

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 911**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/00** (2006.01)

**A01N 63/00** (2006.01)

**C12R 1/07** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2012 PCT/JP2012/062935**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2012 WO2012161160**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2012 E 12789590 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2716748**

54 Título: **Cepa que pertenece al género Bacillus, agente microbiológico, y procedimiento de cultivo de plantas**

30 Prioridad:  
**26.05.2011 WO PCT/JP2011/062109**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.06.2017**

73 Titular/es:  
**SDS BIOTECH K. K. (100.0%)  
1-5 Higashi-Nihombashi 1-chome Chuo-ku  
Tokyo 103-0004, JP**

72 Inventor/es:  
**AMAKI, YUSUKE;  
TANAKA, KEIJITSU;  
TANAKA, MOTOKI y  
TAKAHASHI, AKITOMO**

74 Agente/Representante:  
**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 616 911 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Cepa que pertenece al género *Bacillus*, agente microbiológico, y procedimiento de cultivo de plantas.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un nuevo microorganismo útil para controlar enfermedades de las plantas y daño por nematodos y promover el crecimiento de las plantas. Específicamente, la presente invención se refiere a las cepas AT-332 y AT-79 de *Bacillus* sp., que son un nuevo microorganismo que presenta unos efectos muy superiores para controlar las enfermedades de las plantas y el daño por nematodos y promover el crecimiento de las plantas, en comparación con los microorganismos pertenecientes a un *Bacillus amyloliquefaciens* estrechamente relacionado divulgado en la literatura; y un agente de control de enfermedades de las plantas, un agente de control de nematodos y un promotor del crecimiento de las plantas que contiene el cuerpo del hongo y el cultivo de los microorganismos.

15 **Antecedentes de la técnica**

Un procedimiento importante para controlar enfermedades de las plantas y los nematodos es un procedimiento que utiliza pesticidas químicos, y los pesticidas químicos han permitido una producción estable de los cultivos hasta la fecha. Sin embargo, recientemente resulta difícil controlar totalmente el impacto sobre el medio ambiente debido al uso continuo de pesticidas químicos, y la aparición de bacterias resistentes a fármacos por los pesticidas químicos convencionales; y enfermedades tales como enfermedades bacterianas que son difíciles de controlar, se están convirtiendo en un problema importante. En consecuencia, la tecnología de control biológico que utiliza un microorganismo aislado de la naturaleza concentra una atención creciente, y algunos pesticidas de microorganismos han sido producidos comercialmente. Sin embargo, los pesticidas microbiológicos convencionales tienen el defecto de que el efecto no es estable y existen menos enfermedades aplicables en comparación con los pesticidas químicos. En estas circunstancias, existe una demanda creciente por un nuevo pesticida microbiológico que presente unas nuevas enfermedades aplicables y presente un efecto de control estable.

30 Como un agente de control de enfermedades de las plantas que utiliza un microorganismo, un agente *Talaromyces flavus*, un agente *Pseudomonas fluorescens*, un agente de avilurencia *Erwinia carotovora*, un agente *Trichoderma atroviride*, un agente *Bacillus simplex*, un agente *Bacillus subtilis* y similares están registrados como pesticidas microbiológicos y han sido utilizados.

35 Como un agente de control de nematodos que utiliza un microorganismo, un agente *Pasteuria penetrans* y un agente *Monacrosporium phymatophagum* están registrados como pesticidas microbiológicos y han sido utilizados.

La memoria de la patente japonesa nº 2955655 (Documento de patente 1) divulga un agente de control de enfermedades de las plantas que utiliza unas bacterias pertenecientes a *Bacillus amyloliquefaciens*. El principio activo del agente de control de enfermedades de las plantas es el producto del microorganismo y las bacterias *per se* no se usan como un pesticida. Más aún, el objetivo del control es una enfermedad causada por bacterias filamentosas, y el documento no divulga el control de la enfermedad bacteriana. La publicación JP-A-2009-247302 (Documento de patente 2) divulga un pesticida de microorganismo que puede controlar la enfermedad causada por bacterias filamentosas y la enfermedad bacteriana al mismo tiempo, en el que las células bacterianas viables *per se* son eficaces, pero el documento no incluye ninguna descripción sobre el control de nematodos.

La memoria de la patente japonesa nº 3471815 (Documento de patente 3; WO 98/050422) divulga un agente de control de enfermedades de las plantas que utiliza unas bacterias *Bacillus*, que puede usarse para una amplia gama de enfermedades de las plantas y es eficaz sobre el gusano de la raíz del maíz, pero el documento no incluye ninguna descripción sobre el control de nematodos. La memoria de la patente japonesa nº 4071036 (Documento de patente 4; US 2004/265292) divulga la cepa D747 de *Bacillus* sp. que puede usarse para controlar enfermedades de las plantas e insectos dañinos, pero el documento no incluye ninguna descripción sobre el control de nematodos.

La memoria de la patente japonesa nº 3471811 (Documento de patente 5; WO 96/032840) divulga un agente de control de nematodos que utiliza unas bacterias del género *Bacillus*. El principio activo del agente de control de nematodos es la bacteria o espora de la cepa de *Bacillus firmus* que presenta una actividad antinematodos, pero el documento no incluye ninguna descripción sobre el control de enfermedades de las plantas. La memoria de la patente japonesa nº 4359653 (Documento de patente 6; WO 1997/012980) divulga un método para controlar nematodos usando una toxina producida por una nueva cepa de *Bacillus thuringiensis*, pero el documento no incluye ninguna descripción sobre el control de enfermedades de las plantas.

En la agricultura, los fertilizantes químicos son un importante material agrícola que influye en el rendimiento de los cultivos. Sin embargo, 30 a 50% de los componentes de los fertilizantes químicos usados no son utilizados en los cultivos sino que difunden al medio ambiente, lo que causa eutrofización de los ríos y contaminación de las aguas subterráneas. Una gran cantidad de combustibles fósiles se usa en la producción de fertilizantes químicos, y el coste de producción de los fertilizantes químicos aumenta junto con los precios en alza de los combustibles fósiles. Más

aún, se dice que el óxido de nitrógeno (NOx) como un producto de descomposición de un fertilizante nitrogenado, es aproximadamente 300 veces más eficaz en emisiones de invernadero que el dióxido de carbono, y existe una preocupación creciente acerca del calentamiento global. Una escasez de alimentos se espera en el futuro debido al crecimiento de la población global, y por lo tanto el uso de un material para aumentar la productividad de los cultivos es inevitable, y existe una necesidad creciente de un material más amigable con el medio ambiente para reemplazar a los fertilizantes químicos convencionales.

A partir de estas circunstancias, se han realizado unos estudios principalmente en una amplia gama de bacterias *Rhizobium*, bacterias *Pseudomonas* y bacterias *Bacillus*. Sin embargo, muy pocas tienen un uso práctico porque son menos eficaces.

Como se expone anteriormente, ninguna bacteria *Bacillus* que sea eficaz sobre las enfermedades de las plantas en general, que esté disponible para controlar nematodos y que sea eficaz para promover el crecimiento de las plantas, se ha conocido hasta la fecha.

### Documentos de la técnica anterior

Documentos de patentes

- Documento de patente 1: Patente japonesa nº 2955655
- Documento de patente 2: JP-A-2009-247302
- Documento de patente 3: Patente japonesa nº 3471815
- Documento de patente 4: Patente japonesa nº 4071036
- Documento de patente 5: Patente japonesa nº 3471811
- Documento de patente 6: Patente japonesa nº 4359653

### Divulgación de la invención

#### Problema que debe resolver la invención

Un objetivo de la presente invención es aislar un nuevo microorganismo de la naturaleza, presentando dicho microorganismo los efectos de controlar múltiples enfermedades de las plantas, controlar nematodos y/o promover el crecimiento de las plantas.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un agente de control de enfermedades de las plantas, un agente de control de nematodos y un promotor del crecimiento de las plantas, que contenga el microorganismo mencionado anteriormente como bacteria activa y pueda usarse como un pesticida biológico (agente microbiológico).

#### Medios para resolver el problema

Como resultado de los estudios exhaustivos para resolver el problema, los presentes inventores han tenido éxito en aislar de la naturaleza una nueva cepa perteneciente al género *Bacillus*, cuya cepa presenta los efectos de controlar múltiples enfermedades de las plantas, controlar nematodos y promover el crecimiento de las plantas, y se ha alcanzado la presente invención.

La presente invención proporciona lo expuesto a continuación.

[1] Una cepa AT-332 de *Bacillus* sp. que presenta el número de acceso NITE BP-1095 y que contiene ADNr 16S representado por la secuencia de bases nº 2.

[2] Una cepa AT-79 de *Bacillus* sp. que presenta el número de acceso NITE BP-1094 y que contiene ADNr 16S representado por la secuencia de bases nº 3.

[3] Una cepa según [1] o [2], en la que la cepa *per se* y/o el cultivo de la cepa muestran los efectos de controlar las enfermedades de las plantas, controlar los nematodos y/o promover el crecimiento de las plantas.

[4] La utilización de la cepa y/o del cultivo de la cepa según cualquiera de [1] a [3] como un agente de control de enfermedades de las plantas, un agente de control de nematodos, o un promotor del crecimiento de las plantas.

[5] Un procedimiento para cultivar plantas que comprende tratar las plantas con la cepa y/o el cultivo de la cepa según cualquiera de [1] a [3].

### Efectos de la invención

Las cepas AT-332 y AT-79 de *Bacillus* sp. de la presente invención pueden controlar una amplia gama de diversas

enfermedades de las plantas y nematodos y, además, pueden promover el crecimiento de plantas útiles debido al cultivo (incluyendo células bacterianas viables) o bacterias vivas cultivadas y aisladas de las cepas que se introducen en el cuerpo de una planta, tal como raíces, tallos, hojas, semillas y frutos, o en el suelo del cultivo.

## 5 Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La Figura 1 representa el árbol filogenético molecular usando la secuencia de bases de ADNr 16S de las cepas AT-332 y AT-79 de *Bacillus* sp. En la figura, los números próximos a las ramas son los valores de remuestreo ("bootstrap") y una barra de escala se muestra en la parte inferior izquierda.

10 [Figura 2] Las fotografías (a) a (d) representan el efecto de promoción del crecimiento de las plantas de la cepa AT-332 en la prueba básica (Ejemplo 12 y Ejemplos comparativos 12-13).

15 [Figura 3] La Figura 3 representa el efecto de promoción del crecimiento del repollo chino de las cepas AT-332 y AT-79 en una prueba en maceta (Ejemplo 13).

## Modo para poner en práctica la invención

20 Los presentes inventores cribaron unos microorganismos provenientes de diversas plantas, suelos y similares, con el propósito de desarrollar de una manera novedosa un pesticida microbiano y/o fertilizante microbiano seguro y superior que presente un amplio espectro antibacteriano contra diversas enfermedades de las plantas, presente una actividad antinematodos y presente el efecto de promover el crecimiento de las plantas. Como resultado, en el contexto de la presente invención se ha realizado un hallazgo útil que consiste en que la cepa aislada del suelo recogido en la prefectura de Ibaraki muestra un amplio espectro antibacteriano contra diversas enfermedades de las plantas, muestra una alta actividad insecticida contra nematodos y tiene el efecto de promover el crecimiento de las plantas.

30 Las dos cepas así aisladas recientemente (cepa AT-332 y cepa AT-79) son bacilos móviles gram positivos, como resulta evidente a partir de las características bacteriológicas que se describen a continuación, y crecen y forman esporas bajo condiciones aeróbicas. Ambas cepas resultaron positivas tanto en la reacción de catalasa como en la reacción de oxidasa. Más aún, como resultado de la identificación basada en la secuencia de bases de aproximadamente 1.500 bp a partir del lado del terminal 5' del ADNr 16S, se confirmó que las cepas eran nuevas cepas pertenecientes al género *Bacillus* relacionadas con *Bacillus amyloliquefaciens*. Debido a las características superiores de tener efectos sobre una amplia gama de enfermedades de las plantas, un gran efecto de control sobre los nematodos y el efecto de promover el crecimiento de las plantas, las cepas AT-332 y AT-79 fueron identificadas como nuevas cepas y fueron denominadas como las cepas AT-332 y AT-79 de *Bacillus* sp. relacionadas con *Bacillus amyloliquefaciens*.

40 La cepa AT-332 y la cepa AT-79 de *Bacillus* sp. de la presente invención han sido depositadas como cepa AT-332 de *Bacillus* sp. y cepa AT-79 de *Bacillus* sp. en la institución depositaria, Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation (2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818 Japón) (fecha original del depósito (fecha aceptada): 2 de mayo de 2011; Números de acceso: NITE BP-1095 y NITE BP-1094).

45 Las características bacteriológicas de *Bacillus* sp. AT-332 (NITE BP-1095) se describen a continuación. Las características bacteriológicas han sido determinadas en referencia a los siguientes documentos. PRIEST (F.G.), GOODFELLOW (M.), SHUTE (L.A.) and BERKELEY (R.C.W.): *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol., 1987, 37, 69-71 y Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Segunda Edición volumen 3.

### (1) Propiedad morfológica

50 Forma: bacteria en forma de bastoncito  
 Tamaño: ancho de 0,8 a 0,9  $\mu\text{m}$  y longitud de 1,5 a 2,0  $\mu\text{m}$   
 Movilidad: +  
 Estado epifítico del flagelo: peritricoso  
 55 Presencia o ausencia de esporas: + (cuasiterminal)

### (2) Características del cultivo

60 Medio de cultivo: medio agar nutritivo (30°C)  
 Forma: circular  
 Prominencia: plana  
 Periferia: margen entero  
 Estado de la superficie: lisa  
 Viscosidad: viscoso  
 65 Transparencia: opaco  
 Matiz de color: color crema

Brillo: apagado  
Producción de pigmentos: no productivo

(3) Características fisiológicas

- 5
- Tinción de Gram: +  
Reducción de nitrato: -  
Reacción de desorción de nitrógeno: -  
Prueba MR: -
- 10
- Prueba VP: +  
Generación de indol: -  
Generación de sulfuro de hidrógeno: -  
Hidrólisis de almidón: +
- 15
- Uso de ácido cítrico:
- (Koser)  
+ (Christensen)
- 20
- Uso de fuente de nitrógeno inorgánica:
- (nitrato)  
+ (sal de amonio)  
Ureasa: -
- 25
- Oxidasa: +  
Catalasa: +
- Intervalo para el crecimiento
- 30
- pH 5: +  
pH 8: +  
pH 9: +
- Temperatura para el crecimiento
- 35
- 37°C: +  
45°C: +  
50°C: +  
55°C: -
- 40
- Crecimiento en condiciones anaeróbicas: -  
Prueba OF (oxidación/fermentación): -/-
- Producción de ácido/producción de gas a partir de azúcares:
- 45
- L-arabinosa: +/-  
D-glucosa: +/-  
D-fructosa: +/-  
Maltosa: +/-
- 50
- Lactosa: -/-  
D-sorbitosa: +/-  
Inositol: +/-  
D-xilosa: +/-  
D-manosa: +/-
- 55
- D-galactosa: -/-  
Sacarosa: +/-  
Trehalosa: +/-  
D-manitol: +/-  
Glicerina: +/-
- 60
- Actividad de  $\beta$ -galactosidasa: -  
Actividad de arginina dihidrolasa: -  
Actividad de lisina descarboxilasa: -  
Actividad de triptófano desaminasa: -
- 65
- Actividad de gelatinasa: +

## ES 2 616 911 T3

Las características bacteriológicas de *Bacillus* sp. AT-79 (NITE BP-1094) se describen a continuación.

### (1) Propiedad morfológica

- 5 Forma: bacteria en forma de bastoncito  
Tamaño: ancho de 0,8 a 0,9  $\mu\text{m}$  y longitud de 1,5 a 2,0  $\mu\text{m}$   
Movilidad: +  
Estado epifítico del flagelo: peritricoso  
Presencia o ausencia de esporas: + (cuasiterminal)

10

### (2) Características del cultivo

- Medio de cultivo: medio agar nutritivo (30°C)  
Forma: circular  
15 Prominencia: plana  
Periferia: margen entero  
Estado de la superficie: lisa  
Viscosidad: viscoso  
Transparencia: opaco  
20 Matiz de color: color crema  
Brillo: apagado  
Producción de pigmentos: no productivo

### (3) Características fisiológicas

- 25 Tinción de Gram: +  
Reducción de nitrato: -  
Reacción de desorción de nitrógeno: -  
Prueba MR: -  
30 Prueba VP: +  
Generación de indol: -  
Generación de sulfuro de hidrógeno: -  
Hidrólisis de almidón: +

35 Uso de ácido cítrico:

- (Koher)
- + (Christensen)

40 Uso de fuente de nitrógeno inorgánica:

- (nitrato)
- + (sal de amonio)

45 Ureasa: -  
Oxidasa: +  
Catalasa: +

Intervalo para el crecimiento

50 pH 5: +  
pH 8: +  
pH 9: +

Temperatura para el crecimiento

55 37°C: +  
45°C: +  
50°C: +  
60 55°C: -

Crecimiento en condiciones anaeróbicas: -  
Prueba OF (oxidación/fermentación): -/  
Producción de ácido/producción de gas a partir de azúcares:

65 L-arabinosa: +/-  
D-glucosa: +/-

- 5 D-fructosa: +/-  
Maltosa: +/-  
Lactosa: -/-  
D-sorbitosa: +/-  
Inositol: +/-  
D-xilosa: +/-  
D-manosa: +/-  
D-galactosa: -/-  
10 Sacarosa: +/-  
Trehalosa: +/-  
D-manitol: +/-  
Glicerina: +/-
- 15 Actividad de  $\beta$ -galactosidasa: -  
Actividad de arginina dihidrolasa: -  
Actividad de lisina descarboxilasa: -  
Actividad de triptófano desaminasa: -  
Actividad de gelatinasa: +
- 20 Las secuencias de bases desde el lado del extremo 5' de ADNr 16S de la cepa AT-332 y la cepa AT-79 de *Bacillus* sp. de la presente invención están representadas por la secuencia nº 2 y la secuencia nº 3, respectivamente.
- 25 La secuencia nº 2 y la secuencia nº 3 difieren entre sí sólo en dos bases, en la base nº 444 y la base nº 1242. La base nº 444 es guanina (g) en la secuencia nº 2 y adenina (a) en la secuencia nº 3, y la base nº 1242 es adenina (a) en la secuencia nº 2 y guanina (g) en la secuencia nº 3.
- 30 Por lo tanto, el microorganismo de la presente invención está caracterizado por que presenta la secuencia de bases de la secuencia nº 1, incluyendo las secuencias mencionadas anteriormente nº 2 y nº 3 (es decir, la base nº 444 y la base nº 1242 están representadas por "r") a partir del lado del extremo 5' de ADNr 16S.
- En la presente invención, la secuencia de bases de ADNr 16S es analizada como se indica a continuación.
- 35 InstaGene Matrix (producido por BIO RAD Laboratories, Inc., California (CA), U.S.A.) fue utilizado para la extracción de ADN; ADN polimerasa PrimeSTAR HS (producida por Takara Bio Inc.) fue utilizada para la PCR; el kit de secuenciación de ciclo BigDye Terminator v3.1 (producido por Applied Biosystems, California (CA), U.S.A.) fue utilizado para determinar la secuencia de ciclo, respectivamente. Los cebadores utilizados (según "Gene Analysis Method - method for determining the base sequence of 16S rRNA gene", Yasuyoshi Nakagawa *et al.*, editado por Society for Actinomycetes Japan, Classification and identification of Actinomycetes, pp. 88-117, Business Center for Academic Societies Japan, 2001) fueron 9F, 339F, 785F, 1099F, 536R, 802R, 1242R y 1541R. La secuencia fue identificada usando el sistema analizador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer System (producido por Applied Biosystems, California (CA), U.S.A.).
- 40 Como resultado de la búsqueda de homología basada en la base de datos internacional de secuencias de bases (GenBank/DDBJ/EMBL) usando BLAST (ALTSCHUL, (S.F.) *et al.*, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acid Res. 1997.25, 3389-3402), las secuencias de bases de ADNr 16S de la cepa AT-332 y la cepa AT-79 presentan un alto grado de homología con el ADNr 16S derivado del género *Bacillus*, y ambas cepas presentan la máxima homología, de 99,9%, con ADNr 16S de la cepa BCRC11601 de *Bacillus amyloliquefaciens*. Por otra parte, como resultado de la búsqueda de homología basada en la base de datos internacional de secuencias de bases (GenBank/DDBJ/EMBL), ninguna secuencia de bases de ADNr 16S de las cepas AT-332 y AT-79 es exactamente igual a la secuencia de bases de ADNr 16S derivada del género *Bacillus*.
- 45 En la presente invención, el análisis filogenético molecular se realiza como se expone a continuación.
- 55 El ADNr 16S derivado de la cepa estándar del grupo de cepas que se suponía que estaban estrechamente relacionadas, fue obtenido a partir de la base de datos internacional de secuencias de bases (GenBank/DDBJ/EMBL) para efectuar el análisis filogenético molecular usando 1.500 bp de la secuencia de bases de ADNr 16S obtenida como se expone anteriormente.
- 60 El ADNr 16S usado para el análisis filogenético molecular es obtenido a partir de las siguientes cepas.
- *Bacillus subtilis*, IAM12118T (AB042061)
  - *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, NBRC101239T (AB325584)
  - *Bacillus mojavensis*, IFO15718 T (AB021191)
  - 65 - *Bacillus vallismortis*, DSM11031 T (AB021198)
  - *Bacillus amyloliquefaciens*, BCRC11601 T (EF433406)

- *Bacillus atrophaeus*, JCM9070 T (AB021181)
- *Bacillus aerophilus*, 28K T (AJ831844)
- *Bacillus sonorensis*, BCRC17416 T (EF433411)
- *Bacillus licheniformis*, DSM13 T (AE017333)
- *Bacillus altitudinis*, 41KF2b T (AJ831842)
- *Bacillus cereus* ATCC14579 T (NC\_004722)BSL2

"T" al final del nombre de la cepa significa la cepa estándar de la especie. BSL significa que la cepa está a un nivel de bioseguridad (se indica nivel 2 o más alto). Los códigos entre paréntesis indican el número de acceso.

El árbol filogenético molecular obtenido se muestra en la figura 1.

Los números próximos a las ramas son los valores de remuestreo y una barra de escala se muestra en la parte inferior izquierda.

Debido a que la cepa AT-332 y la cepa AT-79 presentan la propiedad de que no efectuar la reducción de nitrato, como se mencionó anteriormente, sus características micológicas no eran exactamente iguales a las del *Bacillus amyloliquefaciens* descrito en Bergey's Manual. También, a partir del resultado del análisis del ADNr 16S, se considera que la cepa AT-332 y la cepa AT-79 están estrechamente relacionadas con *Bacillus amyloliquefaciens* pero no pueden identificarse como *Bacillus amyloliquefaciens*, y se determinó que la cepa AT-332 y la cepa AT-79 eran nuevas cepas pertenecientes al género *Bacillus*.

La cepa AT-332 y la cepa AT-79 de *Bacillus* sp. de la presente invención se dejan crecer por medios conocidos, tales como el cultivo estático en un medio sólido y el cultivo líquido, y el tipo de medio disponible, las condiciones del cultivo y similares no están particularmente limitadas siempre que permitan a las bacterias sobrevivir y crecer. Los ejemplos de medios incluyen un medio que contiene glucosa, peptona, extracto de levadura y similares, y también un medio general tal como un extracto de carne. También, además de un medio líquido, puede usarse un medio sólido tal como un medio de agar inclinado y un medio en placa distinto de un medio líquido.

Todas las fuentes de carbono que la cepa AT-332 y la cepa AT-79 pueden utilizar, pueden usarse para el medio. Los ejemplos específicos incluyen diversas fuentes de carbono sintéticas o naturales que la cepa AT-332 y la cepa AT-79 pueden utilizar, además de azúcares como glucosa, galactosa, lactosa, sacarosa, maltosa, extractos de malta, desechos de melaza, jarabe de almidón e hidrolizado de almidón.

De manera similar, diversas sustancias sintéticas y naturales que las cepas mencionadas anteriormente pueden utilizar, tal como una sustancia orgánica que contiene nitrógeno incluyendo peptona, extracto de carne, extracto de levadura, soja en polvo y licor de maceración del maíz, pueden usarse para la fuente de nitrógeno del medio.

De acuerdo con un método convencional para cultivar microorganismos, sales inorgánicas tales como sal dietética y sal fosfórica, sales de metales tales como calcio, magnesio y hierro y micronutrientes tales como vitaminas y amino ácidos, pueden añadirse como resulte necesario.

El cultivo puede efectuarse bajo condiciones aeróbicas tal como cultivo con agitación y cultivo con aireación. La temperatura del cultivo es de 20 a 40°C y preferentemente de 25 a 35°C, el pH es de 5 a 8 y preferentemente de 6 a 7, y el período de cultivo es de uno a cuatro días y preferentemente dos a tres días.

El cultivo que contiene el cuerpo bacteriano de la cepa AT-332 y la cepa AT-79 de *Bacillus* sp. de la presente invención, presenta la propiedad de controlar diversas enfermedades de las plantas, controlar nematodos y promover el crecimiento de plantas útiles.

Diversas enfermedades de las plantas pueden ser prevenidas y los nematodos pueden ser controlados permitiendo que el producto procesado del cultivo que contiene el cuerpo bacteriano de la cepa AT-332 y la cepa AT-79 de *Bacillus* sp. de la presente invención, una mezcla del cultivo con otros componentes y similares; el producto procesado de células bacterianas cultivadas separadas obtenidas sometiendo el producto del cultivo a un tratamiento de separación centrífuga o lavando las células bacterianas, la mezcla de células bacterianas cultivadas separadas con otros componentes, y similares; una dilución del mismo con un líquido o un sólido y similares, existan en el cuerpo de la planta tal como en raíces, tallos, hojas, semillas y frutos o en el suelo del huerto.

La cepa AT-332 y la cepa AT-79 de *Bacillus* sp. de la presente invención están disponibles como un agente de control de enfermedades de las plantas, un agente de control de nematodos y un promotor de enfermedades de las plantas en cualquier estado de células nutritivas, esporas o la mezcla de ambas, siempre que las bacterias estén vivas. También, las cepas pueden usarse si los componentes del medio de cultivo son mezclados tal como están después del cultivo, o si están en un estado en el que los componentes que no son células bacterianas han sido eliminados por lavado con agua destilada y similares.

La cepa AT-332 y la cepa AT-79 de *Bacillus* sp. de la presente invención pueden controlar las enfermedades de las



plantas causadas por hongos y bacterias pertenecientes a *Oomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* y *Deuteromycetes* dependiendo del tipo de aplicación, y pueden controlar nematodos fitoparásitos tales como *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus destructor*, *Pratylenchus* sp., *Meloidogyne* sp., *Heterodera* sp. y *Globodera* spp. Las cepas pueden promover el crecimiento de cultivos, verduras, frutas, flores y legumbres al mismo tiempo.

5 Específicamente, las bacterias causales que la cepa AT-332 y la cepa AT-79 de *Bacillus* sp. de la presente invención pueden controlar incluyen *Pyricularia oryzae*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Rhizoctonia solani* y *Gibberella fujikuroi* que infestan el arroz; *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*, *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia striiformis*, *Puccinia graminis*, *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *Puccinia hordei*, *Gibberella zeae*, *Pyrenophorateres*, *Typhula incarnata*, *Typhula ishikariensis*, *Sclerotiniaborealis*, *Micronectriella nivalis*, *Ustilago nuda*, *Tilletia caries*, *Tilletia toetida*, *Tapesia yallundea*, *Phynchosporium secalis* f.sp. *hordei*, *Septoria tritici* y *Lentosphaeria nodorum* que infestan el trigo; *Diaporthe citri*, *Elsinoe fawcettii*, *Phytophthora citrophthora*, *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* de las plantas cítricas; *Monilinia mali*, *Valsa ceratosperma*, *Podosphaera leucotricha*, *Alternaria alternata* patotipo de la manzana, *Venturia inaequalis*, *Gymnosporangium yamadai*, *Botriophthora berengeriana* f.sp. *piricola*, *Zygophiala jamaicensis*, *Gloeodes pomigena*, *Mycosphaerella pomi*, *Glomerella cingulata* y *Diplocarpon mali* de la manzana; *Venturia nashicola*, *Alternaria alternata* patotipo de la pera japonesa, *Physalospora piricola* y *Gymnosporangium asiaticum* de la pera; *Monilinia fructicola*, *Cladosporium carpophilum* y *Phomopsis* sp. del melocotón; *Pseudocercospora vitis*, *Marssonina viticola*, *Elsinoe ampelina*, *Glomerella cingulata*, *Uncinula necator*, *Phakopsora ampelopsidis* y *Phomopsis* sp. de la uva; *Phyllactinia kalicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cercospora kaki* y *Mycosphaerella nawae* del caqui; *Cladosporium carpophilum* de la ciruela; *Monilinia fructicola* de *Prunus avium*; *Sphaerotheca fuliginea*, *Didymella bryoniae*, *Colletotrichum legendarum* de la calabaza; *Alternaria solani*, *Cladosporium fulvum* del tomate; *Phomopsis vexans* y *Erysiphe cichoracearum* de la berenjena; *Alternaria japonica*, *Alternaria brassicae*, *Alternaria brassicicola* y *Cercospora brassicae* de las hortalizas de *brassica*; *Puccinia allii* de la cebolleta; *Pythium ultimum* y *Pythium ziziberis* del jengibre; *Sphaerotheca humuli* y *Glomerella cingulata* de fresas; *Cercospora kikuchii*, *Elsinoe glycines* y *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* de la soja; *Cercospora canescens* y *Uromyces phaseoli* var. *azukicola* de las judías azuki; *Colletotrichum lindemuthianum* de judía común de tipo *marrow*; *Cercosporidium personatum*, *Cercospora arachidicola* y *Shaceloma arachidis* del cacahuete; *Erysiphe pisi* del guisante; *Alternaria solani* de la patata; *Exobasidium reticulatum*, *Elsinoe leucospila*, *Pestalotiopsis theae* y *Pestalotiopsis longiseta* del té; *Alternaria longipes*, *Erysiphe cichoracearum* y *Colletotrichum gloeosporioides* del tabaco; *Cercospora beticola* de la remolacha; *Curvularia geniculata* y *Ceratobasidium* spp. del césped; *Diplocarpon rosae* y *Sphaerotheca pannosa* de la rosa; *Septoria obesa* y *Puccinia horiana* del crisantemo; y *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* de diversas plantas de cultivo.

35 El agente de control de enfermedades de las plantas de la presente invención incluye un agente de control de enfermedades poscosecha para los cultivos almacenados después de la cosecha, particularmente con el fin de prevenir la descomposición de las frutas y similares. No existe ningún límite a los tipos de cultivos a los cuales puede aplicarse el agente de control de enfermedades poscosecha de la presente invención, y los ejemplos incluyen frutas tales como fresa, uva, higo, cítricos, melocotón, melón, sandía, manzana, pera, plátano y piña, y hortalizas tales como pepino, tomate, col china, col, cebolleta, cebolla, zanahoria, rábano japonés, jengibre, pimienta verde, berenjena, calabaza y brotes de soja. No existe ningún límite a los tipos de hongos que provocan las enfermedades poscosecha, y los ejemplos incluyen *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Alternaria alternata*.

45 Los ejemplos de nematodos que la cepa AT-332 y la cepa AT-79 de *Bacillus* sp. de la presente invención pueden controlar incluyen *Meloidogyne* sp. tal como *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica* y especies de *Meloidogyne*; *Globodera* spp. tal como *Globodera rostochiensis* y otras especies de *Globodera*; *Heterodera* sp. tal como *Heterodera avenae*, *Heterodera glycines*, *Heterodera schachtii*, *Heterodera trifolii* y otras especies de *Heterodera*; especies de *Anguina* pertenecientes a *Anguina funesta*; especies de *Aphelenchoides*; *Belonolaimus longicaudatus* y otras especies pertenecientes a *Belonolaimus*; *Bursaphelenchus xylophilus* perteneciente a *Bursaphelenchus xylophilus* y otras especies de *Bursaphelenchus*; especies de *Criconema*, especies de *Criconemella*, especies de *Criconemoides* y especies de *Mesocriconema* pertenecientes a *Criconemoides*; *Ditylenchus destructor*, *Ditylenchus dipsaci* y otras especies pertenecientes a *Ditylenchus*; especies de *Dolichodorus* pertenecientes a nematodos punzón; *Helicotylenchus multicinctus* perteneciente a *Helicotylenchus* y otras especies de *Helicotylenchus*; especies de *Hemicycliophora* y especies de *Hemicriconemoides* pertenecientes a nematodos de vaina y vainoides; especies de *Hirshmanniella*; especies de *Hoplolaimus* pertenecientes a *Hoplolaimus*; especies de *Nacobbus* pertenecientes a *Nacobbus*; *Longidorus elongatus* perteneciente a *Longidorus* y otras especies de *Longidorus*; *Pratylenchus neglectus*, *Pratylenchus penetrans*, *Pratylenchus curvatus*, *Pratylenchus goodeyi* y otras especies de *Pratylenchus* pertenecientes a *Pratylenchus* sp.; *Radopholus similis* y otras especies pertenecientes a *Radopholus*; *Rotylenchus robustus* y otras especies de *Rotylenchus* pertenecientes a *Rotylenchulus reniformis*; especies de *Scutellonema*; *Trichodorus primitivus* y otras especies de *Trichodorus* pertenecientes a nematodos deformadores de las raíces; especies de *Paratrichodorus*; *Tylenchorhynchus claytoni*, *Tylenchorhynchus dubius* y otras especies pertenecientes a *Tylenchorhynchus*; especies de *Tylenchulus* perteneciente a *Tylenchulus semipenetrans*; y especies de *Xiphinema* pertenecientes a *Xiphinema americanum*.

65 La cepa AT-332 y la cepa AT-79 de *Bacillus* sp. de la presente invención son especialmente útiles para controlar especies de *Meloidogyne*, especies de *Globodera*, especies de *Heterodera*, especies de *Pratylenchus*, especies de *Radopholus*, especies de *Rotylenchus* y especies de *Tylenchulus*, y en particular, pueden usarse convenientemente

para exterminar especies de *Meloidogyne*, especies de *Pratylenchus*, especies de *Globodera* y especies de *Heterodera*.

Los ejemplos de cultivos en los cuales la cepa AT-332 y la cepa AT-79 de *Bacillus* sp. de la presente invención pueden promover el crecimiento incluyen cultivos de cereales tales como arroz, trigo y maíz; verduras tales como zanahoria, pepino, rábano japonés, calabaza, lechuga, berenjena, tomate, col, patata, col china, crisantemo coronario, espinaca mostaza japonesa, pimienta verde, cebolleta, cebolla, jengibre, ajo, fresa; champiñones tal como el champiñón shiitake; árboles frutales tales como caqui, peral, naranjo, vid, manzano y melocotonero; flores y plantas ornamentales tales como crisantemo, tulipán y rosa; y legumbres tales como soja, sésamo y cacahuete.

El agente de control de enfermedades de las plantas, agente de control de nematodos y promotor del crecimiento de las plantas de la presente invención contiene la cepa AT-332 y la cepa AT-79 de *Bacillus* sp. que pueden controlar las enfermedades de las plantas y los nematodos y presentan el efecto de promover el crecimiento de las plantas, como se mencionó anteriormente como un microorganismo indicado.

En el agente de control de enfermedades de las plantas, agente de control de nematodos y promotor del crecimiento de las plantas de la presente invención, la cepa AT-332 o la cepa AT-79 pueden usarse individualmente o en combinación. También puede usarse el mutante de cada una de las cepas. El mutante es el que presenta la propiedad bacteriológica mencionada anteriormente de la cepa AT-332 y la cepa AT-79, y presenta una actividad de control de las enfermedades de las plantas, de control de los nematodos y de promoción del crecimiento de las plantas. Pueden utilizarse una cepa mutante natural, una cepa mutante causada por rayos ultravioleta o un agente de mutagénesis química, una cepa de fusión celular y una cepa genéticamente modificada o similares.

Cuando las bacterias vivas de la cepa AT-332 y la cepa AT-79 se utilizan en el agente de control de enfermedades de las plantas, agente de control de nematodos y promotor del crecimiento de las plantas de la presente invención, resulta preferido añadir las bacterias al cuerpo de la planta a una concentración de  $10^5$  a  $10^{10}$  unidades/ml.

Cuando se usa el producto del cultivo de la cepa AT-332 y/o la cepa AT-79, la dosificación puede determinarse apropiadamente en casos individuales de las bacterias viables mencionadas anteriormente.

Como el agente microbiológico (agente de control de enfermedades de las plantas, agente de control de nematodos y promotor del crecimiento de las plantas) de la presente invención, las células bacterianas y/o el producto del cultivo de la cepa AT-332 y la cepa AT-79 pueden utilizarse individualmente. O bien, el agente microbiológico puede ser diluido con un líquido inerte o un vehículo sólido para ser usado como un agente farmacológico con la adición del tensioactivo, agente dispersante y otro adyuvante como sea necesario. Los ejemplos de formulaciones específicas incluyen formulación granulada, formulación en polvo, polvo humectable, formulación de agente de suspensión y emulsión.

Los ejemplos del vehículo incluyen talco, bentonita, caolín, arcilla, tierra de diatomeas, carbono blanco, vermiculita, hidrato de cal, sulfato de amonio, arena de sílice, urea, un vehículo sólido poroso y vehículos líquidos tales como agua, alcohol isopropílico, metilnaftaleno, xileno, ciclohexanona y alquilenglicol. Los ejemplos del tensioactivo y agente dispersante incluyen sales del ácido dinaftilmecanosulfónico, sales de ésteres de ácido sulfúrico de alcohol, sales del ácido ligninasulfónico, sales de ácidos alquilarilsulfónicos, éteres de polioxietilenglicol, monoalquilato de polioxietileno sorbitán y alquilariléteres de polioxietileno. Los ejemplos del adyuvante incluyen carboximetilcelulosa, polietilenglicol, propilenglicol, goma arábica y goma xantán; y los ejemplos del agente crioprotector incluyen leche descremada y agente de amortiguación del pH. La cantidad de las bacterias vivas y/o el producto del cultivo de la cepa AT-332 y la cepa AT-79, el tiempo de la aplicación y la cantidad de la aplicación pueden determinarse apropiadamente dependiendo en cada caso de las bacterias viables mencionadas anteriormente.

El agente microbiológico (agente de control de enfermedades de las plantas, agente de control de nematodos y promotor del crecimiento de las plantas) de la presente invención puede contener principios activos además de los de la presente invención: o sea, insecticidas, otros agentes bactericidas, herbicidas, reguladores del crecimiento de las plantas y fertilizantes. También, el agente de control de enfermedades de las plantas y agente de control de nematodos de la presente invención puede contener la cepa de otras especies en combinación con la cepa AT-332 y/o la cepa AT-79.

Los ejemplos de los componentes bactericidas incluyen bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, difenoconazol, diniconazol, enilconazol, epoxiconazol, fluquinconazol, fenbuconazol, flusilazol, flutriafol, hexaconazol, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanil, penconazol, propiconazol, protioconazol, simeconazol, triadimefón, triadimenol, tebuconazol, tetraconazol, triticonazol, procloraz, pefurazoato, imazalil, triflumizol, ciazofamida, benomilo, carbendazim, tiabendazol, fuberidazol, etaboxam, etridiazol, ácido oxipoconazol fumárico, himexazol, azoxistrobina, dimoxistrobina, enestroburina, fluoxastrobina, kresoxim-metilo, metominostrobin, orizastrobina, picoxistrobina, piraclostrobina, trifloxistrobina, carboxina, benalaxilo, boscalid, bixafén, fenhexamida, flutolanil, furametpir, mepronilo, metalaxilo, mephenoxam, ofurace, oxadixil, oxicarboxina, pentiopirad, tifuluzamida, tianidilo, dimetomorf, flumorf, flumetover, fluopicolide, carpropamida, diclocimet, mandipropamida, fluazinam, pirifenox, bupirimato, ciprodinil, fenarimol, ferimzona, mepanipirim, nuarimol, pirimetanil, triforina, fempiclonilo,

5 fludioxonil, aldimorf, dodemorf, fenpropimorf, tridemorf, fenpropidina, iprodiona, procimidona, vinclozolina, famoxadona, fenamidona, octilinona, probenazol, anilazina, diclomezina, piroquilón, proquinazid, triciclazol, captafol, captán, dazomet, folpet, fenoxanilo, quinoxifeno, amisulbrom, manzeb, maneb, metam, metiram, ferbam, propineb, tiuram, zineb, ziram, dietofencarb, iprovalicarb, bentiavalicarb-isopropilo, propamocarb clorhidrato, tiofanato metilo, 10 piriencarb, mezcla de Bordeaux, cloruro de cobre básico, sulfuro de cobre básico, hidróxido cúprico, 8-hidroxiquinolina de cobre, dodina, albesilato de iminocadina, acetato de iminocadina, guazatina, kasugamicina, estreptomycin, polioxina, oxitetraciclina, validamicina A, binapacril, dinocap, dinobutón, dition, isoprotilano, edifenfos, iprobenfos, fosetil, fosetil aluminio, pirasofos, tolclofos-metilo, clorotalonilo, diclofluanida, flusulfamida, hexaclorobenceno, ftalida, pencicurón, quintoceno, ciflufenamid, cimoxanilo, dimetirimol, etirimol, furalaxilo, metrafenona, espiroxamina, amobam, azufre, polisulfuro de calcio, eclomezol, bicarbonato de potasio, bicarbonato de calcio, tiadiazina, teclotalam, triazina, nonilfenol sulfonato de cobre, hidroxí isoxazol, fluoroimida, policarbamato, metasulfocarb, EDDP, IBP, tolfenpirad, fluopiram, isotianilo e isopirazam.

15 Los ejemplos de los componentes insecticidas incluyen acetamiprid, pimetozina, fenitrotión, acefato, carbaril, metomil, cartap, cihalotrina, etofenprox, teflubenzurón flubendiamida, flufenoxurón, tebufenozida, fenpiroximato, piridabén, imidacloprid, buprofezina, BPMC, MIPC, malatión, metidatión, fentiión, diazinón, oxideprofos, vamidotión, etiofencarb, pirimicarb, permetrina, cipermetrina, bifentrina, halfenprox, silafluofeno, nitenpiram, clorfluazurón, metoxifenozida, tebufenpirad, pirimidifeno, keltano, propargita, hexitiazox, clofentezina, espinosad, milbemectina, BT (*Bacillus thuringiensis*), indoxacarb, metaflumizona, clorfenapir, fipronil, etoxazol, acequinocilo, pirimifos-metilo, 20 acrinatrina, quinometionato, clorpirifos, abamectina, benzoato de emamectina, óxido de fenbutatina, terbufos, etoprofos, cadusafos, fenamifos, fensulfotiión, DSP, diclofentiión, fostiazato, oxamil, isoamidofos, fostietano, isazofos, tionazina, benfuracarb, espirodiclofeno, etiofencarb, azinfos-metilo, disulfotión, metiocarb, oxidemetión-metilo, paratiión, ciflutrina, beta-ciflutrina, tebupirimfos, espiromesifeno, endosulfán, amitraz, tralometrina, acetoprol, etiprol, etiión, triclorfón, metamidofos, diclorvos, mevinfos, monocrotofos, dimetoato, formetanato, formotiión, mecarb, 25 tiometión, disulfotión, naled, metil paratiión, cianofos, diamidafos, albendazol, oxibendazol, fenbendazol, oxfendazol, propafos, sulprofos, protiofos, profenofos, isofenfos, temefos, fentoato, dimetilvinfos, clorfenvinfos, tetraclorvinfos, foxim, isoxatiión, piraclafos, clorpirifos, piridafentiión, fosadona, fosmet, dioxabenzofos, quinalfos, piretrina, aletrina, praletrina, resmetrina, permetrina, teflutrina, fenpropatrina, alfa-cipermetrina, lambda-cihalotrina, delta-metrina, fenvalerato, esfenvalerato, flucitrinato, flualinato, cicloprotrina, tiodicarb, aldicarb, alanicarb, metolcarb, xillicarb, 30 propoxur, fenoxicarb, fenotiocarb, bifenazato, carbofurán, carbosulfán, azufre, pirifluquinazona, furatiocarb, diafentiurón, diflubenzurón, hexaflumurón, novalurón, lufenurón, clorfluazurón, hidróxido de triciclohexilestaño, oleato de sodio, oleato de potasio, metopreno, hidropreno, binapacril, amitraz, clorobenzilato, fenisobromolato, tetradifón, bensultap, benzomato, cromafenozida, halofenozida, endosulfán, diofenolán, tolfenpirad, triazamato, sulfato de nicotina, tiacloprid, tiametoxam, clotianidina, dinotefurán, fluazinam, piriproxifeno, fluacripirim, hidrametilnona, 35 ciromazina, TPIC, tiociclam, fenazaquina, complejo de polinactina, azadiractina, rotenona, hidroxipropil almidón, mesulfenfos, fosfocarb, isoamidofos, aldoxicarb, metam sodio, tartrato de morantel, dazomet, levamisol clorhidrato, triclamida, tolfenpirad, piridailil, clorantraniliprol, cienopirafeno y ciflumetofeno.

40 El agente de control de enfermedades de las plantas, agente de control de nematodos y promotor del crecimiento de las plantas de la presente invención puede ser aplicado directamente tal como está, o aplicado como una solución diluida con agua y similares. El método de aplicación del agente de control de enfermedades de las plantas, agente de control de nematodos y promotor del crecimiento de las plantas de la presente invención no está particularmente limitado, y los ejemplos del mismo incluyen un método de rociar el agente directamente sobre las plantas y plagas de insectos, un método de rociar el agente sobre el suelo, un método de añadir el agente al agua y fertilizante que se aplicará sobre las plantas y el suelo, y un método de recubrir las semillas con el agente. Además, es deseable 45 ajustar apropiadamente la cantidad de la aplicación del producto farmacológico, ya que la cantidad de la aplicación varía dependiendo de la enfermedad y la plaga de insectos que serán controladas, los cultivos objeto de la aplicación, el método de aplicación, la tendencia a la ocurrencia de enfermedades, el grado del daño, las condiciones ambientales y las formulaciones que serán utilizadas.

50 Como se expone anteriormente, la cepa AT-332 y la cepa AT-79 de la presente invención presentan un amplio espectro nematicida y de enfermedades, y pueden controlar diversos tipos de enfermedades de las plantas y nematodos, y pueden promover el crecimiento de las plantas. Debido a que el agente de control de enfermedades de las plantas, agente de control de nematodos y promotor del crecimiento de las plantas de la presente invención 55 que comprende estas cepas es altamente seguro para el medio ambiente y presenta unos efectos de control sobre diversos tipos de enfermedades y nematodos, el agente de control de enfermedades de las plantas puede prevenir una amplia gama de enfermedades y nematodos sin utilizar otros medios en combinación, y puede utilizarse como un pesticida biológico y/o fertilizante biológico que también puede promover el crecimiento de plantas útiles.

## 60 Ejemplos

La presente invención se describe con mayor detalle mediante los ejemplos de producción, los ejemplos de formulación, los ejemplos y los ejemplos comparativos.

Cultivo de la cepa AT-332 y la cepa AT-79

La cepa AT-332 y la cepa AT-79 fueron aisladas a partir del suelo que contiene raíces de plantas.

- 5 En detalle, 1 g de un suelo seco obtenido recolectando el suelo en la ciudad de Moriya en la prefectura de Ibaraki, Japón, en agosto de 2009 y sometiéndolo a un tratamiento térmico (80°C por 10 minutos), fue suspendido en agua esterilizada. La suspensión fue diluida con una tasa de dilución de  $10^2$  a  $10^4$  veces y el cultivo separado de la suspensión se efectuó en un medio de caldo nutritivo (Eiken Chemical Co., Ltd.) (28°C por tres días), y las colonias formadas fueron aisladas. Las colonias aisladas fueron cultivadas en un medio de agar de patata y dextrosa y se encontraron las cepas eficaces contra patógenos de diversas enfermedades de las plantas. Las cepas fueron sometidas después a un cultivo con agitación en un medio líquido de papa y dextrosa, y la cepa AT-332 y la cepa AT-79 de *Bacillus* sp. fueron aisladas como cepas que tenían una actividad contra la larva de segunda etapa de *Meloidogyne* sp. del boniato.
- 10
- 15 El método para la identificación de cada una de las cepas, los diversos métodos de análisis y sus resultados, y las propiedades bacteriológicas son las que se describen en "Modo para poner en práctica la invención".

**Ejemplo de producción 1: Cultivo y preparación de la cepa AT-332**

- 20 Como un precultivo, un asa de las bacterias conservadas de la presente invención (cepa AT-332) fue inoculada en 60 ml por matraz de un medio de caldo nutritivo (disponible de Eiken Chemical Co., Ltd.) en un matraz cónico de 500 ml con deflectores, y se sometió a un cultivo con agitación usando una agitadora rotatoria a 180 rpm y 28°C durante un día.
- 25 Fueron inoculados 60 ml del cultivo obtenido mediante el precultivo mencionado anteriormente en un fermentador de jarro con un volumen de 5000 ml que contenía 2000 ml de medio LB (20 g de peptona, 10 g de extracto de levadura, 20 g de cloruro de sodio y agua para el resto), y se cultivó como el cultivo principal a 500 rpm, velocidad de aireación de 1 litro/hora y 35°C durante tres días.
- 30 Aproximadamente 1800 g de cultivo fueron obtenidos mediante el cultivo principal mencionado anteriormente. La concentración de las células bacterianas era de aproximadamente  $8,0 \times 10^9$  CFU/ml.

Aproximadamente 140 g de polvo seco fueron obtenidos congelando 1800 g del producto del cultivo obtenido a -80°C, seguido por secado por congelación bajo presión reducida y pulverización. La concentración de células bacterianas del polvo era de aproximadamente  $1,0 \times 10^{11}$  CFU/g.

35

**Ejemplo de producción 2: Cultivo y preparación de la cepa AT-79**

- 40 Como un precultivo, un asa de las bacterias conservadas de la presente invención (cepa AT-79) fue inoculada en 60 ml por matraz de un medio de caldo nutritivo (disponible de Eiken Chemical Co., Ltd.) en un matraz cónico de 500 ml con deflectores, y se sometió a un cultivo con agitación usando a una agitadora rotatoria a 180 rpm y 28°C durante un día.
- 45 Fueron inoculados 60 ml del cultivo obtenido mediante el precultivo mencionado anteriormente en un fermentador de jarro con un volumen de 5000 ml que contenía 2000 ml de medio LB (20 g de triptona, 10 g de extracto de levadura, 20 g de cloruro de sodio y agua para el resto), y se cultivó como el cultivo principal a 500 rpm, velocidad de aireación de 1 litro/hora y 35°C durante tres días.
- 50 Aproximadamente 1700 g de cultivo fueron obtenidos mediante el cultivo principal mencionado anteriormente. La concentración de células bacterianas del polvo era de aproximadamente  $9,0 \times 10^9$  CFU/g.

Aproximadamente 130 g de polvo seco fueron obtenidos congelando 1700 g del producto del cultivo obtenido a -80°C, seguido por secado por congelación bajo presión reducida y pulverización. La concentración de células bacterianas del polvo era de aproximadamente  $1,0 \times 10^{11}$  CFU/g.

55

A continuación se proporcionan unos ejemplos de formulación. En la presente memoria, la palabra "parte(s)" significa parte(s) en masa.

**Ejemplo de formulación 1: Polvo humectable**

- 60 Se mezclaron y pulverizaron 60 partes del polvo seco obtenido mediante el ejemplo de producción 1, 25 partes de tierra de diatomeas, 5 partes de carbono blanco, 8 partes de lignina sulfonato y 2 partes de alquilnaftaleno sulfonato para así obtener un polvo humectable.

**Ejemplo de formulación 2: Formulación granulada**

Se mezclaron y pulverizaron 5 partes del polvo seco obtenido mediante el ejemplo de producción 1, 25 partes de bentonita, 66 partes de talco, 2 partes de dodecibenceno sulfonato y 2 partes de lignina sulfonato. Después de añadirle aproximadamente 20 partes de agua y amasar la mezcla mediante una máquina amasadora, el resultante fue granulado mediante una granuladora y secado, y a continuación el tamaño de los granúlos fue regulado para obtener una formulación granulada.

**Ejemplo de formulación 3: Polvo humectable**

Se mezclaron y pulverizaron 60 partes del polvo seco obtenido mediante el ejemplo de producción 2, 25 partes de tierra de diatomeas, 5 partes de carbono blanco, 8 partes de lignina sulfonato y 2 partes de alquilnaftaleno sulfonato para así obtener un polvo humectable.

**Ejemplo de formulación 4: Formulación granulada**

Se mezclaron y pulverizaron 5 partes del polvo seco obtenido mediante el ejemplo de producción 2, 25 partes de bentonita, 66 partes de talco, 2 partes de dodecibenceno sulfonato y 2 partes de lignina sulfonato. Después de añadirle aproximadamente 20 partes de agua y amasar la mezcla mediante una máquina amasadora, el resultante fue granulado mediante una granuladora y secado, y a continuación el tamaño de los granúlos fue regulado para obtener una formulación granulada.

A continuación se describen los ejemplos y ejemplos comparativos para probar los efectos del agente de control de enfermedades de las plantas, agente de control de nematodos y promotor del crecimiento de las plantas de la presente invención.

**Ejemplo 1 y ejemplo comparativo 1: Prueba para los efectos contra el añublo del arroz**

Fueron pulverizadas unas dosis suficientes de los polvos humectables de los ejemplos de formulación 1 y 3 diluidos con una tasa de dilución de 250 veces, con una pistola pulverizadora sobre el arroz (variedad: Koshihikari, 15 plantas por cerro) cultivado en un invernadero hasta la etapa del despliegue de la tercera hoja, en una maceta de plástico de 6 cm de diámetro. Como un ejemplo comparativo, el polvo humectable Impression (producido por SDS Biotech K.K.) con una tasa de dilución de 250 veces también fue sometido a la prueba de la misma manera. Al día siguiente, una suspensión de esporas del patógeno del añublo del arroz (*Pyricularia oryzae*) fue pulverizada e inoculada. Después de mantener las macetas en una habitación húmeda a 22°C durante 24 horas, las macetas se dejaron reposar en el invernadero durante siete días y se investigó el número de lesiones en las hojas inoculadas, para así determinar el valor de control. El valor de control (%) se calculó basándose en el número de lesiones de las hojas en la región no tratada. Como puede apreciarse a partir de los resultados representados en la tabla 1, mediante el tratamiento con el agente microbiológico de la presente invención, la incidencia del añublo del arroz se redujo mucho en comparación con la región no tratada, y se obtuvieron unos efectos de control significativamente altos.

Tabla 1

	Número de lesiones	Valor de control (%)
Región tratada (Ejemplo de formulación 1)	28	86,0
Región tratada (Ejemplo de formulación 3)	20	90,0
Región comparativa (polvo humectable Impression)	85	57,5
Región sin tratamiento	200	0,0

**Ejemplo 2 y ejemplo comparativo 2: Prueba para los efectos sobre la antracnosis del pepino**

Fueron pulverizadas unas dosis suficientes de los polvos humectables de los ejemplos de formulación 1 y 3 con una tasa de dilución de 250 veces, con una pistola pulverizadora sobre las primera y segunda hojas de los pepinos (variedad: Tokiwa Hikari nº 3 de tipo p) cultivados en un invernadero hasta la etapa del despliegue de la tercera hoja, en una maceta de plástico de 6 cm de diámetro. Como un ejemplo comparativo, una dilución del polvo humectable Impression (producido por SDS Biotech K.K.) con una tasa de dilución de 250 veces, también fue sometida a la prueba de la misma manera. Al día siguiente, una suspensión de esporas de *Colletorichum lagenarium* del pepino fue pulverizada e inoculada. Después de mantener las macetas en una habitación húmeda a 22°C durante 24 horas, las macetas se dejaron reposar en el invernadero durante siete días y se investigó visualmente la tasa de área con enfermedad en las primera y segunda hojas, para así determinar el valor de control. El valor de control (%) se calculó basándose en la tasa de área con enfermedad en la región sin tratamiento. Como puede apreciarse a partir de los resultados en la tabla 2, mediante el tratamiento con el agente microbiológico de la presente invención, la incidencia del *Colletorichum lagenarium* del pepino se redujo mucho en comparación con la región no tratada, y se

obtuvieron unos efectos de control significativamente altos.

Tabla 2

	Tasa de área con enfermedad	Valor de control (%)
Región tratada (Ejemplo de formulación 1)	7	82,5
Región tratada (Ejemplo de formulación 3)	8	80,0
Región comparativa (polvo humectable Impression)	25	37,5
Región sin tratamiento	40	0,0

5

### Ejemplo 3 y ejemplo comparativo 3: Prueba para los efectos sobre *Phytophthora infestans* del tomate

Se pulverizaron unas dosis suficientes de los polvos humectables de los ejemplos de formulación 1 y 3 con una tasa de dilución de 250 veces, con una pistola pulverizadora sobre los tomates (variedad: Sugar lump) cultivados en un invernadero hasta la etapa del despliegue de la quinta hoja, en una maceta de plástico de 6 cm de diámetro. Como un ejemplo comparativo, una dilución del polvo humectable Impression (producido por SDS Biotech K.K.) con una tasa de dilución de 250 veces, también fue sometida a la prueba de la misma manera. Al día siguiente, una suspensión de zoosporas de *Phytophthora infestans* del tomate fue pulverizada e inoculada. Después de mantener las macetas en una habitación húmeda a 22°C durante 16 horas, las macetas se dejaron reposar en el invernadero durante tres días y se examinó visualmente la tasa de área con enfermedad en las tercera, cuarta y quinta hojas, para así determinar el valor de control. El valor de control (%) se calculó basándose en la tasa de área con enfermedad en la región sin tratamiento. Como puede apreciarse a partir de los resultados en la Tabla 3, mediante el tratamiento con el agente microbiológico de la presente invención, la incidencia del *Phytophthora infestans* del tomate se redujo mucho en comparación con la región no tratada, y se obtuvieron unos efectos de control significativamente altos.

20

Tabla 3

	Tasa de área con enfermedad	Valor de control (%)
Región tratada (Ejemplo de formulación 1)	7	84,4
Región tratada (Ejemplo de formulación 3)	6	86,7
Región comparativa (polvo humectable Impression)	40	11,1
Región sin tratamiento	45	0,0

### Ejemplo 4 y ejemplo comparativo 4: Prueba para los efectos sobre *Pseudoperonospora cubensis* del pepino

Se pulverizaron unas dosis suficientes de los polvos humectables de los ejemplos de formulación 1 y 3 con una tasa de dilución de 250 veces, con una pistola pulverizadora sobre los pepinos (variedad: Hikari nº 3 de tipo p) cultivados en un invernadero hasta la etapa del despliegue de la tercera hoja, en una maceta de plástico de 6 cm de diámetro. Como un ejemplo comparativo, una dilución del polvo humectable Impression (producido por SDS Biotech K.K.) con una tasa de dilución de 250 veces, también fue sometida a la prueba de la misma manera. Al día siguiente, una suspensión de zoosporas de *Pseudoperonospora cubensis* del pepino fue pulverizada e inoculada. Después de mantener las macetas en una habitación húmeda a 22°C durante 18 horas, las macetas se dejaron reposar en el invernadero durante tres días y se examinó visualmente la tasa de área con enfermedad en las primera y segunda hojas, para así determinar el valor de control. El valor de control (%) se calculó basándose en la tasa de área con enfermedad en la región sin tratamiento. Como puede apreciarse a partir de los resultados en la tabla 4, mediante el tratamiento con el agente microbiológico de la presente invención, la incidencia del *Pseudoperonospora cubensis* del pepino se redujo mucho en comparación con la región no tratada, y se obtuvieron unos efectos de control significativamente altos.

40

Tabla 4

	Tasa de área con enfermedad	Valor de control (%)
Región tratada (Ejemplo de formulación 1)	4	88,6
Región tratada (Ejemplo de formulación 3)	3	91,4
Región comparativa (polvo humectable Impression)	25	28,6
Región sin tratamiento	35	0,0

### Ejemplo 5 y ejemplo comparativo 5: Prueba para los efectos sobre *Alternaria Alternaria mali* del manzano

45

Se recolectaron unas hojas de manzana (variedad: Orin) y se pulverizaron unas dosis suficientes de los polvos humectables de los ejemplos de formulación 1 y 3, con una tasa de dilución de 250 veces, con una pistola

pulverizadora sobre el reverso de las hojas. Como un ejemplo comparativo, una dilución del polvo humectable Impression (producido por SDS Biotech K.K.) con una tasa de dilución de 250 veces, también fue sometida a la prueba de la misma manera. Después de la pulverización, las hojas fueron secadas al aire y la suspensión de esporas de *Alternaria Alternaria mali* del manzano fue pulverizada e inoculada en las mismas. Después de dejar reposar las hojas a 20°C en condiciones de humedad durante cuatro días, la tasa de área con enfermedad fue examinada visualmente para así determinar el valor de control. El valor de control (%) se calculó sobre la base de la tasa de área con enfermedad en la región sin tratamiento. Como puede apreciarse a partir de los resultados en la tabla 5, mediante el tratamiento con el agente microbiológico de la presente invención, la incidencia de *Alternaria Alternaria mali* del manzano se redujo mucho en comparación con la región no tratada, y se obtuvieron unos efectos de control significativamente altos.

Tabla 5

	Tasa de área con enfermedad	Valor de control (%)
Región tratada (Ejemplo de formulación 1)	5	91,7
Región tratada (Ejemplo de formulación 3)	7	88,3
Región comparativa (polvo humectable Impression)	30	50,0
Región sin tratamiento	60	0,0

#### 15 **Ejemplo 6 y ejemplo comparativo 6: Prueba para los efectos sobre *Sphaerotheca fuliginea* del pepino (prueba de campo)**

La prueba se efectuó en el invernadero de propiedad de la empresa usando pepinos (región de prueba: 4 m<sup>2</sup>/región; 10 plantas/ región; en triplicado). Se dejó que la enfermedad apareciera naturalmente. Los polvos humectables de los ejemplos de formulación 1 y 3, con tasas de dilución de 500 veces, 1000 veces y 2000 veces, fueron pulverizados cuatro veces a intervalos de siete días, y el valor de control (%) se calculó a partir de la tasa de área con enfermedad en las hojas. El polvo humectable Impression (SDS Biotech K.K.) con tasas de dilución de 500 veces y 1000 veces, el polvo humectable Botokiller (Idemitsu Kosan Co., Ltd.) con una tasa de dilución de 1000 veces, el polvo humectable Botopika (Idemitsu Kosan Co., Ltd.) con una tasa de dilución de 2000 veces, el polvo humectable en gránulos Ecoshot (Kumiai Chemical Industry Co., Ltd.) con una tasa de dilución de 1000 veces y el polvo humectable Morestan (Agro-Kanesho Co., Ltd.) con una tasa de dilución de 3000 veces, fueron usados como agentes comparativos. La incidencia de la enfermedad en la región no tratada fue de 47,4%. El valor de control (%) se calculó sobre la base de la incidencia en la región sin tratamiento. Como puede apreciarse a partir de los resultados en la Tabla 6, mediante el tratamiento con el agente microbiológico de la presente invención, la incidencia de *Sphaerotheca fuliginea* del pepino se redujo mucho en comparación con la región no tratada, y se obtuvieron unos efectos de control significativamente altos. Un efecto notablemente mayor fue confirmado también en el campo, en comparación con los agentes de *Bacillus subtilis* comercializados convencionales (polvo humectable Impression (documento de patente 3), polvo humectable Botokiller, polvo humectable Botopika, polvo humectable Ecoshot (documento de patente 4)) usados como agentes comparativos. El agente microbiológico de la presente invención con la tasa de dilución de 500 veces mostró un efecto muy potente, equivalente al polvo humectable Morestan que es un agente químico.

Tabla 6

	Incidencia	Valor de control
Región tratada (Ejemplo de formulación 1), tasa de dilución: 500 veces	2,1	95,6
Región tratada (Ejemplo de formulación 1), tasa de dilución: 1000 veces	6,2	86,9
Región tratada (Ejemplo de formulación 1), tasa de dilución: 2000 veces	10,3	78,3
Región tratada (Ejemplo de formulación 3), tasa de dilución: 500 veces	4,2	91,1
Región tratada (Ejemplo de formulación 3), tasa de dilución: 1000 veces	5,7	88,0
Región tratada (Ejemplo de formulación 3), tasa de dilución: 2000 veces	10	78,9
Región comparativa (polvo humectable Impression), tasa de dilución: 500 veces	17,9	62,2
Región comparativa (polvo humectable Botokiller), tasa de dilución: 1000 veces	35,3	25,5
Región comparativa (polvo humectable Botopika), tasa de dilución: 2000 veces	34,4	27,4
Región comparativa (polvo humectable granulado Ecoshot), tasa de dilución: 1000 veces	37,5	20,9
Región comparativa (polvo humectable Morestan), tasa de dilución: 3000 veces	1,1	97,7
Región sin tratamiento	47,4	0,0

#### 40 **Ejemplo 7 y ejemplo comparativo 7: Prueba para los efectos sobre *Botrytis cinerea* de la berenjena (prueba de campo)**

La prueba se efectuó en el invernadero de propiedad de la empresa usando berenjenas (región de prueba: 5,6 m<sup>2</sup>/región; 7 plantas/región; en triplicado). Se dejó que la enfermedad apareciera naturalmente. Los polvos

humectables de los ejemplos de formulación 1 y 3 con tasas de dilución de 500 veces y 1000 veces fueron pulverizados cuatro veces a intervalos de siete días, y el valor de control (%) se calculó a partir de la incidencia en los frutos. El polvo humectable Impression (SDS Biotech K.K.) con tasas de dilución de 500 veces y 1000 veces, el polvo humectable Botokiller (Idemitsu Kosan Co., Ltd.) con una tasa de dilución de 1000 veces, el polvo humectable Botopika (Idemitsu Kosan Co., Ltd.) con una tasa de dilución de 2000 veces, el polvo humectable en gránulos Ecoshot (Kumiai Chemical Industry Co., Ltd.) con una tasa de dilución de 1000 veces y Savior Flowable 20 (Syngenta Japan K.K.) con una tasa de dilución de 1500 veces, fueron utilizados como agentes comparativos. La incidencia de la enfermedad en la región no tratada fue de 15%. El valor de control (%) se calculó sobre la base de la incidencia en la región sin tratamiento. Como puede apreciarse a partir de los resultados en la tabla 7, mediante el tratamiento con el agente microbiológico de la presente invención, la incidencia de *Botrytis cinerea* se redujo mucho en comparación con la región no tratada, y se obtuvieron unos efectos de control significativamente altos. Un efecto notablemente mayor fue confirmado también en el campo, en comparación con agentes de *Bacillus subtilis* disponibles en el comercio convencionales (polvo humectable Impression, polvo humectable Botokiller, polvo humectable Botopika, polvo humectable Ecoshot), utilizados como agentes comparativos. El agente microbiológico de la presente invención con la tasa de dilución de 500 veces mostró un efecto muy potente, equivalente a Savior Flowable 20 que es un agente químico.

Tabla 7

	Incidencia	Valor de control
Región tratada (Ejemplo de formulación 1), tasa de dilución: 500 veces	2,4	84,0
Región tratada (Ejemplo de formulación 1), tasa de dilución: 1000 veces	4,1	72,7
Región tratada (Ejemplo de formulación 3), tasa de dilución: 500 veces	2,9	80,7
Región tratada (Ejemplo de formulación 3), tasa de dilución: 1000 veces	4,1	72,7
Región comparativa (polvo humectable Impression), tasa de dilución: 500 veces	6,8	54,7
Región comparativa (polvo humectable Botokiller), tasa de dilución: 1000 veces	8,8	41,3
Región comparativa (polvo humectable Botopika), tasa de dilución: 2000 veces	6,9	54,0
Región comparativa (polvo humectable granulado Ecoshot), tasa de dilución: 1000 veces	7,2	52,0
Región comparativa (Savior Flowable 20), tasa de dilución: 1500 veces	2,1	86,0
Región sin tratamiento	15	0,0

#### Ejemplo 8 y ejemplo comparativo 8: Prueba para los efectos sobre *Burkholderia plantarii*

El arroz de semilla (variedad: Koshihikari) fue sumergido para ser inoculado en la suspensión de *Burkholderia plantarii* ( $1 \times 10^8$  CFU/ml), que se obtuvo mediante el cultivo con agitación en el medio líquido PD a 27°C durante 52 horas, durante una hora bajo presión reducida para así preparar las semillas infectadas con *Burkholderia plantarii*. Las semillas infectadas con *Burkholderia plantarii* fueron sumergidas en la solución del polvo humectable del ejemplo de formulación 1 y el ejemplo de formulación 3 con una tasa de dilución de 100 veces. Una vez se extrae la solución, las semillas se mantienen en una habitación húmeda a 32°C durante un día para estimular la germinación. Como agente comparativo, una solución de Impression (SDS Biotech K.K.) con una tasa de dilución de 100 veces, también fue sometida a la prueba de la misma manera. Las semillas en las que se estimuló la germinación se sembraron en un vaso de plástico que presentaba un diámetro de 6 cm, lleno con suelo para cultivo. Las plántulas se mantuvieron en una habitación para criar plántulas a 30°C durante tres días después de la siembra, y en una habitación húmeda a 25°C durante 15 días. A continuación, todas las plántulas fueron analizadas respecto a la presencia de la enfermedad, para determinar la tasa de plántulas enfermas. El valor de control (%) se calculó basándose en la tasa de plántulas enfermas en la región no tratada. La cantidad sembrada por vaso fue de 3 g de arroz de semilla seco (90 a 110 granos). Como puede apreciarse a partir de los resultados en la tabla 8, mediante el tratamiento con el agente microbiológico de la presente invención, la tasa de plántulas enfermas con *Burkholderia plantarii* se redujo mucho en comparación con la región no tratada, y se obtuvieron unos efectos de control significativamente altos.

Tabla 8

	Tasa de plántulas enfermas	Valor de control (%)
Región tratada (Ejemplo de formulación 1)	30	60,0
Región tratada (Ejemplo de formulación 3)	35	53,3
Región comparativa (polvo humectable Impression)	55	26,7
Región sin tratamiento	75	0,0

#### Ejemplo 9 y ejemplo comparativo 9: Prueba para el efecto sobre *Rhizoctonia solani*

Se mezclaron 3 g del producto del cultivo de *Rhizoctonia solani* en un medio de salvado con 500 ml de suelo esterilizado para su introducción en una maceta de plástico, y 1 g de la formulación granulada del ejemplo de



formulación 2 y del ejemplo de formulación 4 fue mezclado con el suelo, respectivamente. Como un agente comparativo, 84 mg de polvo humectable Impression también fueron sometidos a la prueba de la misma manera. Se sembraron pepinos (variedad: Sagamihanjiro) y después de cultivar los pepinos a 23°C durante una semana, se investigó la tasa de germinación. El efecto de control (valor de control %) se calculó basándose en la tasa de plántulas enfermas en la región no tratada. Como puede apreciarse a partir de los resultados en la tabla 9, mediante el tratamiento con el agente microbiológico de la presente invención, la tasa de plántulas enfermas con *Rhizoctonia solani* se redujo mucho en comparación con la región no tratada, y se obtuvieron unos efectos de control significativamente altos.

5

Tabla 9

	Tasa de plántulas enfermas	Valor de control (%)
Región tratada (Ejemplo de formulación 2)	12	60,0
Región tratada (Ejemplo de formulación 4)	18	40,0
Región comparativa (polvo humectable Impression)	23	23,3
Región sin tratamiento	30	0,0

**Ejemplo 10 y ejemplo comparativo 10: Actividad contra la larva de segunda etapa de *Meloidogyne* sp. del boniato.**

15

Actividad nematocida contra la larva de segunda etapa de *Meloidogyne* sp. del boniato eclosionada dentro de 24 horas de la ooteca recogida de las raíces de berenjenas (variedad: Juryo). Cada una de las soluciones de la formulación 1 y la formulación 3 con una tasa de dilución de 100 veces (una solución en Tween 20 con una tasa de dilución de 5000 veces) y una cantidad equivalente de larvas de segunda etapa de *Meloidogyne* sp. del boniato (aproximadamente 50 gusanos), fueron añadidas a la microplaca de 24 orificios. Como un agente comparativo, una solución de Impression (SDS Biotech K.K.) con una tasa de dilución de 100 veces también fue sometida a la prueba de la misma manera. La placa fue sellada y colocada en una incubadora a 28°C y una humedad relativa de aproximadamente 50%. Después de 72 horas, la tasa de mortalidad fue investigada mediante observación con un microscopio estereoscópico. En ese momento, los nematodos inmóviles fueron considerados como muertos. La tasa nematocida se calculó de acuerdo con la expresión que se describe a continuación. Como puede apreciarse en los resultados de la tabla 10, mediante el tratamiento con el agente microbiológico de la presente invención, se obtuvo una actividad nematocida extremadamente alta contra la larva de segunda etapa de *Meloidogyne* sp. del boniato.

20

25

Expresión 1:

30

$$\text{Tasa nematocida} = (\text{número de nematodos muertos/número de nematodos analizados}) \times 100$$

Tabla 10

	Tasa nematocida
Región tratada (Ejemplo de formulación 1)	100
Región tratada (Ejemplo de formulación 3)	100
Región comparativa (polvo humectable Impression)	10
Región sin tratamiento	5

35

**Ejemplo 11 y ejemplo comparativo 11 (Prueba para el efecto de control contra *Meloidogyne* sp. del boniato).**

En una maceta de Wagner de 1/10000 a, cada una de las formulaciones granuladas del ejemplo de formulación 2 y el ejemplo de formulación 4 fue mezclada uniformemente con el suelo infectado con *Meloidogyne* sp. del boniato a razón de 40 kg/10 a, y se plantaron en la misma unos tomates de pequeño tamaño (variedad: Sugar lump). Como un agente comparativo, el polvo humectable Impression (SDS Biotech K.K.) también fue sometido a la prueba de la misma manera, a razón de 3,3 kg/10 a. Un mes después de la plantación establecida, el grado de daño a las raíces (grado de nudos en las raíces) fue clasificado y evaluado de acuerdo con los criterios que se describen a continuación. El índice de nudos en las raíces fue determinado de acuerdo con la expresión indicada a continuación para calcular el valor de control. Como puede apreciarse a partir de los resultados en la tabla 11, mediante el tratamiento con el agente microbiológico de la presente invención, los daños a las raíces causados por *Meloidogyne* sp. del boniato disminuyeron mucho en comparación con la región no tratada, y se obtuvieron unos efectos de control significativamente altos.

40

45

Grado de daño 0: No se observaron nudos en las raíces.

- 1: Los nudos en las raíces apenas se aprecian a simple vista, pero pueden encontrarse unos pocos.
- 2: Se observan unos pocos nudos en las raíces.
- 3: Se observa una cantidad moderada de nudos en las raíces.

50

4: Se observa un número de nudos en las raíces a lo largo de toda la rizosfera.

Expresión 2:

5 Índice de nudos en las raíces =  $(\sum (\text{grado de daño} \times \text{número de unidades}) / \text{toda la población investigada} \times 4) \times 100$

Valor de control =  $(1 - \text{Índice de nudos en las raíces en la región tratada} / \text{Índice de nudos en las raíces en la región no tratada}) \times 100$

10 Tabla 11

	Grado de daño	Índice de nudos en las raíces	Valor de control
Región tratada (Ejemplo de formulación 2)	1,2	30	70,0
Región tratada (Ejemplo de formulación 4)	2	50	50,0
Región comparativa (polvo humectable Impression)	3,5	87,5	12,5
Región sin tratamiento	4	100	0,0

**Ejemplo 12 y ejemplos comparativos 12 a 13: Efecto de promoción del crecimiento de las plantas de la cepa AT-332 (prueba básica)**

15 Se efectuó una prueba básica en placa de Petri con respecto a *Arabidopsis thaliana*, para medir el efecto de promoción del crecimiento de las plantas de la cepa AT-332. Después de sumergir las semillas de *Arabidopsis thaliana* en hipoclorito de sodio al 1% durante 20 minutos, las semillas se sumergieron en una solución de etanol al 70% durante dos minutos para esterilizar la superficie de las semillas. A continuación, las semillas se lavaron con agua destilada estéril para ser utilizadas para la prueba. Un medio de sales de Murashige y Skoog (pH 5,7) que contenía 0,8% de agar fue vertido en una placa de Petri estéril de doble partición y fue utilizado para una prueba después de ser enfriado.

20 Fueron inoculadas AT-332 (Ejemplo 12), *Bacillus subtilis* GB03 (Ejemplo comparativo 12) y *Bacillus subtilis* MBI600 (Ejemplo comparativo 13) respectivamente sobre un disco de papel estéril colocado sobre una de las porciones divididas de la placa de Petri mencionada anteriormente, y unas semillas germinadas de *Arabidopsis thaliana* fueron inoculadas en la otra porción de la placa de Petri. La placa inoculada con las bacterias y con *Arabidopsis thaliana* se mantuvo a 22°C (12 horas a la luz/12 horas fuera de la luz) durante diez días, y se observó el estado de crecimiento de las plantas. Los resultados se muestran en las fotografías (a) a (d) en la figura 2, incluyendo los resultados del control (figura 2 (a)), donde no se inocularon bacterias. Un efecto notable de promoción del crecimiento de las plantas fue confirmado con AT-332 (Ejemplo 12; (b)) comparado con *Bacillus subtilis* GB03 (Ejemplo comparativo 12; foto (c)) y *Bacillus subtilis* MBI600 (Ejemplo comparativo 13; foto (d)), que realmente se venden y se utilizan en el mercado de los Estados Unidos.

35 **Ejemplo 13: Efecto de promoción del crecimiento de las plantas de las cepas AT-332 y AT-79 (prueba en maceta)**

40 Se efectuó una prueba en maceta con respecto a plántulas de col china, para medir el efecto de promoción del crecimiento de las plantas de las cepas AT-332 y AT-79. Después de cultivar las cepas AT-332 y AT-79 en un medio LB líquido durante 24 horas, las células bacterianas fueron recogidas por centrifugación. Las células bacterianas recogidas fueron suspendidas en una solución acuosa de cloruro de sodio al 0,85%, de manera que estuvieran contenidas a una concentración de  $1 \times 10^9$  CFU/ml. Se mezclaron 40 ml de la suspensión por 1 kg del suelo de cultivo previamente esterilizado, para que sirviera como el suelo tratado. Por otro lado, se mezclaron 40 ml de solución acuosa de cloruro de sodio al 0,85% por 1 kg del suelo de cultivo previamente esterilizado, para que sirviera como el suelo no tratado. Se dispusieron 100 g de cada uno del suelo tratado y el suelo no tratado en una maceta de plástico (70 mm de diámetro x 68 mm de altura) respectivamente, y semillas de col china (variedad: col china Nozaki nº 2) se sembraron en la maceta. Posteriormente, las macetas se colocaron en un invernadero fijado a 22°C y el peso fresco de la col china cultivada se midió después de 30 días. Los resultados se muestran en la figura 3. Se confirmó un efecto explícito de promoción del crecimiento del cultivo de las cepas AT-332 y AT-79.

50 **Listado de secuencias**

<110> SDS Biotech K. K.

55 <120> Cepas que pertenecen al género Bacillus, formulación microbiana, y procedimiento de cultivo de planta

<130> BOF-7708PCT

<150> PCT/JP2011/062109

ES 2 616 911 T3

<151> 2011-05-26

<160> 3

5 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 1472

<212> ADN

10 <213> Bacillus sp. AT-332 / AT-79

<400> 1

```

gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc ggacagatgg gagcttgctc      60
cctgatgtta gcgccgggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctgcctgta agactgggat      120
aactccggga aaccggggct aataccggat gcttgtttga accgcatggt tcagacataa      180
aagggtgctt cggctaccac ttacagatgg acccggggcg cattagctag ttggtgaggt      240
aacggctcac caaggcgacg atgcgtagcc gacctgagag ggtgatcggc cacactggga      300
ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttccg caatggacga      360
aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaaggtttt cggatcgtaa agctctgttg      420
ttaggaaga acaagtgccg ttcraatagg gcggcacctt gacggtacct aaccagaaag      480
ccacggctaa ctacgtgcc a gcagccggc taatacgtag gtggcaagcg ttgtccggaa      540
ttattgggcy taaagggctc gcagggcgtt tcttaagtct gatgtgaaag cccccggctc      600
aaccggggag ggtcattgga aactggggaa cttgagtgca gaagaggaga gtggaattcc      660
acgtgtagcg gtgaaatgcy tagagatgtg gaggaacacc agtggcgaag gcgactctct      720
ggtctgtaac tgacgctgag gagcgaagc gtggggagcg aacaggatta gataccctgg      780
tagtccacgc cgtaaacgat gagtgctaag tgttaggggg tttccgcccc ttagtgctgc      840
agctaacgca ttaagcactc cgcctgggga gtacggtcgc aagactgaaa ctcaaaggaa      900
ttgacggggg cccgcacaag cgggtggagca tgtggtttaa ttcgaagcaa cgcgaagaac      960
cttaccaggt cttgacatcc tctgacaatc ctagagatag gacgtcccct tcgggggcag     1020
agtgacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatggtggg ttaagtcccc     1080
caacgagcgc aacccttgat cttagttgcc agcattcagt tgggcactct aaggtgactg     1140
ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaatc atcatgcccc ttatgacctg     1200
ggctacacac gtgctacaat gggcagaaca aaggcagcg araccgcgag gttaagccaa     1260
tcccacaaat ctgttctcag ttcggatcgc agtctgcaac tcgactgcgt gaagctggaa     1320
tcgctagtaa tcgcggatca gcatgcccg gtgaatacgt tcccggcct tgtacacacc     1380
gcccgtcaca ccacgagagt ttgtaacacc cgaagtcggt gaggtaacct ttttgagacc     1440
agccgccgaa ggtgggacag atgattgggg tg                                     1472

```

<210> 2

<211> 1472

<212> ADN

20 <213> Bacillus sp. AT-332

<400> 2

ES 2 616 911 T3

gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc ggacagatgg gagcttgctc 60  
cctgatgtta gcggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctgcctgta agactgggat 120  
aactccggga aaccggggct aataccggat gcttgtttga accgcatggt tcagacataa 180  
aaggtggctt cggctaccac ttacagatgg acccgggcg cattagctag ttggtgaggt 240  
aacggctcac caaggcgacg atgcgtagcc gacctgagag ggtgatcggc cacactggga 300  
ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttccg caatggacga 360  
aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaaggtttt cggatcgtaa agctctgtt 420  
ttagggaaga acaagtgccg ttcgaatagg gcggcacctt gacggtacct aaccagaaag 480  
ccacggctaa ctacgtgcc a gcagcccgcg taatacgtag gtggcaagcg ttgtccggaa 540  
ttattggcg taaagggctc gcaggcggt tcttaagtct gatgtgaaag cccccggctc 600  
aaccggggag ggtcattgga aactggggaa cttgagtgc gaagaggaga gtggaattcc 660  
acgtgtagcg gtgaaatgcg tagagatgtg gaggaacacc agtggcgaag gcgactctct 720  
ggtctgtaac tgacgctgag gagcgaagc gtggggagcg aacaggatta gataccctgg 780  
tagtccacgc cgtaaacgat gagtgctaag tgtagggggg tttccgccc ttagtctgc 840  
agctaacgca ttaagcactc cgcctgggga gtacggtcgc aagactgaaa ctcaaaggaa 900  
ttgacggggg cccgcacaag cggtgagca tgtggtttaa ttogaagcaa cgcgaagaac 960  
cttaccaggt cttgacatcc tctgacaatc cttagatag gacgtcccct tcgggggcag 1020  
agtgacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtccc 1080  
caacgagcgc aacccttgat cttagttgcc agcattcagt tgggcactct aaggtgactg 1140  
ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaatc atcatgcccc ttatgacctg 1200  
ggctacacac gtgctacaat gggcagaaca aaggcagcg aaaccgcgag gttaagccaa 1260  
tcccacaaat ctgttctcag ttcggatcgc agtctgcaac tcgactgctg gaagctggaa 1320  
tcgctagtaa tcgcgatca gcatgcccg gtgaatacgt tccgggcct tgtacacacc 1380  
gcccgtcaca ccacgagagt ttgtaacacc cgaagtcggt gaggtaacct ttttggagcc 1440  
agccgccgaa ggtgggacag atgattgggg tg 1472

5 <210> 3  
<211> 1472  
<212> ADN  
<213> Bacillus sp. AT-79

10 <400> 3

ES 2 616 911 T3

gacgaacgct	ggcggcgtgc	ctaatacatg	caagtcgagc	ggacagatgg	gagcttgctc	60
cctgatgtta	gcgcgggacg	ggtgagtaac	acgtgggtaa	cctgcctgta	agactgggat	120
aactccggga	aaccggggct	aataccggat	gcttgtttga	accgcatggt	tcagacataa	180
aaggtggctt	cggctaccac	ttacagatgg	accccgggcg	cattagctag	ttggtgaggt	240
aacggctcac	caaggcgacg	atgcgtagcc	gacctgagag	ggtgatcggc	cacactggga	300
ctgagacacg	gccagactc	ctacgggagg	cagcagtagg	gaatcttccg	caatggacga	360
aagtctgacg	gagcaacgcc	gcgtgagtga	tgaaggtttt	cggatcgtaa	agctctgttg	420
ttaggaaga	acaagtgccg	ttcaaatagg	gcggcacctt	gacggtacct	aaccagaaa	480
ccacggctaa	ctacgtgcc	gcagccggg	taatacgtag	gtggcaagcg	ttgtccggaa	540
ttattggcg	taaagggctc	gcaggcggtt	tcttaagtct	gatgtgaaag	cccccgctc	600
aaccggggag	ggtcattgga	aactggggaa	cttgagtgca	gaagaggaga	gtggaattcc	660
acgtgtagcg	gtgaaatgcg	tagagatgtg	gaggaacacc	agtggcgaag	gcgactctct	720
ggtctgtaac	tgacgctgag	gagcgaaagc	gtggggagcg	aacaggatta	gataccctgg	780
tagtccacgc	cgtaaacgat	gagtgctaag	tgttaggggg	tttccgcccc	ttagtgtctg	840
agctaacgca	ttaagcactc	cgctgggga	gtacggtcgc	aagactgaaa	ctcaaaggaa	900
ttgacggggg	cccgcacaag	cggtggagca	tgtggtttaa	ttcgaagcaa	cgcaagaac	960
cttaccaggt	cttgacatcc	tctgacaatc	ctagagatag	gacgtcccct	tcgggggcag	1020
agtgacaggt	ggtgcatggt	tgctgctcagc	tcgtgctcgtg	agatggtggg	ttaagtcccg	1080
caacgagcgc	aacccttgat	cttagttgcc	agcattcagt	tgggcactct	aaggtgactg	1140
ccggtgacaa	accggaggaa	ggtggggatg	acgtcaaatc	atcatgcccc	ttatgacctg	1200
ggctacacac	gtgctacaat	gggcagaaca	aagggcagcg	agaccgcgag	gttaagccaa	1260
tcccacaaat	ctgttctcag	ttcggatcgc	agtctgcaac	tcgactgcgt	gaagctggaa	1320
tcgctagtaa	tcgcggatca	gcatgcccg	gtgaatacgt	tcccgggcct	tgtacacacc	1380
gcccgtcaca	ccaegagagt	ttgtaacacc	cgaagtcggt	gaggtaacct	ttttggagcc	1440
agccgccgaa	ggtgggacag	atgattgggg	tg			1472

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Cepa AT-332 de *Bacillus* sp. que presenta el número de acceso NITE BP-1095 y que contiene ADNr 16S representado por la secuencia de bases nº 2.
2. Cepa AT-79 de *Bacillus* sp. que presenta el número de acceso NITE BP-1094 y que contiene ADNr 16S representado por la secuencia de bases nº 3.
- 10 3. Cepa según la reivindicación 1 o 2, en la que la cepa *per se* y/o el cultivo de la cepa muestran los efectos de controlar las enfermedades de las plantas, controlar los nematodos y/o promover el crecimiento de las plantas.
- 15 4. Utilización de la cepa y/o del cultivo de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como un agente de control de enfermedades de las plantas, un agente de control de nematodos, o un promotor del crecimiento de las plantas.
5. Procedimiento para cultivar plantas que comprende tratar las plantas con la cepa y/o el cultivo de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

Fig. 1

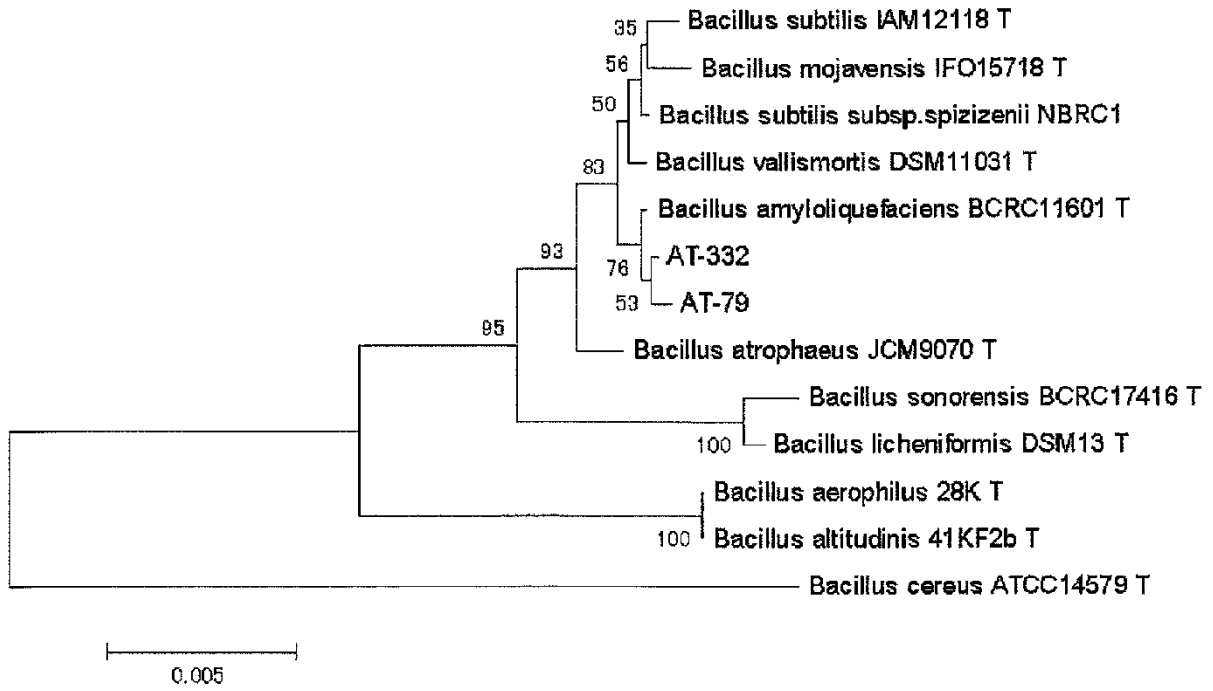


Fig. 2

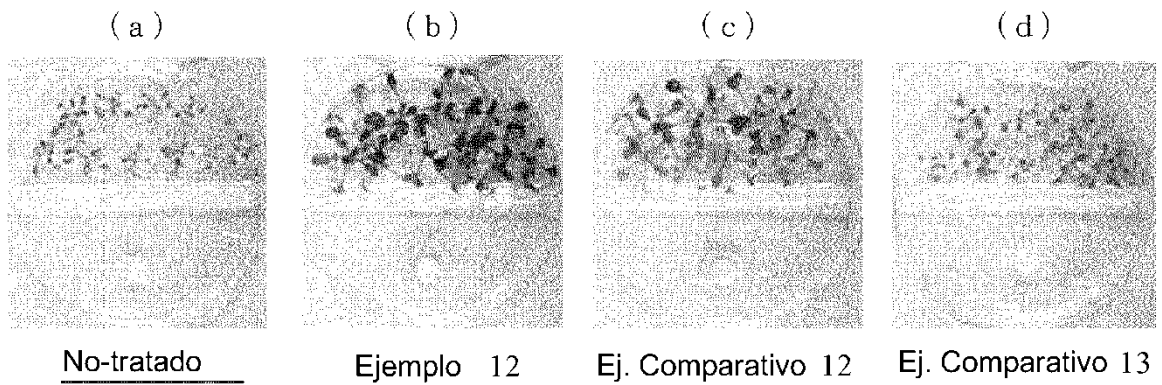


Fig. 3

