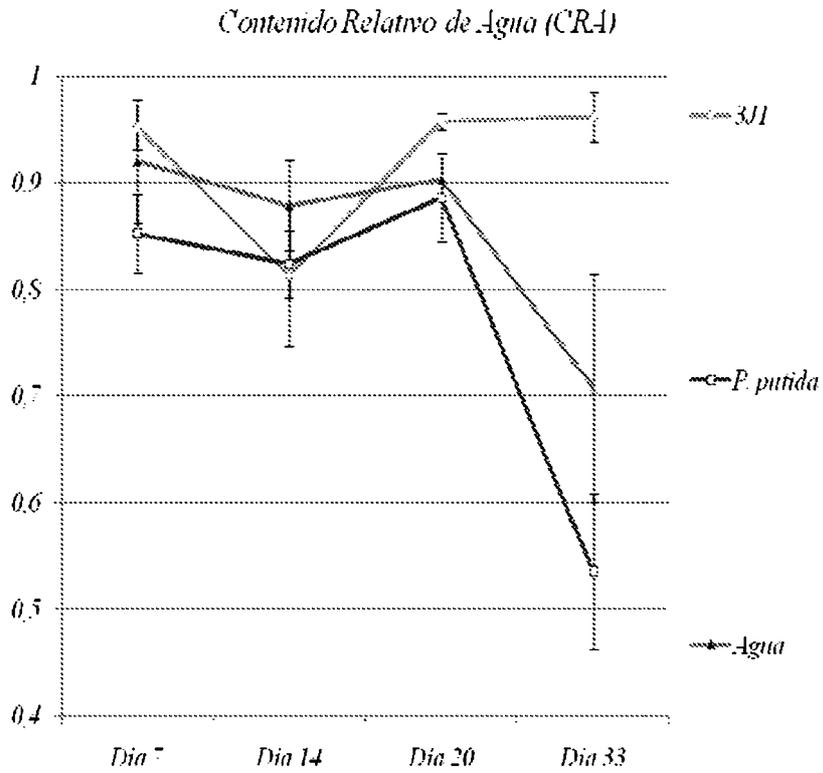


FIG. 7

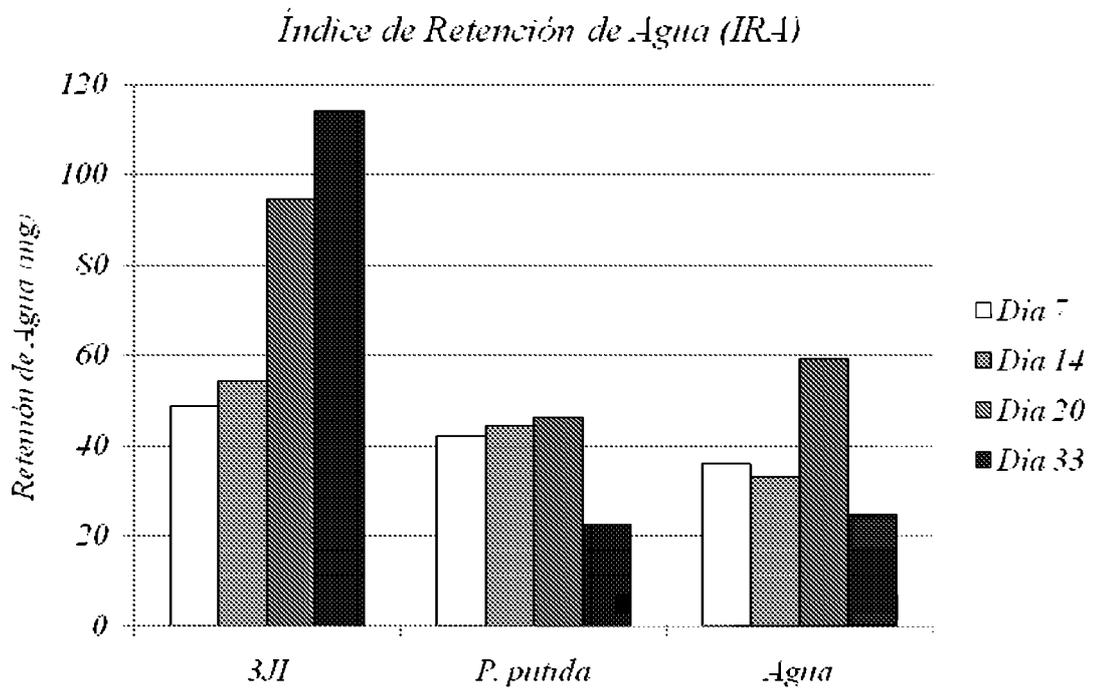


FIG. 8

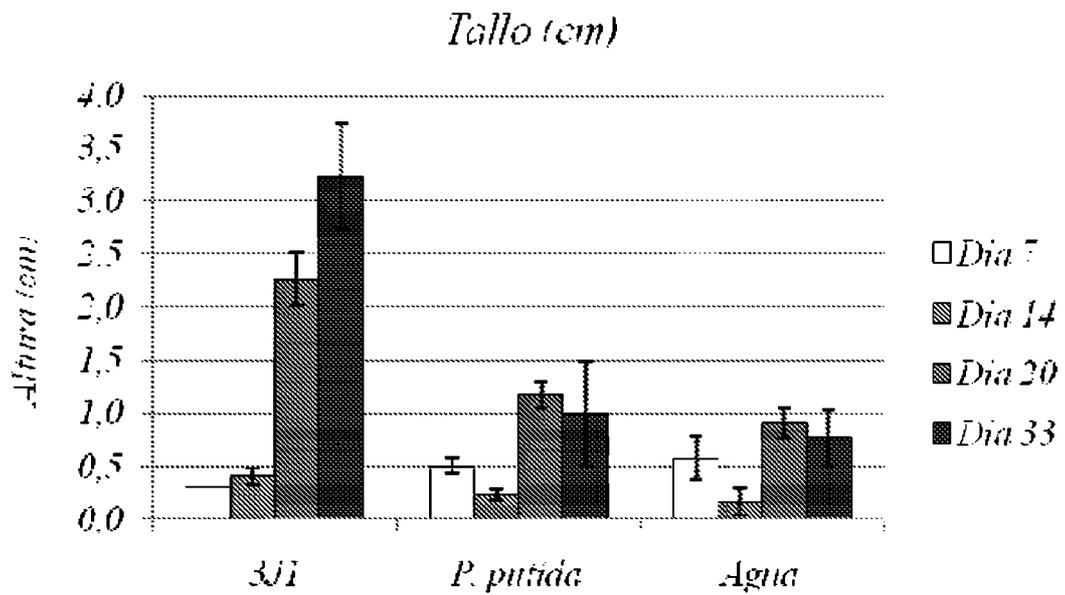


FIG. 9

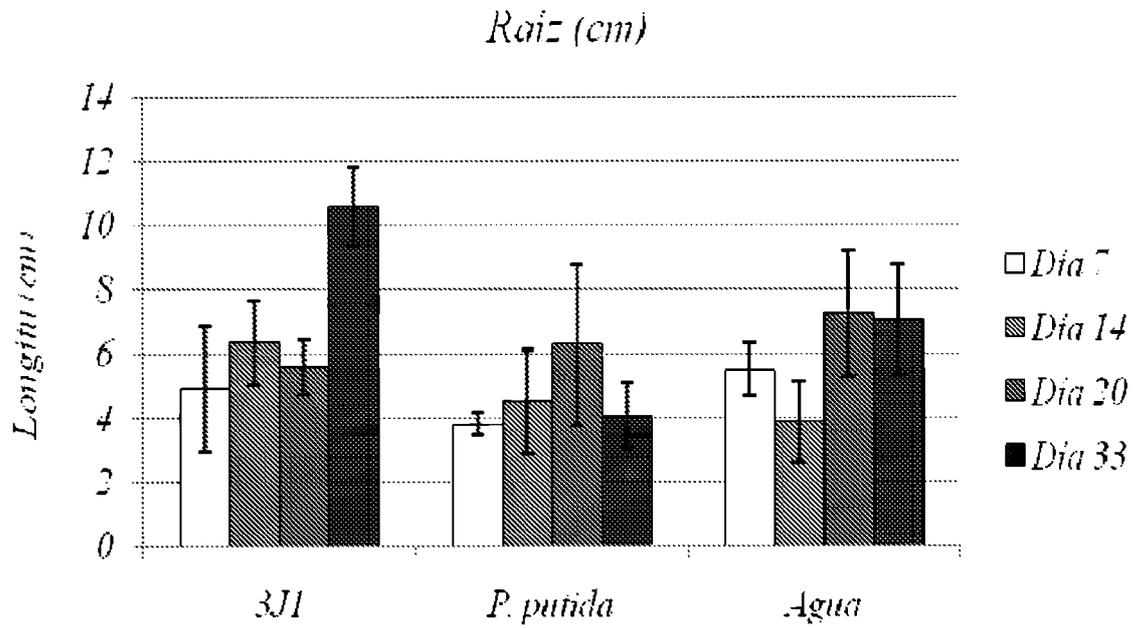


FIG. 10

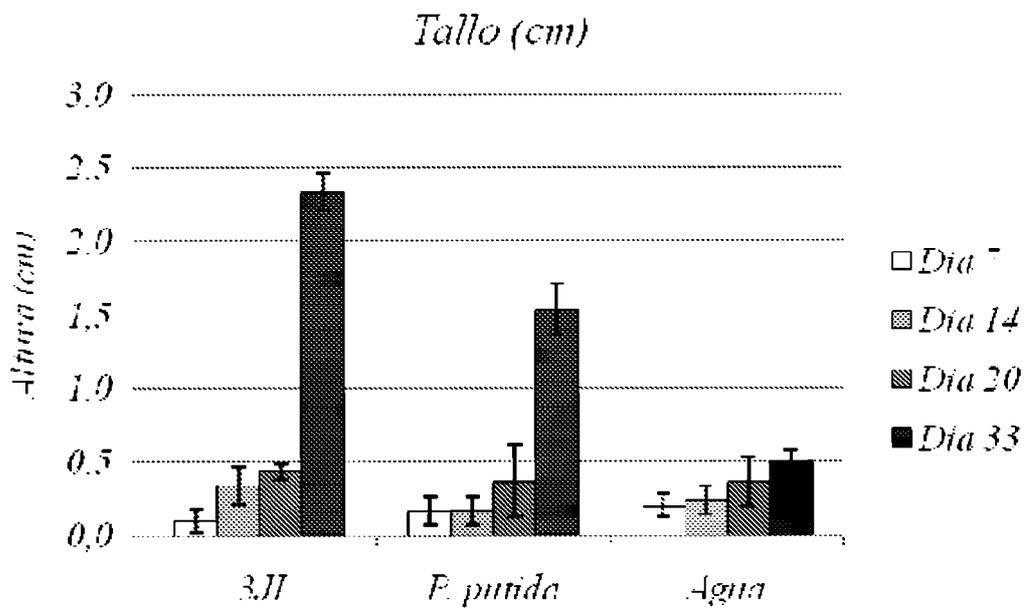


FIG. 11

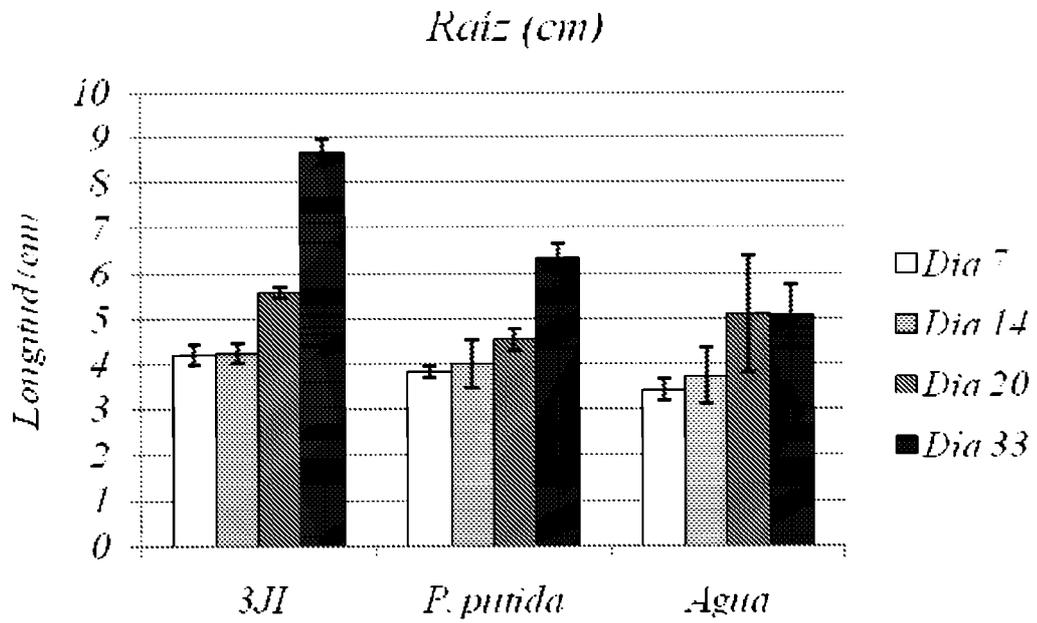


FIG. 12

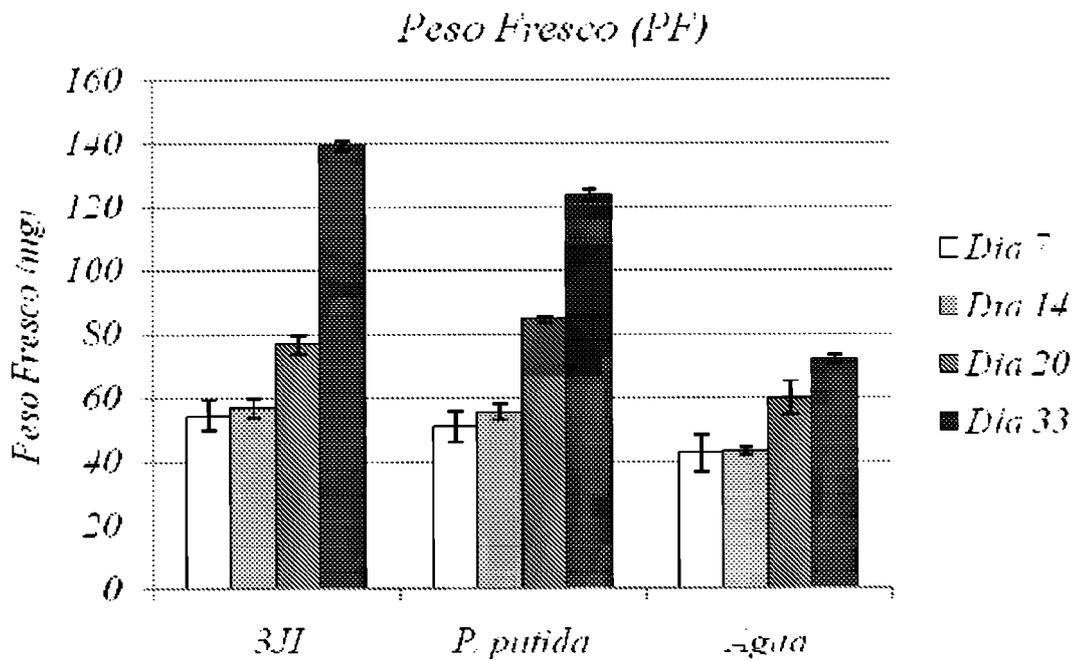


FIG. 13

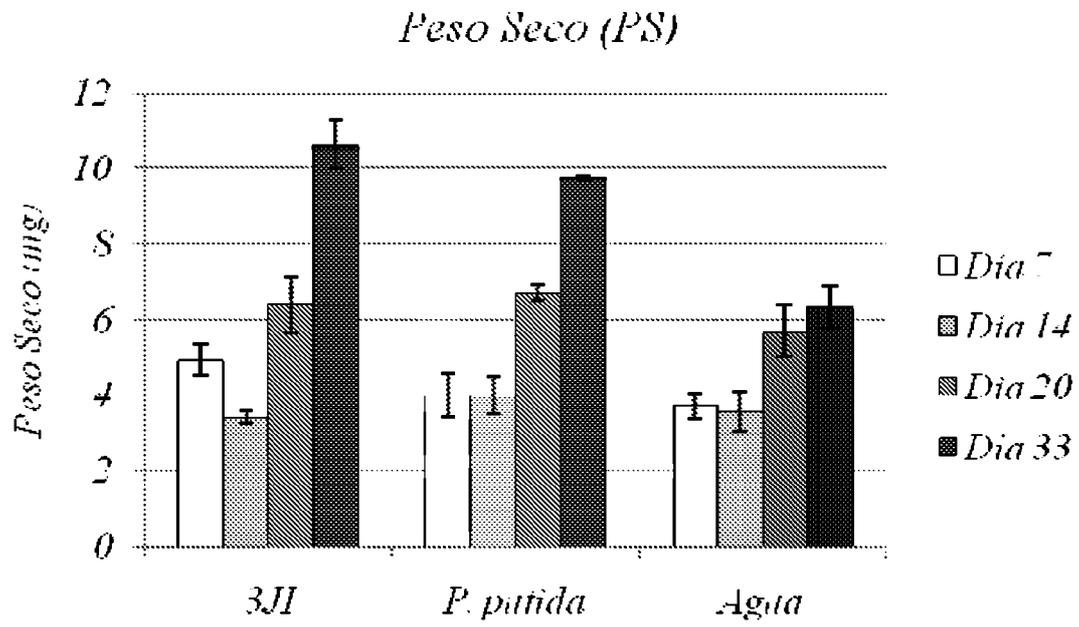


FIG. 14

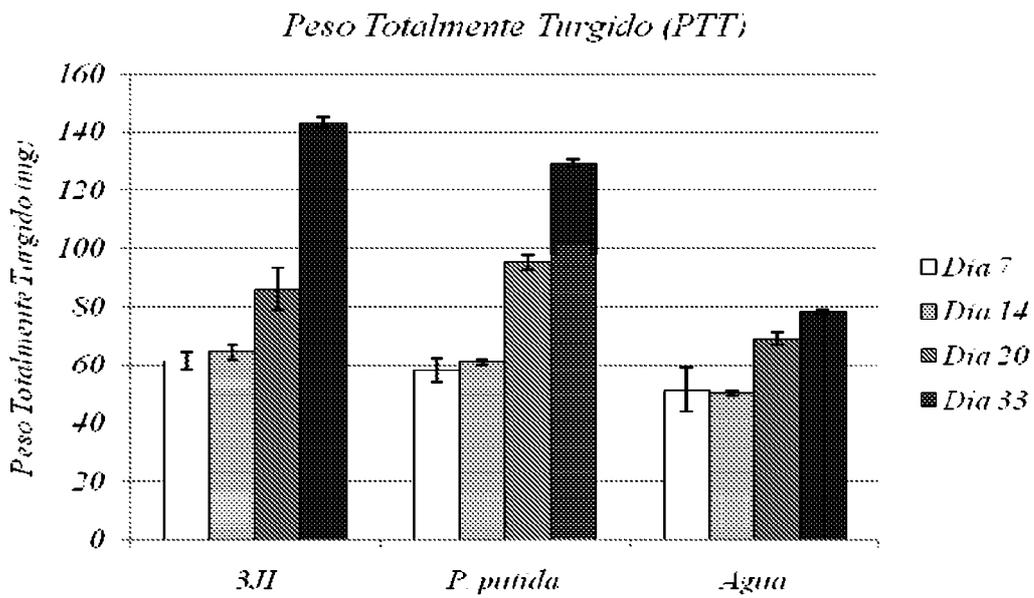


FIG. 15

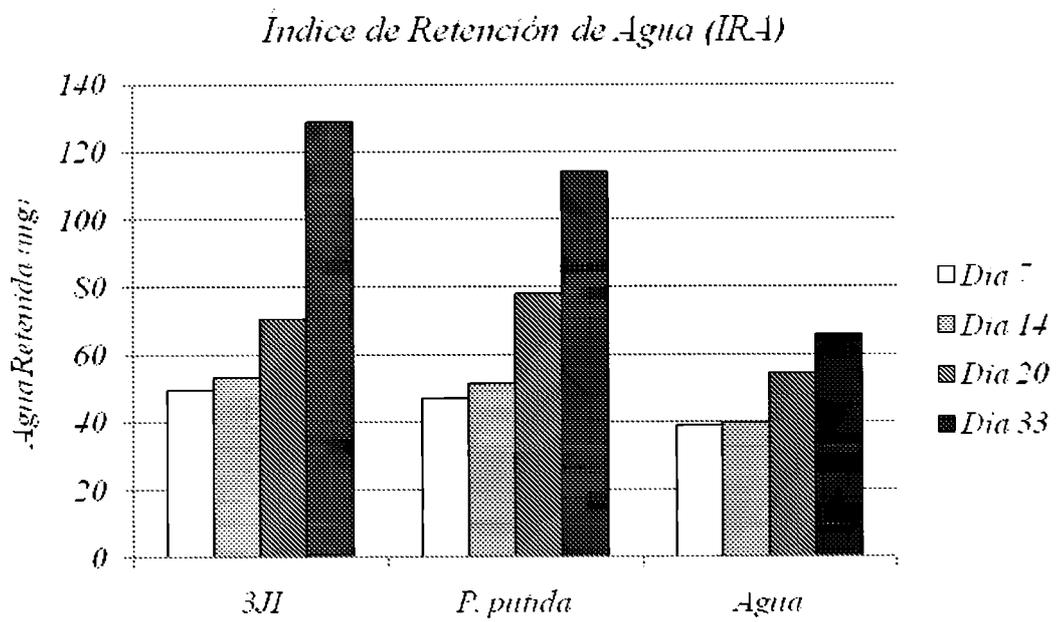


FIG. 16



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 200931119

②² Fecha de presentación de la solicitud: 04.12.2009

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12N1/20** (2006.01)
C12R1/01 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EGAMBERDIEVA D. Plant growth promoting properties of rhizobacteria isolated from wheat and pea grown in loamy sand soil. 2008. <i>Turk. J. Biol.</i> Vol. 32, páginas 9-15.	1-33
A	KARLIDAG H., et al. Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. 2007. <i>Scientia Horticulturae</i> . Vol. 114, páginas 16-20.	1-33
A	GNEIDING K., et al. Identities of <i>Microbacterium</i> spp. encountered in human clinical specimens. 2008. <i>Journal of Clinical Microbiology</i> . Vol. 46, No. 11, páginas 3646-3652.	1-33

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

01.06.2011

Examinador

I. Rueda Molins

Página

1/4

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

C12N, C12R

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.06.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-33	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-33	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Numero Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EGAMBERDIEVA D. Plant growth promoting properties of rhizobacteria isolated from wheat and pea grown in loamy sand soil. <i>Turk. J. Biol.</i> Vol. 32, páginas 9-15.	2008
D02	KARLIDAG H., et al. Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. <i>Scientia Horticulturae.</i> Vol. 114, páginas 16-20.	2007
D03	GNEIDING K., et al. Identities of <i>Microbacterium</i> spp. encountered in human clinical specimens. <i>Journal of Clinical Microbiology.</i> Vol. 46, No. 11, páginas 3646-3652.	2008

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

La solicitud de patente divulga un microorganismo de la especie bacteriana *Microbacterium* sp. con número de acceso CECT7624, así como diferentes usos del citado microorganismo: para el aumento de la tolerancia al estrés hídrico de una planta, para la producción de una composición xeroprotectora, para aumentar el crecimiento de una planta...

Los documentos D01 y D02 divulgan como *Microbacterium* sp incrementan el crecimiento de determinadas especies vegetales.

El documento D03 divulga estudios realizados con *Microbacterium* sp.

Ninguno de los documentos citados (D01, D02 y D03) refleja de manera detallada las características de la especie bacteriana *Microbacterium* sp. empleada, por lo que, no se puede afirmar que dichos microorganismos tengan similares características a las que presenta *Microbacterium* sp. con número de acceso CECT 7624. Por tanto, las reivindicaciones 1-33 presentan novedad y actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP11/1986.