

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 052**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12P 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2013** **PCT/JP2013/067907**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014** **WO14207927**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2013** **E 13888363 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019** **EP 3015543**

54 Título: **Material microbiano para reducir la contaminación de la calidad del suelo/agua, limitar la generación de gases de calentamiento y mejorar la función de la planta, y método de fabricación de producto de fermentación**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.12.2019

73 Titular/es:

JAPAN ECO-SCIENCE CO. LTD. (25.0%)
211, 11-1, Shiomigaokacho, Chuo-ku
Chiba-shi, Chiba 260-0034, JP;
NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA
UNIVERSITY (25.0%);
MIROKU CO. LTD. (25.0%) y
KEIYO PLANT ENGINEERING CO. LTD. (25.0%)

72 Inventor/es:

MIYAMOTO, HIROKUNI;
KODAMA, HIROAKI;
MIYAMOTO, HISASHI;
NISHIUCHI, TAKUMI;
ISHIKAWA, KAZUTO;
OGAWA, KAZUO;
ITO, TOSHIYUKI;
KAMITAI, TAKUYA;
OSHIMA, KENSHIRO;
SUDA, WATARU y
HATTORI, MASAHIRA

74 Agente/Representante:

ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

ES 2 735 052 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

Material microbiano para reducir la contaminación de la calidad del suelo/agua, limitar la generación de gases de calentamiento y mejorar la función de la planta, y método de fabricación de producto de fermentación

5

La presente invención se refiere a un método para usos agrícolas de un material microbiano, donde el material microbiano y el producto de fermentación se obtienen por fermentación de un material de partida de fermentación que incluye un material de partida derivado de planta y un material de partida derivado de animal usando una pluralidad de especies de microorganismos termófilos, y conducen a un remedio para la contaminación de la tierra y el agua y a la inhibición de la generación de gases causantes del efecto invernadero, así como contribuyen a mejoras en la funcionalidad de las plantas, particularmente la expresión de genes implicados en la biofilaxis y resistentes a trastorno por alta temperatura, y un aumento en los componentes antioxidantes.

TÉCNICA ANTERIOR

15

En los últimos años, los problemas medioambientales se han vuelto graves a escala mundial. Por ejemplo, mirando la agricultura desde la perspectiva del entorno, después de que se hayan aplicado fertilizantes químicos o compost inmaduro a las tierras de cultivo, se consideran problemáticos la contaminación con iones nitrato que penetran en el agua subterránea y la generación de monóxido de dinitrógeno, que es un gas causante del efecto invernadero, de la tierra. Los efectos del calentamiento global provocan trastorno por alta temperatura en el cultivo de cultivos y también son un factor ambiental desencadenante de brotes de enfermedades. Además, debido a los problemas globales de la alimentación, se están buscando técnicas para la eficiente producción de cultivos. En este contexto, existe una situación donde es necesario el uso eficiente de fertilizantes químicos o productos químicos agrícolas, pero estos materiales son un factor responsable de la destrucción medioambiental anteriormente descrita. Por otra parte, existe una necesidad de técnicas de producción agrícola que sean respetuosas con el entorno y la salud, mientras que se están llevando a cabo mejoras en los materiales e instalaciones y desarrollos de técnicas, tales como técnicas de limpieza (véanse las bibliografías de patente 1 a 3). La bibliografía de patente 1 se refiere a un agente de pulverización foliar en el que está coexistiendo una disolución acuosa de ácido orgánico de la fermentación del azúcar, y magnesio o calcio, y opcionalmente urea, de manera que se resuelve el problema anteriormente mencionado. En la bibliografía de patente 1, se observa la capacidad de disminuir el nitrato, pero este mecanismo es desconocido y el agente de pulverización foliar no presenta efectos ejercidos sobre otros aspectos medioambientales y la funcionalidad de las plantas. La bibliografía de patente 2 se caracteriza porque la fuente de UV está en el intervalo de longitud de onda de 280 a 380 nm y tiene un pico a una longitud de onda de aproximadamente 312 nm. En la bibliografía de patente 2, se proporcionan hallazgos sobre un control óptimo de la iluminación eléctrica que se puede aplicar solo a las fábricas de plantas basándose en la luz artificial, pero la fuente de UV no tiene ningún efecto ejercido sobre otra funcionalidad de las plantas. La bibliografía de patente 3 se refiere a un método de disminución del nitrógeno del nitrato y compuestos orgánicos volátiles usando un alcohol. La bibliografía de patente 3 se refiere a una técnica para disminuir los compuestos orgánicos de nitrato y volátiles de una tierra, pero el uso de un alcohol y similares no permite que esta técnica se aplique a sitios de campos agrícolas.

40

Además, se han esclarecido los mecanismos moleculares por los que las plantas pueden soportar las malas condiciones medioambientales (véanse las bibliografías no de patente 1 a 5); sin embargo, algunas de las técnicas que utilizan estos mecanismos son como las técnicas de recombinación genética, que son difíciles de ser aceptadas en la sociedad (bibliografías no de patente 6 a 8). Las bibliografías no de patente 1 a 5 proporcionan hallazgos sobre la participación de HSPs asociadas a propiedades resistentes a enfermedades y trastorno por alta temperatura, pero ninguna de estas desvela una evaluación global de efectos sobre el cuerpo de las plantas, por ejemplo, a diferencia de la presente invención. Las bibliografías no de patente 6 a 8 proporcionan hallazgos sobre técnicas de recombinación genética, y no se puede decir que como se proporcionan por la presente invención, estas proporcionan una técnica que tiene funciones polifacéticas, tales como una disminución en el nitrato, un aumento en las cantidades de sustancias antioxidantes, funciones biofilácticas y resistencia a trastorno por alta temperatura, sin recombinación genética.

50

Mientras tanto, los presentes inventores han desarrollado materiales de fermentación usando una población de microorganismos que incluye una pluralidad de especies de microorganismos termófilos, tales como *Bacillus brevis* y *Bacillus stearothermophilus*, *Thermophilic actinomycetes* y especies estrechamente relacionadas con los mismos (véanse las bibliografías de patente 4 a 7).

LISTA DE REFERENCIAS

BIBLIOGRAFÍA DE PATENTES

60

Bibliografía de patente 1: JP 2006-036684 A

Bibliografía de patente 2: JP 2008-086272 A
Bibliografía de patente 3: JP 2002-370085 A

5 Bibliografía de patente 4: JP 3146305 B1

Bibliografía de patente 5: JP 3314302 B1

Bibliografía de patente 6: JP 3385402 B1

10

Bibliografía de patente 7: WO 2011/099514

BIBLIOGRAFÍA NO DE PATENTES

15 Bibliografía no de patente 1: Jarosz DF and Susan Lindquist S. (2010) Hsp90 and Environmental Stress Transform the Adaptive Value of Natural Genetic Variation. Science 330: 1820-1824.

Bibliografía no de patente 2: Yule Liu et al. (2004) Molecular Chaperone Hsp90 Associates with Resistance Protein N and Its Signaling Proteins SGT1 and Rar1 to Modulate an Innate Immune Response in Plants. J. Biol. Chem. 279: 2101-2108.

20

Bibliografía no de patente 3: Jae-Heung K et al. (2000) Upregulation of an Arabidopsis RING-H2 gene, XERICO, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis. The Plant Journal 47: 343-355.

25 Bibliografía no de patente 4: Snyman M and Cronje MJ. (2008) Modulation of heat shock factors accompanies salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 in tomato seedlings. Journal of Experimental Botany 59: 2125-2132.

Bibliografía no de patente 5: William B. Gurley (2000) HSP101: A Key Component for the Acquisition of Thermotolerance in Plants. The Plant Cell, Vol. 12, 457-460.

30

Bibliografía no de patente 6: Enikeev AG et al. (2010) Tobacco cell cultures transformed by the hsp 101 gene exhibit an increased resistance to potassium fluoride Dokl Biol Sci 430: 29-30.

Bibliografía no de patente 7: Montero-Barrientos M et al. (2010) Transgenic expression of the Trichoderma harzianum hsp70 gene increases Arabidopsis resistance to heat and other abiotic stresses. J Plant Physiol 167: 659-65.

35

Bibliografía no de patente 8: Prieto-Dapena P et al. (2006) Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. Plant Physiol 142: 1102-12.

40 SUMARIO DE LA INVENCION

PROBLEMAS TÉCNICOS

La agricultura convencional hace un uso excesivo de fertilizantes químicos, que, como resultado, provoca problemas que conducen a la contaminación con nitrato que penetra en el agua subterránea y a la generación de un gas causante del efecto invernadero de monóxido de dinitrógeno producido por mohos propagados en campos agrícolas. Además, ha llegado a ser problemático que con el calentamiento global se provoquen trastorno por alta temperatura y enfermedades de cultivos. Por tanto, existe una necesidad de una técnica que sea respetuosa con el entorno y mejore la calidad de los cultivos.

50

La presente invención es para proporcionar un método para usos agrícolas de un material microbiano funcional para resolver los problemas anteriormente descritos. Los entornos de tierra y agua tienen factores que siempre varían, y así es necesario que para estos factores variables se presenten efectos polifacéticos por una población de múltiples especies de microorganismos, no por una única especie de microorganismo. Por ejemplo, tomando, como un ejemplo, una tierra que permite el crecimiento de un cultivo, un periodo de lluvias conduce a un aumento del contenido de agua en la tierra, mientras que un periodo de poca lluvia hace la tierra bastante seca. Dependiendo de estas variaciones, se hacen múltiples respuestas estables para lograr una mejora y modificación de las funciones de las plantas.

55

SOLUCIÓN A LOS PROBLEMAS

60

I. Efectos que el producto de fermentación de bacterias termófilas tiene sobre la contaminación de la tierra y del agua subterránea y sobre la generación de gases causante del efecto invernadero

1. Se reduce la concentración de iones nitrato en la tierra.

2. Esta reacción se inhibe por microorganismos que tienen alta sensibilidad a antibióticos, tales como cloranfenicol (y sus enzimas).

5

3. Se promueve la reacción de desnitrificación de la tierra. En particular, se suprime la producción de N_2O y se promueve la producción de N_2 . El gas N_2O tiene un potencial de calentamiento de aproximadamente 300 veces superior al CO_2 , y así es importante suprimir su generación. Se cree que esta reacción se promueve por P450nor derivado de hongos; el producto de fermentación según la presente invención (una cepa de microorganismos NP-1

10

contenida en él) tiene la función de suprimir el crecimiento fúngico y además da como resultado el funcionamiento de un grupo de genes que conduce a la desnitrificación preferencial del gas N_2 .

4. Como resultado, las reacciones descritas anteriormente también reducen la contaminación del agua con nitrato que penetra desde la tierra en el agua subterránea.

15

5. Es posible que la limpieza de agua de agua contaminada que tiene una alta concentración de sales (de aproximadamente 10 %) se logre por medio de bacterias halotolerantes y resistentes a álcalis (de los géneros *Oceanobacillus* y *Virgibacillus*).

20 II. Efectos que el producto de fermentación de bacterias termófilas tiene sobre la funcionalidad de plantas

1. La acción de las bacterias termófilas da como resultado la activación de transportadores de nitrato en las raíces y el eficiente uso de nitrato en la tierra.

25 2. Se desarrollan pelos de las raíces, y su crecimiento se promueve por, por ejemplo, la activación de auxinas.

3. Las reacciones descritas anteriormente conducen al uso eficiente del nitrógeno de la tierra, que permite elevada producción con pequeñas cantidades de nitrógeno.

30 4. Se cultivan plantas resistentes al calor por funciones de reparación enzimática por un grupo de HSPs.

5. Se proporcionan cultivos ricos en antioxidantes por el aumento en glutatión transferasa, vitaminas A, C y E, y otros.

35 6. Se inhibe el brote de patógenos vegetales y las plagas de insectos por la activación de LTPs, inhibidores de la proteasa, y otros.

El material microbiano para usos agrícolas según la presente invención se basa en un material de partida de fermentación que se puede estar constituido por aproximadamente 70 % a aproximadamente 80 % en peso de un material de partida derivado de planta y aproximadamente 30 % a aproximadamente 20 % en peso de un material de

40

Además, el material microbiano para usos agrícolas según la presente invención se puede obtener por fermentación usando una población de microorganismos que incluye una población de microorganismos designados por el número de depósito NITE BP-1051. La funcionalidad del material funcional se estabiliza, por ejemplo, por una población de

45

microorganismos designada por el número de depósito ATCC PTA-1773. Además, la población de microorganismos contenida en el material microbiano para usos agrícolas según el método de producción de la presente invención puede tener 10^8 células/g a aproximadamente 10^9 células/g.

50 El material de partida derivado de planta que se usa para un material microbiano para usos agrícolas según la presente invención puede ser uno o más seleccionados del grupo que consiste en salvado de arroz, cebada y salvado similar, cascarillas rotas, torta de soja, desecho de tofu, *sakekasu* (posos de sake), posos de *shochu* (bebida destilada), residuos de hojas de té, posos de café, residuos después de exprimir frutas y residuos después de exprimir verduras.

El material de partida derivado de animal que se usa en la presente invención puede ser uno o más seleccionado del

55

grupo que consiste en crustáceos, peces y residuos después del procesamiento de crustáceos, y residuos después del procesamiento de peces.

Otro material microbiano para usos agrícolas según la presente invención es un material funcional que contiene aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 % en peso del material funcional como se ha descrito anteriormente.

60

En el presente documento también se desvela un método de producción de un material microbiano para usos agrícolas, incluyendo el método la etapa de agitación de agitar un material de partida derivado de planta y un material de partida derivado de animal para obtener un material de partida de fermentación; y una etapa de fermentación de

someter el material de partida de fermentación obtenido por la etapa de agitación a fermentación usando una población de microorganismos designada por el número de depósito ATCC PTA-1773.

EFFECTOS VENTAJOSOS DE LA INVENCION

5 Según la presente invención, como se muestra en la fig. 1, un grupo de enzimas altamente estables en una población de microorganismos activos dentro del material microbiano para usos agrícolas según la presente invención provoca la desnitrificación de iones nitrato en una tierra sin la penetración de los iones nitrato dentro del suelo, como gas nitrógeno, y usando su estímulo y similares, se induce el enraizamiento y se activan los transportadores de nitrato en
10 las raíces. Esto da como resultado el crecimiento de plantas incluso en condiciones de bajos nutrientes, y reducidas concentraciones de nitrato dentro del cuerpo de las plantas, así como elevadas cantidades de componentes que tienen alta actividad antioxidación. Además, los propios microorganismos activos dentro del material microbiano para usos agrícolas según la presente invención y una población de microorganismos activos en una tierra que se activa por los microorganismos activos provocan la fijación del gas nitrógeno en la tierra y en el aire en simbiosis con la planta, dando
15 como resultado elevadas concentraciones de ácido glutámico, arginina, y otros, dentro del cuerpo de la planta. Además, los efectos que se proporcionan por, por ejemplo, los componentes de la pared celular de microorganismos altamente estables dentro del material microbiano para usos agrícolas según la presente invención dan como resultado elevadas cantidades de expresión de genes implicados en la biofilaxis y resistentes a estrés de las propias plantas. Al mismo tiempo, los efectos ejercidos por, por ejemplo, lipopéptidos cíclicos y enzimas resistentes al calor secretadas
20 por microorganismos dentro del material microbiano para usos agrícolas según la presente invención inhiben el crecimiento de hongos filamentosos con alta patogenicidad, y en líneas generales, mejoran la calidad y las funciones de las plantas. Los resultados de estos mecanismos de acción son del siguiente modo. 1) Llega a ser posible inhibir la contaminación por nitrato en tierras y agua y la generación de un gas N_2O de calentamiento emitido en el aire, como efectos ejercidos sobre la contaminación de la tierra y del agua subterránea, contaminación del agua y producción de
25 gas causante del efecto invernadero. En el agua residual industrial, también llega a ser posible llevar a cabo el tratamiento de agua residual en un entorno con alta concentración de sales y alta alcalinidad, que ha sido difícil de limpiar, usando propiedades de bacterias halotolerantes y resistentes a álcalis. 2) Llega a ser posible, como efectos que tiene el producto de fermentación de bacterias termófilas sobre la funcionalidad de plantas, proporcionar una función reducida de la nitrificación y aumentar la producción de sustancias antioxidantes a altas concentraciones. Al
30 mismo tiempo, es posible evitar el trastorno por alta temperatura por HSP y otras potenciando la función reparadora enzimática en cultivos y logrando la activación del sistema de biofilaxis contra el estrés medioambiental, tal como repelencia potenciada a plagas de insectos, por efectos ejercidos por LTPs, inhibidores de la proteasa, y otros.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 La fig. 1 es una representación esquemática que muestra los efectos que tiene un material microbiano para usos agrícolas según la presente invención sobre una tierra, una planta y el entorno.

La fig. 2 es un diagrama circular que muestra los filos bacterianos en un sistema de múltiples microorganismos cuando
40 se ha estabilizado un material microbiano para usos agrícolas según la presente invención.

La fig. 3 es un gráfico que muestra el efecto de disminución del nitrato dentro del cuerpo de la planta, que depende de la cantidad de adición de un material microbiano para usos agrícolas según la presente invención. El gráfico indica cambios en la concentración de nitrato dentro del cuerpo de una planta modelo, *Arabidopsis thaliana*.
45

La fig. 4 es un gráfico que muestra el efecto de disminuir el nitrato en una tierra, que depende de la cantidad de adición de un material microbiano para usos agrícolas según la presente invención, e indica cambios en la concentración de nitrato en la tierra.

50 La fig. 5 es un gráfico de resultados experimentales que muestra la longitud de raíces de *komatsuna* (*Brassica rapa* var. *perviridis*) cultivada con un material microbiano para usos agrícolas según la presente invención.

La fig. 6 es un gráfico de resultados experimentales que muestra la cantidad de expresión de un transportador de nitrato en las raíces de una planta *A. thaliana* cultivada con un material microbiano para usos agrícolas según la
55 presente invención.

La fig. 7 es un gráfico de resultados experimentales que muestra los cambios en la concentración de nitrato en una tierra cuando se usó un material microbiano para usos agrícolas según la presente invención y cuando se llevó a cabo un método de bloqueo de acetileno.
60

La fig. 8 es un gráfico de resultados experimentales que muestra la concentración de N_2O producido en una tierra y acumulada cuando se usó un material microbiano para usos agrícolas según la presente invención y cuando se llevó a cabo un método de bloqueo de acetileno.

La fig. 9 es un gráfico de resultados experimentales que muestra la concentración de iones amonio acumulados dentro del cuerpo de una planta *A. thaliana* cuando se usó un material microbiano para usos agrícolas según la presente invención.

5

La fig. 10 es un gráfico de resultados experimentales que muestra las concentraciones de ácido glutámico y glutamina dentro del cuerpo de una planta *A. thaliana* cuando se usó un material microbiano para usos agrícolas según la presente invención.

10 La fig. 11 es un gráfico de resultados experimentales que muestra la concentración de prolina acumulada dentro del cuerpo de una planta *A. thaliana* cuando se usó un material microbiano para usos agrícolas según la presente invención.

La fig. 12 representa un árbol filogenético de secuencias de bases de ARNr 16S de varias cepas que incluyen la nueva
15 cepa de *Paenibacillus*.

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES

Lo siguiente da una descripción de realizaciones para llevar a cabo la presente invención. La presente invención no
20 se limita a estas realizaciones.

La presente invención proporciona usos agrícolas donde el material microbiano para usos agrícolas se obtiene por fermentación de un material de partida de fermentación que incluye un material de partida derivado de planta y un material de partida derivado de animal usando una población de microorganismos que incluyen una pluralidad de
25 especies de microorganismos termófilos, y conduce a un remedio para la contaminación de la tierra y del agua y a la inhibición de la generación de gases causantes del efecto invernadero, y al mismo tiempo tiene una función de contribuir a una mejora en la funcionalidad de las plantas.

Se cree que la población de microorganismos y sus productos metabólicos que están incluidos en un material
30 microbiano para usos agrícolas según la presente invención modifican la circulación de nitrógeno dentro de una tierra, agua subterránea, plantas y el aire, actuando sobre la microflora en la tierra a la que se ha aplicado el material microbiano para usos agrícolas y modificando las reacciones de reducción de nitrato en la tierra, así como las reacciones de desnitrificación. También se cree que los cambios en la microflora de la tierra condujeron a cambios en el patrón de expresión génica en las plantas y a la inducción de proteínas de choque térmico (HSPs), componentes
35 antioxidantes, y otros.

La población de microorganismos que se puede usar en la presente invención incluye una pluralidad de especies de microorganismos termófilos. Las especies específicas de estos microorganismos incluyen, por ejemplo, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermoamylovorans*, *Thermophilic actinomycetes* y especies estrechamente
40 relacionadas con los mismos. Entre estas especies, es preferible que la población de microorganismos que se usa en la presente invención incluya una población de microorganismos designada por el número de depósito ATCC PTA-1773 y una población de microorganismos designada por el número de depósito BP-1051.

La población de microorganismos designada por el número de depósito ATCC PTA-1773 es una mezcla de
45 microorganismos que incluye una bacteria termófila C-1, que es una especie estrechamente relacionada con *Bacillus brevis*, una bacteria termófila C-3, que es una especie estrechamente relacionada con *Bacillus brevis*, y una bacteria termófila CH-4, que es una especie estrechamente relacionada con *Bacillus stearothermophilus*, un actinomiceto termófilo MH-1, un lactobacilo termófilo o resistente al calor LM-1, que es una especie estrechamente relacionada con *Bacillus coagulans*, y un lactobacillo termófilo o resistente al calor LM-2, que es una especie estrechamente
50 relacionada con *Bacillus coagulans*.

Es preferible que un material microbiano para usos agrícolas según la presente invención incluya una población de microorganismos de desde aproximadamente 10^8 células/g hasta aproximadamente 10^9 células/g. Es además preferible que un material microbiano para usos agrícolas según la presente invención incluya una población de
55 microorganismos designada por el número de depósito ATCC PTA-1773 de desde aproximadamente 10^8 células/g hasta aproximadamente 10^9 células/g; y una población de microorganismos designada por el número de depósito NITE BP-863 de desde aproximadamente 10^6 células/g hasta aproximadamente 10^7 células/g.

Es preferible que el material microbiano que se usa en la presente invención incluya 10 % a 1 % en peso de una
60 población de microorganismos designada por el número de depósito NITE BP-1051. La población de microorganismos incluye microorganismos termófilos de los géneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Virgibacillus*, *Anoxybacillus* y *Paenibacillus*. Además, el material microbiano se estabiliza por la co-existencia con inóculo de termófilos MIROKU M2K que incluye microorganismos de los géneros *Meiothermus*, *Vulcanithermus*, *Thermus*, *Oceanobacillus*, y similares en el filo

Deinococcus-Thermus. El inóculo de termófilos MIROKU M2K, que es una población de estos microorganismos, no fue aceptado para depósito en el Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación debido a que es una mezcla de bacterias de múltiples especies y es difícil de cultivar, y así se ha guardado en Miroku Co., Ltd. (Kitsuki, Oita Pref.). La población de microorganismos que se ha depositado en la ATCC con el número de depósito PTA-1773 también se puede utilizar como población de microorganismos que pueden ser co-existentes como en este caso.

El material de partida derivado de planta que se usa en la presente invención se refiere a un material de partida derivado de plantas tales como verduras y granos, y pueden ser materiales de partida baratos, por ejemplo, restos de comida y otros. En particular, el material de partida derivado de planta incluye, por ejemplo, salvado de arroz, cebada y salvado similar, cascarillas rotas, torta de soja, desecho de tofu, *sakekasu* (posos de sake), posos de *shochu* (bebida destilada), residuos de hojas de té, posos de café, residuos después de exprimir frutas y residuos después de exprimir verduras.

El material de partida derivado de animal que se usa en la presente invención se refiere a un material de partida derivado de animales tales como peces y crustáceos. En particular, el material de partida derivado de animal incluye, por ejemplo, crustáceos, peces y residuos después de su procesamiento.

Como crustáceos, se puede hacer uso de organismos denominados gamba, cangrejo, cangrejo ermitaño, y similares. Como peces, se puede hacer uso de peces de fondo que han sido cogidos en palangres, peces que han sido cogidos por pesca, pero no se venden en mercados, y otros. Además, también se pueden usar residuos de crustáceos y peces después de haber sido procesados para alimentos.

El material de partida de fermentación que se usa en la presente invención está preferentemente constituido por aproximadamente 50 % a aproximadamente 90 % en peso de un material de partida derivado de planta y aproximadamente 50 % a aproximadamente 10 % en peso de un material de partida derivado de animal, y adicionalmente preferentemente aproximadamente 70 % a aproximadamente 80 % en peso de un material de partida derivado de planta y aproximadamente 30 % a aproximadamente 20 % en peso de un material de partida derivado de animal.

Un material microbiano para usos agrícolas según la presente invención es capaz de mejorar la funcionalidad de las plantas, mientras que remedia la contaminación de la tierra y el agua e inhibe la generación de gases causantes del efecto invernadero.

El método para producir el material microbiano para usos agrícolas incluye (a) la etapa de agitación de agitación un material de partida derivado de planta y un material de partida derivado de animal para obtener un material de partida de fermentación; y (b) una etapa de fermentación de someter el material de partida de fermentación obtenido por la etapa de agitación a fermentación usando una población de microorganismos designada por el número de depósito NITE BP-1051.

La etapa de agitación (a) es una etapa en la que un material de partida derivado de planta como se ha descrito anteriormente y un material de partida derivado de animal como se ha descrito anteriormente se agitan y mezclan para obtener un material de partida de fermentación que tiene los materiales de partida respectivos dispersados aproximadamente uniformemente en su interior. En el caso del material de partida de fermentación que es incompleto en dispersar estos materiales de partida, la fermentación en la etapa de fermentación posterior podría llegar a ser incompleta. También es preferible moler el material de partida derivado de planta o derivado de animal antes de la agitación, debido a que la molienda del material de partida conduce a la fácil agitación de estos materiales de partida.

La etapa de fermentación (b) es una etapa en la que el material de partida de fermentación obtenido en la etapa de agitación (a) se somete a fermentación. En la fermentación, se hace uso de una población de microorganismos designada por el número de depósito NITE BP-1051. La temperatura de fermentación es preferentemente aproximadamente 20 °C a aproximadamente 90 °C, adicionalmente preferentemente aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C. El periodo de fermentación es preferentemente aproximadamente 5 horas a aproximadamente 24 horas, adicionalmente preferentemente aproximadamente 10 horas a aproximadamente 14 horas.

Además, la etapa de fermentación (b) se lleva a cabo preferentemente usando al menos dos recipientes de fermentación. En los casos que usan una pluralidad de recipientes de fermentación, es preferible que se varíen las temperaturas de fermentación en las etapas respectivas en los recipientes de fermentación. Esto es debido a que en cada una de estas etapas, la fermentación se lleva a cabo con microorganismos que tienen una preferencia por la temperatura en la etapa, haciendo así posible obtener un material microbiano funcional que se produce por múltiples reacciones de fermentación.

Tabla 1: Población de microorganismos que se ha depositado internacionalmente como NITE BP-1051:

Nº	Nº de depósito	Especies estrechamente relacionadas
IP-95	AB618495	<i>Bacillus raris</i> LMG 22866 ^T
IP-2	AB618496	<i>Bacillus badius</i> NBRC 15713 ^T
IP-14	AB618497	<i>Bacillus fortis</i> LMG 22079 ^T
N-16	AB618492	<i>Bacillus coagulans</i> ATCC7050 ^T
IP-23	AB618498	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> KCTC 13423 ^T
IP-9	AB618499	<i>Virgibacillus pantothenicus</i> IAM 11061 ^T
IP-3	AB618500	<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i> DSM 14988 ^T
IP-60	AB618501	<i>Paenibacillus timonensis</i> CIP 108005 ^T
IP-75	AB618502	<i>Paenibacillus curdlanolyticus</i> IFO 15724 ^T

La tabla 1 indica especies estrechamente relacionadas con las bacterias BP-1051 internacionalmente depositadas en NITE, y su registro de secuencia.

5

Tabla 2 Inóculo de termófilos MIROKU M2K

(Especies estrechamente relacionadas de géneros de bacterias identificados basándose en los resultados de análisis de secuencias de ADNr 16S)

Listado de géneros	Desulfurispora	Propionibacterineae
Achromatium	Dietzia	Prosthecomicrobium
Acidimicrobinae	Dorea	Rhodospirillum
Acidimicrobium	Eubacterium	Roseiflexus
Actinomyces	Flevo bacterium	Roseomonas
Adhaeribacter	Gammatimonas	Ruminococcus
Aeriscardovis	Geobacillus	Salibacillus
Aeromicrobium	Georgenia	Salinibacillus
Afifella	Gordonia	Salinicoccus
Alicyclobacillus	Gracilibacillus	Schlegelella
Allofustis	Halorhodospira	Solirubrobacteraceae
Amphibacillus	Heliobacterium	Sphaerobacter
Anaerococcus	Hipaea	Spirochaeta
Anaerococcus	Hydrogenophilus	Staphylococcus
Anaerovorax	Jeotgalicoccus	Steroidobacter
Anoxybacillus	Lactobacillus	Streptococcus
Atopostipas	Leucobacter	Succinoclasticum
Atopostipes	Bacteria Gram-positiva de G+C bajo	Symbiobacterium
Bacteria Bacillaceae	Lutispora	Syntrophomonas
Bacillus	Macroccoccus	Tapidamorphus
Bacteroides	Mahella	Thermaerobacter
Barnesiella	Marinibacillus	Thermanaeromonas
Bifidobacterium	Mechercherimyces	Thermoanaerobacter
Brachybacterium	Meiothermus	Thermoanaerobacterium
Brevibacterium	Methylocystis	Thermobacillus
Caldanaerobacter	Methylosinus	Thermobifida
Caldicellulosiruptor	Microbacterium	Thermoleophilum
Caldilinea	Micrococcineae	Thermomicrobium
Caloramator	Moorella	Thermus
Cellulosimicrobium	Mycobacterium	Tissierella
Cerasbacillus	Nisaea	Incertae Sedis XI_sin clasificar
Clostridialesbacterium	Nosocomicoccus	Thermaceae_sin clasificar
Clostridium	Oceanobacillus	Ureibacillus
Coprothermobacter	Paenibacillus	Vagococcus
Corynebacterium	Parabacteroides	Virgibacillus
Craurococcus	Pediococcus	Vulcanithermus
Curtobacterium	Peptoniphilus	Weissella
Dasulfotomaculum	Phaeospirillum	

10

La tabla 2 representa una lista de nombres de géneros.

EJEMPLOS

La presente invención se describe con más detalle basándose en ejemplos, pero no se limita a estos ejemplos.

5

1. Producción de materiales microbianos funcionales

Se produjeron los materiales microbianos funcionales en los ejemplos 1 y 2 por los métodos descritos a continuación.

10 (Ejemplo 1)

Para un material de partida de fermentación, se usó un producto de fermentación derivado de producto marino que se había obtenido por fermentación de un producto marino que incluye, como material de partida derivado de planta, aproximadamente 50 % en peso de salvado de cebada, aproximadamente 20 % en peso de, y aproximadamente 10 %
15 en peso de salvado de arroz, y adicionalmente como material de partida derivado de animal, aproximadamente 20 % en peso de crustáceos, tales como gambas y cangrejos, peces de fondo, y otros cogidos por arrastre de fondo. El producto de fermentación derivado de producto marino resultante contuvo una población de microorganismos de desde aproximadamente 10^8 células/g hasta aproximadamente 10^9 células/g, que estaba compuesta por aproximadamente 70 % a aproximadamente 90 % en peso de los microorganismos designados por el número de
20 depósito PTA-1773 y aproximadamente 30 % a aproximadamente 10 % en peso de los microorganismos designados por el número de depósito NITE BP-1051.

Se mezclaron el material de partida derivado de planta y el material de partida derivado de animal y se agitaron bien, y luego se sometieron a fermentación de una única etapa a 40 °C durante 14 horas, seguido por secado para obtener
25 un pienso de cultivo funcional según la presente invención. El material funcional resultante contuvo una población de microorganismos de desde aproximadamente 10^8 células/g hasta aproximadamente 10^9 células/g, que estuvo compuesta por aproximadamente 90 % hasta aproximadamente 99 % en peso de los microorganismos designados por el número de depósito PTA-1773 y aproximadamente 10 % a aproximadamente 1 % en peso de los microorganismos designados por el número de depósito NITE BP-1051.

30

(Ejemplo 2)

Para un material de partida de fermentación, se usó un producto marino que incluía, como material de partida derivado de planta, aproximadamente 20 % en peso de un lecho de setas residual, y adicionalmente como material de partida
35 derivado de animal, aproximadamente 30 % en peso de crustáceos, tales como gambas y cangrejos, peces de fondo, y otros cogidos por pesca de arrastre. El lecho de setas residual contuvo una población de microorganismos de desde aproximadamente 10^8 células/g hasta aproximadamente 10^9 células/g, que estuvo compuesta por aproximadamente 70 % a aproximadamente 90 % en peso de los microorganismos designados por el número de depósito PTA-1773 y aproximadamente 30 % a aproximadamente 10 % en peso de los microorganismos designados por el número de
40 depósito NITEBP-1051.

Se mezclaron y agitaron bien el material de partida derivado de planta y el material de partida derivado de animal, y luego se sometieron a fermentación de dos etapas. Las condiciones de fermentación en la primera etapa fueron 50 °C a 60 °C y 4 horas a 5 horas, mientras que las condiciones de fermentación en la segunda etapa fueron 30 °C a 40 °C
45 y 6 horas a 8 horas. Después de la fermentación de segunda etapa, se secó el material de partida de fermentación que había pasado por el procedimiento de fermentación para obtener un material microbiano funcional según la presente invención. El material microbiano funcional resultante contuvo una población de microorganismos de desde aproximadamente 10^8 células/g hasta aproximadamente 10^9 células/g, que estuvo compuesta por aproximadamente 70 % a aproximadamente 90 % en peso de los microorganismos designados por el número de depósito PTA-1773 y
50 aproximadamente 30 % a aproximadamente 10 % en peso de los microorganismos designados por el número de depósito NITE BP-1051.

2. Actividad para la degradación de sustancias orgánicas en entornos de tierra y agua con alta concentración de sales y alta alcalinidad

55

Se cultivaron las poblaciones de microorganismos designadas BP-1051 e inóculo de termófilos MIROKU M2K, por ejemplo, en un medio de infusión de corazón con una concentración de sales de 10 %, para seleccionar especies bacterianas que tienen una capacidad para degradar sustancias orgánicas.

60 La cepa IP-9, que está contenida en la población de microorganismos designada BP-1051, es una especie estrechamente relacionada con la cepa estándar *Virgibacillus pantothenicus*, que produce ectoína, un componente resistente a la sal. La ectoína se conoce como un hidratante. En realidad, se encontró que la cepa IP-9 tenía una capacidad para degradar sustancias orgánicas incluso a concentraciones de sales de 10 % o superiores. Además, la

cepa IP-9 es capaz de co-cultivo con una especie estrechamente relacionada con *Oceanobacillus profundus* que está contenida en la flora de bacterias de múltiples especies. Esta especie *Oceanobacillus profundus* también se conoce por tener una capacidad para degradar sustancias orgánicas a altas concentraciones de sal y alcalinas; en realidad, se encontró una especie estrechamente relacionada con *Oceanobacillus profundus* como una especie que estuvo
 5 contenida en la población de microorganismos designada inóculo de termófilos MIROKU M2K. Actualmente, no ha llegado a ser posible realizar el cultivo persistente de esta especie bacteriana como una cepa aislada. En cualquier caso, se puede decir que las funciones de esta especie bacteriana contribuyen a la limpieza de los entornos de tierra y agua con alta concentración de sales y alta concentración de álcali fuerte.

10 3. Evaluación de la disminución de nitrato para tierras, cuerpos de las plantas, y otros

Se usó *Arabidopsis thaliana* como planta modelo, y se llevaron a cabo experimentos en tierra de cultivo KUREHA (tierra superficial de una profundidad de 5 cm) como tierra nutriente. En resumen, después de la vernalización se aplicó tratamiento durante la noche a 4 °C, se llevó a cabo el cultivo durante 21 días en una sala de temperatura controlada
 15 (a 23 °C) en condiciones de 24 horas de luz a una iluminancia de 10.000 lux, añadiéndose 100 ml de agua cada dos días.

En la fig. 3 se da un gráfico que muestra el efecto de disminuir el nitrato en la planta. En la fig. 4 se da un gráfico que muestra el efecto de disminuir el nitrato en la tierra. Como se muestra en las figs. 3 y 4, se determinó que la
 20 concentración de nitrato dentro del cuerpo de la planta y en la tierra se redujo de un modo dependiente de la concentración del material microbiano añadido para usos agrícolas según la presente invención. Se puede decir que como se muestra en las figs. 5 y 6, el nitrato en estos casos no penetra dentro del suelo, pero se desnitrifica, y así no produce contaminación. Esta tendencia también se observó para la hidrosfera; se encontró el efecto de reducir las concentraciones de iones nitrato, iones amonio y nitrógeno total en agua durante el tratamiento de aguas residuales.

25

6. Inducción de raíces laterales y expresión de transportadores de nitrato

Para *Brassica rapa* var. *perviridis*, que se denomina en Japón *komatsuna*, se mezclaron tierra negra y tierra roja a una relación de 8: 2 para preparar 300 g de una tierra experimental. A esta tierra se añadieron 200 ml de agua, y entonces
 30 la tierra se cubrió con lámina de aluminio y se dejó reposar en un sitio oscuro fresco durante 1 semana. Entonces se transfirió la tierra a una sala en la que entraba luz natural y se sembró con semillas, y después de eso se añadieron 100 ml de agua. Desde entonces, se añadió agua cada dos días. Para *Arabidopsis thaliana*, que se usó como planta modelo, se llevaron a cabo experimentos en tierra de cultivo KUREHA como tierra nutriente. Como se ha mencionado anteriormente, después de la vernalización se aplicó el tratamiento durante la noche a 4 °C, se llevó a cabo el cultivo
 35 durante 21 días en una sala de temperatura controlada (a 23 °C) en condiciones de 24 horas de luz a una iluminancia de 10.000 lux, añadiéndose una cierta cantidad de agua de manera que la tierra no llegara a secarse.

Como se muestra en la fig. 5, los experimentos usando *Brassica rapa* var. *perviridis* produjeron 20 % o más de aumento en las raíces generadas. Esta tendencia también se observó en cualquiera de las verduras de hoja, cultivos de raíz,
 40 verduras de fruto y árboles frutales.

A continuación, se usó *Arabidopsis thaliana* como una planta modelo, y se llevaron a cabo experimentos en tierra de cultivo KUREHA (tierra superficial de una profundidad inferior a 3 cm) como tierra nutriente. En resumen, después de la vernalización se aplicó el tratamiento durante 48 horas a 4 °C, se llevó a cabo el cultivo durante 21 días en una sala
 45 de temperatura controlada (a 23 °C) en condiciones de 24 horas de luz a una iluminancia de 10.000 lux, reteniendo una cierta cantidad de agua.

Tabla 3 Genes altamente expresados en *Arabidopsis thaliana* - parte 1

Genbank	Descripción común	Regulación
At5g52640/At1g74310	Familia de proteínas de choque térmico	incremento
At5g02490/At3g09440		
At4g15440	HPL1 (HIDROPERÓXIDO LIASA 1)	incremento
At5g59320/At3g22600	Proteína relacionada con LTP (PROTEÍNA DE TRANSFERENCIA DE LÍPIDOS)	incremento
At1g52770	Proteína de la familia NPH3 sensible a fototropismo	incremento
At1g73325	Proteína de la familia de inhibidores de tripsina y de proteasa / Proteína de la familia de Kunitz	incremento
At2g17500	Proteína de la familia transportadora de la salida de auxina	incremento
At2g04240/At5g17600	Gen RING-H2, XERICO	incremento

50

Tabla 4 Genes altamente expresados en *Arabidopsis thaliana* - parte 2

Genbank	Descripción común	Regulación
AF325030	Proteína de la familia de glutaredoxina	incremento
AK176211/BT012184	Glutación S-transferasa	incremento
At5g02490/AY128296	Familia relacionada con la proteína de choque térmico	incremento
AY054183/At5g02490		
AY087779	Oxidoreductasa	incremento
AF419593	Proteína de la familia nodulina	incremento
AY078973	Proteína asociada a la senescencia (SEN1)	incremento
AY057661	Proteína de la familia de unión de hemo SOUL	incremento
AF386952	Proteína de la familia de unión a GTP relacionada con Ras	incremento
AK118884/AF426252	Factor de transcripción de la familia WRKY	incremento
AY091154/AY088908		
AK117967	Citocromo P450 71B15, putativo	incremento
AF426253	Proteína de la familia aspartil proteasa	incremento

La tabla 3 indica un grupo de genes que son altamente expresados por medio del material microbiano para usos agrícolas según la presente invención cuando *Arabidopsis thaliana* se cultiva usando la tierra de una profundidad de 5 cm. La tabla 4 indica un grupo de genes que son altamente expresados por medio del material funcional según la presente invención cuando *Arabidopsis thaliana* se cultiva usando la tierra de una profundidad inferior a 3 cm.

Se extrajeron ARNm en partes de raíz y tallo y se analizaron por RT-PCR. De los resultados, se encontró que la cantidad de expresión de NRT2.1, un transportador de nitrato, tendió a aumentar 2 veces o más (fig. 6). También se encontró que la expresión de NRT2.6 tendió a aumentar. Además, como se muestra en la tabla 3, se puede decir que la cantidad de expresión de genes relacionados con auxina aumenta significativamente. Además, como se muestra en la tabla 4, también sería importante que se expresara una proteína de tipo nodulina. Recientemente, se ha sugerido que la nodulina contribuye a la formación de raíces por flagelina, que es un componente extracelular (Planta 234: 459-476, 2011).

Como se ha descrito anteriormente, el uso según la presente invención del material funcional provoca la promoción y la inducción de enraizamiento, así como tiene un efecto de potenciar la expresión del transportador de nitrato y los genes relacionados con auxina en los pelos de la raíz. Además, se supone que el material funcional da lugar a un aumento en la fotosensibilidad, debido a que como se muestra en la tabla 3, también se expresa fuertemente un gen regulador del fototropismo, que codifica una proteína de la familia NPH3 sensible al fototropismo. Estos factores combinados permitirían que las plantas absorbieran eficientemente los nutrientes en la tierra incluso cuando la tierra contuviera pequeñas cantidades de componentes de fertilizante e hicieran posible promover el crecimiento de plantas. Los efectos de promoción del crecimiento de plantas implican no solo funciones de estos genes, sino también una especie estrechamente relacionada con *Bacillus graminis* que es difícil de cultivar y es una especie bacteriana que está contenida en la población de microorganismos designada inóculo de termófilos MIROKU M2K. *Bacillus graminis* es un endofito microbiano que vive en simbiosis con las plantas, y así se supone que contribuye probablemente a la promoción del crecimiento de las plantas.

3. Evaluación de la capacidad para inhibir la generación de un gas causante del efecto invernadero, monóxido de dinitrógeno

Se usó *Arabidopsis thaliana* como planta modelo, y se llevaron a cabo experimentos en tierra de cultivo KUREHA (tierra superficial de una profundidad de 5 cm) como tierra nutriente. En resumen, después de la vernalización se aplicó el tratamiento durante la noche a 4 °C, se llevó a cabo el cultivo durante 21 días en una sala de temperatura controlada (a 23 °C) en condiciones de 24 horas de luz a una iluminancia de 10.000 lux, añadiéndose 100 ml de agua cada dos días.

Como se muestra en la fig. 6, también bajo una atmósfera que contiene acetileno, la tierra al que se había añadido al material microbiano para usos agrícolas según la presente invención produjo una gran disminución en la concentración de iones nitrato en la tierra, mientras que la tierra sin adición fue difícil reducir la concentración de iones nitrato en la tierra. Puesto que el acetileno inhibe la reacción de N₂O en N₂, se puede usar su reacción inhibidora para detectar N₂O por cromatografía de gases. Por consiguiente, en el caso de una tierra donde se genera N₂O, también se detectará N₂O bajo una atmósfera en la que no se mezcla el acetileno; en el caso de una tierra donde se genera N₂, el N₂O se puede detectar solo bajo una atmósfera en la que se mezcla acetileno. Como se muestra en la fig. 7, la tierra a la que se había añadido el material microbiano para usos agrícolas según la presente invención no permitió la detección de N₂O en condiciones de la tierra que no se había sometido a bloqueo de acetileno. Por otra parte, la tierra que se había sometido a bloqueo de acetileno permitió que se detectara N₂O. Por tanto, resultó que esta tierra tenía una propiedad de emitir preferencialmente N₂. A partir de esto, se puede decir que los iones nitrato en la tierra se desnitrifican como gas N₂.

Para buscar genes que promueven estas reacciones, se realizó detección de PCR de dichos genes, por ejemplo, como referencia a las primeras secuencias descritas en Throbäck IN et al. (2004) Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. FEMS Microbiol. Ecol. 49:401-417, que se usó como referencia. Los cebadores para NirK usaron las secuencias de 5'-GGCGGCGCGCCGCCCCGCCCCGCCCCGTCGCCGCTCGATCAGATTGTGGTT-3' como cebador directo y 5'-ATCATGGTCCTGCCGCG-3' como cebador inverso. Los cebadores para NirS usaron las secuencias de 5'-GGCGGCGCGCCGCCCCGCCCCGCCCCGTCGCCGCTCGATCAGATTGTGGTT-3' como cebador directo y 5'-GTCAACGTCAAGGAAACCGG-3' como cebador inverso. Los cebadores para NosZ usaron, por ejemplo, las secuencias de 5'-TGGGGNGAYNTBCAYCA-3' como cebador directo y 5'-GARCARAAGTTIGTRCART-3' como cebador inverso. Las referencias usadas fueron Scala DJ y Kerkhof LJ (1998) Nitrous oxide reductase (nosZ) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three nosZ genes from marine sediments. FEMS Microbiology Letters 162:61-68; y Jones, C.M., Welsh, A., Throbäck, I.N., Dörsch, P., Bakken F.R., Hallin, S. (2011) Phenotypic and genotypic heterogeneity among closely related soil-borne N₂- and N₂O-producing *Bacillus* isolates harboring the nosZ gene. FEMS Microbiol. Ecol. 76: 541-552. Los resultados de PCR revelaron que era probable que funcionaran los genes de los que las secuencias se relacionan estrechamente con secuencias de genes que codifican las enzimas de desnitrificación derivadas del género *Bradyrhizobium*, *Herbaspirillum* y *Mesorhizobium*.

Tabla 5 Comparación de homologías de secuencia entre genes de desnitrificación derivados del material microbiano para usos agrícolas según el método de producción de la presente invención

Nº	Nº de depósito	Especies estrechamente relacionadas	Identidad (%)
S-1	AB686171	<i>Bradyrhizobium</i> sp. TSA44	84
S-2	AB686172	<i>Herbaspirillum</i> sp. TSO20-1	96
S-3	AB686170	<i>Mesorhizobium</i> sp. TSA41b	97

La tabla 5 indica la homología entre genes asociados a la desnitrificación incluidos en el material microbiano para usos agrícolas según la presente invención y los genes de desnitrificación en algunas cepas estándar.

4. Evaluación de la fijación de nitrógeno

Se usó *Arabidopsis thaliana* como una planta modelo, y se llevaron a cabo experimentos en tierra de cultivo KUREHA (tierra superficial de una profundidad de 5 cm) como tierra nutritiva. En resumen, después de la vernalización se aplicó el tratamiento durante la noche a 4 °C, se llevó a cabo el cultivo durante 21 días en una sala de temperatura controlada (a 23 °C) en condiciones de 24 horas de luz a una iluminancia de 10.000 lux, añadiéndose 100 ml de agua cada dos días. Se reguló el grado de sequedad de la tierra (disminución en el contenido de agua) extendiendo el intervalo de tiempo de adición de agua durante algunos días.

Como se muestra en la fig. 8, tendió a aumentar la concentración de iones amonio dentro del cuerpo de *Arabidopsis thaliana*. Puesto que la concentración de nitrato dentro del cuerpo de las plantas es extremadamente baja y la actividad de las enzimas reductoras de nitrato es baja, se espera que los iones amonio sean de fuentes distintas de nitrato y se produzcan por microorganismos. A este respecto, se conoce que la fijación por nitrógeno por microorganismos es catalizada por un complejo de nitrogenasa, que incluye dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa como sus factores. Además, la dinitrogenasa reductasa se reduce por donantes de electrones tales como ferredoxina y flavodoxina, dando como resultado la formación de iones amonio.

Basándose en estos, se usaron cebadores capaces de amplificación de *nifH*, que es un gen para dinitrogenasa reductasa, para investigar la causa de los elevados iones amonio. Los cebadores para *nifH* usados, por ejemplo, las secuencias de 5'-TGCGACCCGAAAGCCGACTC-3' como cebador directo y 5'-ATGGCCATCATCTCACCAGGA-3' como cebador inverso, para buscar el gen *nifH*, como referencia a Widmer F, Shaffer BT, Porteous LA y Seidler RJ (1999) Analysis of nifH Gene Pool Complexity in Soil and Litter at a Douglas Fir Forest Site in the Oregon Cascade Mountain Range. Appl Environ Microbiol 65: 374-380, y Poly, F., Monrozier, L.J., Bally, R. (2001) Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. Res. Microbiol. 152: 95-103.

De las bacterias contenidas en el material microbiano para usos agrícolas según la presente invención, se aislaron especies bacterianas que eran capaces de crecer en un medio libre de nitrógeno que contenía ácido succínico que servía de donante de electrones. Como resultado, entre estas especies bacterianas estaban especies de los géneros *Lysinibacillus* y *Peanibacillus*, que son especies estrechamente relacionadas con IP-23, y IP-60 y 75 contenidas en la población de microorganismos designada NITEBP-1051. Además, como se muestra en las tablas 6 y 7, se incluyeron la cepa 36W de *Bacillus* sp., que es una especie estrechamente relacionada con *Bacillus pumilus* y *Bacillus safensis*, y la cepa 123 de *Brevibacillus* sp., que es una especie estrechamente relacionada con *Brevibacillus choshinensis* y *B.*

- brevis*, evaluando a partir de los resultados del análisis BLAST de secuencias de ADNr 16S. Aunque estas últimas fueron identificables usando los cebadores anteriormente descritos, también se incluyeron cepas que no se pueden identificar usando estos cebadores. Para cualquiera de estas cepas, su secuencia de bases no fue completamente idéntica a la de la cepa estándar, y se consideró que la cepa era una nueva especie o subespecie. También se sugirió
- 5 que estas cepas presentaron su capacidad para la fijación de nitrógeno de una forma sinérgica como forma de una población de bacterias de múltiples especies. A este respecto, la población de microorganismos designada NP-1051 incluye una especie estrechamente relacionada con *Bacillus badius*, que se conoce por tener un grupo de genes implicados en el metabolismo del nitrógeno y se espera que desempeñe cierta función por su co-existencia. Además,
- 10 como se muestra en la tabla 3, la cantidad de expresión de la proteína asociada a la senescencia (SEN1) es elevada en plantas que han crecido en la tierra que tiene el material microbiano para usos agrícolas según la presente invención añadido a la misma, y es interesante que se haya informado recientemente que SEN1 es un factor necesario para las bacterias de fijación de nitrógeno que viven en simbiosis con las plantas (Plant Cell Physiol 2011, en prensa, <http://pcp.oxfordjournals.org/content/early/2011/11/28/pcp.pcr167.long>).
- 15 Además, *Paenibacillus sp.*, que es un microorganismo funcional en el producto de fermentación de alta temperatura, tiene una capacidad de vivir en simbiosis con plantas como bacteria simbiótica en plantas. *Paenibacillus sp.* se incluye en la población de microorganismos designada NITE BP-1051 que se ha depositado internacionalmente. Para estas bacterias termófilas simbióticas en plantas, se determinó que sus secuencias de bases de ARNr 16S construían un árbol filogenético. Como se muestra en la fig. 12, *Paenibacillus sp.* es similar a *Paenibacillus amylolyticus* y
- 20 *Paenibacillus barcinonensis* y se encontró que era una bacteria termófila capaz de crecer también a 50 °C. Las plantas a las que se ha aplicado el producto de fermentación a alta temperatura tienen estas cepas que viven en simbiosis con ellas y, por tanto, se supone que la promoción de la expresión de genes relacionados con la promoción y regulación del crecimiento de plantas y con la biofilaxis de plantas, y efectos contra los daños a plantas por nematodos como pequeños organismos implican *Paenibacillus sp.* contenido en la población de microorganismos designada BP-1051
- 25 y en el producto de fermentación.

Tabla 6: Una bacteria de fijación de nitrógeno incluida en la población de microorganismos designada inóculo de termófilos MIROKU M2K

- 30 Cepa 36W de *Bacillus sp.* (una especie estrechamente relacionada con *Bacillus pumilus* y *Bacillus safensis*)

GACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA
CACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGA
GCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACG
GTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT
GGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC
CGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGA
AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTT
AAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAA
CTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCT
CTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGTGTTAG
GGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTG
GGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTT
ACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTC
GGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTTCGTCAGCTCGTGTTCGTG
AGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGC
CAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAG
GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTAC
ACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCAAGACCGCAAGGTTT
AGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCG
ACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT
GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTT
TGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGA
AGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGAAGTCGTACAAAGGTAGCCCA

Tabla 7: Una bacteria de fijación de nitrógeno incluida en la población de microorganismos designada inóculo de termófilos MIROKU M2K

5

Cepa 123 de *Brevibacillus* sp. (una especie estrechamente relacionada con *Brevibacillus choshinensis* y *Brevibacillus brevis*)

CTGCCGGCGTGCCTATACTGCAAGTCGAGCGAGTCTCTTCGGAGGCTA
 GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGG
 ATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATCGCATG
 ATCCAAAAAGAAAAGGCGGCTTTAAGCTGTCACTGGGAGATGGGCCTG
 CGGCGCATTACCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACAATGC
 GTACCCGACCTGAAAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAAACACGGC
 CCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCCACAATGGACGA
 AAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATTGT
 AAAGTTCTGTTGTTAGGGACAAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTAC
 CTTGACGGTACCTGACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCACCAGC
 CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAA
 GCGCGCGCAGGCGGCTATGTAAGTCTGGTGTAAAGCCCGGAGCTCAA
 CTCCGGTTTCGCATCGGAAACTGTGTAGCTTGAGTGCAAAAGAGGAAAG
 CGGTATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACAC
 CAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAA
 AGCTGTGGTGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGCTAGTCCACGCCGTA
 AACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGTTTCATACCTCAATTGCCGCAG

La tabla 6 muestra la secuencia de ADNr 16S de una bacteria de fijación de nitrógeno, la cepa 36W de *Bacillus* sp.

5 La tabla 7 muestra la secuencia de ADNr 16S de una bacteria de fijación de nitrógeno, la cepa 123 de *Brevibacillus* sp.

7. Evaluación de las funciones de regulación de las concentraciones de aminoácidos

- 10 Se usó *Arabidopsis thaliana* as una planta modelo, y se llevaron a cabo experimentos en tierra de cultivo KUREHA (tierra superficial de una profundidad de 5 cm) como tierra nutritiva. En resumen, después de la vernalización se aplicó el tratamiento durante la noche a 4 °C, se llevó a cabo el cultivo durante 21 días en una sala de temperatura controlada (a 23 °C) en condiciones de 24 horas de luz a una iluminancia de 10.000 lux, añadiéndose 100 ml de agua cada dos días. Se reguló el grado de sequedad de la tierra (disminución en el contenido de agua) extendiendo el intervalo de
 15 tiempo de adición de agua durante algunos días.

- Como se muestra en la fig. 10, las concentraciones de ácido glutámico y glutamina dentro del cuerpo de *Arabidopsis thaliana* fueron significativamente elevadas en el grupo en el que se había añadido el material microbiano para usos agrícolas según la presente invención a la tierra. Se observó la tendencia de que la arginina, que se somete a
 20 degradación en ácido glutámico, era sorprendentemente elevada. Se produce ácido glutámico a partir de un ion amonio y, por tanto, también resultó que el resultado mostrado en la fig. 9 no está según aquellos en la fig. 10. En general, el ácido glutámico derivado de planta no solo participa en el sabor de los cultivos, sino que también es un aminoácido de importancia crítica, por ejemplo, en la expresión de cada enzima antioxidación. Por tanto, se puede decir que el material microbiano para usos agrícolas según la presente invención contribuye a la calidad de las plantas y a una
 25 mejora en su funcionalidad. A este respecto, también se conoce que la nodulina, un gen fuertemente expresado en la tabla 4, contribuye a la función de síntesis de glutamina (Planta 234: 459-476, 2011), y no está según los resultados de los ejemplos según la presente invención.

- Cuando el contenido de agua en la tierra de cultivo disminuyó 10 %, se observó la tendencia de que la prolina era
 30 sorprendentemente elevada en el grupo en el que se había añadido el material según la presente invención a la tierra, como se muestra en la fig. 11. La prolina dentro del cuerpo de las plantas se produce a partir de ácido glutámico, por ejemplo, mediante la reacción con P5C reductasa (pirrolin-5-carboxilato reductasa) y se transforma como ácido glutámico, por ejemplo, mediante la reacción con prolina oxidasa, durante la sequedad, mientras que la expresión de prolina oxidasa se eleva 2 veces o más en condiciones de alto contenido de agua. Por tanto, el resultado para la
 35 prolina mostrado en la fig. 11 no tuvo inconsistencia en la relación con la concentración de ácido glutámico. A este

respecto, se conoce generalmente que la prolina es un aminoácido implicado en la resistencia a la sequedad y la retención de humedad, y similares. Por tanto, se puede decir que el uso agrícola según la presente invención contribuye a una mejora en la funcionalidad de las plantas también desde estos puntos de vista.

5 8. Expresión de genes resistentes a trastorno por alta temperatura y genes sensibles resistentes a enfermedad

Puesto que el entorno de crecimiento de una planta varía en la naturaleza, se cultivó una planta modelo *Arabidopsis thaliana* en diferentes condiciones de cultivo para analizar el patrón del gen expresado. Se usó *Arabidopsis thaliana* como planta modelo, y se llevaron a cabo experimentos en tierra de cultivo KUREHA como tierra nutritiva. La tabla 3 indica los resultados obtenidos de los experimentos que se habían llevado a cabo usando una tierra superficial de una profundidad de 5 cm. Después de la vernalización se aplicó el tratamiento durante la noche a 4 °C, se llevó a cabo el cultivo durante 21 días en una sala de temperatura controlada (a 23 °C) en condiciones de 24 horas de luz a una iluminancia de 10.000 lux, añadiéndose 100 ml de agua cada dos días. La tabla 4 indica los resultados obtenidos de los experimentos que se habían llevado a cabo usando una tierra superficial de una profundidad inferior a 3 cm. Después de la vernalización se aplicó el tratamiento durante la noche a 4 °C, se llevó a cabo el cultivo durante 21 días en una sala de temperatura controlada (a 23 °C) en condiciones de 24 horas de luz a una iluminancia de 10.000 lux, añadiéndose una cierta cantidad de agua de manera que la tierra no llegara a secarse. En estas condiciones, se llevó a cabo el análisis de micromatrices de ADN (un método similar al descrito en la solicitud PCT previa) para el cribado global de genes fuertemente expresados en la planta modelo.

Las tablas 3 y 4 muestran un grupo de genes ubicuamente y fuertemente expresados en *Arabidopsis thaliana* que se cultivaron en la tierra a la que se había añadido el material microbiano para usos agrícolas según la presente invención. Especialmente, se observó la expresión de proteínas de choque térmico (HSPs), que son chaperonas moleculares. Con respecto a HSPs, aumentaron las cantidades de expresión de la familia HSP70, familia HSP90, familia HSP101, y otras.

Con respecto a HSPs, entre los genes de los que varían las cantidades de expresión, cualquiera de las HSPs es un factor que contribuye a las funciones de resistencia contra estrés de alta temperatura y diversos estreses medioambientales (Trends Plant Sci 9: 244-252, 2004; Science 330: 1820-1824, 2010; Plant Cell, Vol. 12, 457-460, 2000). Además, el gen RING-H2, XERICO, participa en la regulación de la generación de una importante hormona de las plantas, el ácido abscísico, que funciona controlando el crecimiento, y la resistencia a la sequedad, resistencia a sales, y otras, de las plantas (Plant Journal 47: 343-355, 2006).

Con respecto a la resistencia a la sequedad, es interesante que, como se muestra en la fig. 11, varió el grado de aumento en la concentración de prolina cuando el cultivo se realizó en la tierra a la que se había añadido el material microbiano para usos agrícolas según la presente invención y luego se transfirió a condiciones donde el contenido de agua en la tierra disminuyó 10 %.

Además, como factores implicados en la biofilaxis, se conocen HSP70 y HSP90 como HSPs por contribuir a las funciones resistentes a la enfermedad junto con SGT1 y RAR1 (Plant Cell 19: 4061-4076, 2007; J Biol Chem 279: 2101-2108, 2004; EMBO J 27:2789-2798, 2008). También se conoce la nodulina por ser un gen implicado en las propiedades resistentes a la enfermedad (Olivares JE et al. (2011) Nodulin 41, a novel late nodulin of common bean with peptidase activity. BMC Plant Biol 10:134). La expresión de la proteína asociada a la senescencia (SEN1) está regulada por la señalización de ácido salicílico y ácido jasmónico, y se supone que SEN1 es un gen marcador relacionado con las propiedades resistentes a la enfermedad. A este respecto, el ácido salicílico es un factor implicado en la resistencia a diversos microorganismos patógenos tales como virus y bacterias; el ácido jasmónico actúa de forma antagonista con ácido salicílico, y por otra parte, se sabe que es un factor que induce resistencia a estrés medioambiental.

Como gen de resistencia a patógenos, se expresa fuertemente una FTP (PROTEÍNA DE TRANSFERENCIA DE LÍPIDOS) (Nature 419: 399-403, 2002). Se conoce la proteína de la familia del inhibidor de tripsina y de proteasa/de Kunitz por ser un gen que presenta resistencia a diversos patógenos (Molecular Plant 1: 482-495, 2008), y es un antagonista que antagoniza la muerte celular inducida por una micotoxina, fumonisina B1. Además, HPL1 (HIDROPERÓXIDO LIASA 1) es un factor que se conoce por detener las actividades de áfidos (Proc Natl Acad Sci USA 98: 8139-8144, 2001), y se encontró que daba como resultado la fuerte expresión de citocromo P450 71B15, putativo (CYP71B15), que biosintetiza fitoalexinas. P450 71B15 es una enzima de citocromo que se conoce por producir la fitoalexina camalexina (Plant Cell 8: 2235-2244, 1996). La camalexina se conoce por inhibir la propagación de hongos filamentosos patógenos y bacterias. Puesto que estas enzimas se inducen por estrés medioambiental y desencadenantes (Plant Cell 10: 359-370, 1998), se supone que el material microbiano para usos agrícolas según la presente invención provoca cambios en el entorno de la tierra y funciones como desencadenante.

Además, incluso una vez se infectan las plantas con patógenos, también se puede expresar fuertemente la aspartil proteasa, que se conoce por prevenir la muerte celular dentro del cuerpo de la planta (EMBO J. 2004 February 25;

23(4): 980-988; EMBO reports 6: 282-288).

Como se ha mencionado anteriormente, se induce la expresión de muchos genes relacionados con la biofilaxis; se puede decir que no existe incoherencia con la fuerte expresión de factores de transcripción de la familia WRKY, que se conocen por ser genes que pueden estar implicados en la regulación de la transcripción de estos genes (Plant Mol Biol, 51: 21-37, 2003). Además, la proteína de la familia glutaredoxina y el glutatión S-transferasa, que se muestran en la tabla 4, participan en las actividades antioxidación y, al mismo tiempo, tienen una tendencia a también aumentar las vitaminas C y E y, por tanto, se puede decir que mejoran dicha actividad de antioxidación dentro del cuerpo de la planta.

Las poblaciones de microorganismos designadas PTA-1773 e inóculo de termófilos M2K (cuyo depósito no fue aceptado) que se usan para estabilizar el material microbiano que contiene enzimas degradadoras de quitina y lipopéptidos altamente antifúngicamente activos, pueden disminuir principalmente la relación de presencia de hongos filamentosos en la tierra y el cuerpo de las plantas, o en la hidrosfera cuando el material microbiano se ha aplicado a un campo de ensayos.

Por tanto, cuando se ha usado el material microbiano para usos agrícolas según la presente invención, se puede lograr el control medioambiental tanto desde fuera como desde dentro del cuerpo de la planta debido a que el material disminuye la relación de presencia de hongos filamentosos patógenos como un entorno de crecimiento fuera del cuerpo de la planta, mientras que activa los genes relacionados con la biofilaxis dentro del cuerpo de la planta.

NÚMEROS DE DEPÓSITO

ATCC PTA-1773
NITE BP-1051

5

1-1	Número de párrafo	0012
1-3 1-3-1	Indicación Nombre de la institución depositaria	IPOD Incorporated Administrative Agency National Institute of Technology and

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Japan Eco-science Co., Ltd. (Nombre japonés: NIKKAN KAGAKU) National University Corporation Chiba University Miroku Co., Ltd. National University Corporation Kanazawa University Keiyo Plant Engineering Co., Ltd.

<120> Materiales microbianos para mejorar la contaminación del suelo y/o el agua y la funcionalidad de la planta con la supresión de la generación de gases del calentamiento global, y sus métodos de producción con el procedimiento de fermentación

15

<130> P12010601

<140> JP 2012-001621

20 <141> 06-01-2012

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

25

<210> 1

<211> 53

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo para detectar ARNm de NirK

35

<400> 1

ggcggcgcgc cgcccgcccc gcccccgtcg cccgcctcga tcagattgtg gtt 53

40 <210> 2

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Cebador inverso para detectar ARNm de NirK

<400> 2

atcatggtcc tgccgcg 17

50

<210> 3

<211> 52

<212> ADN

55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo para detectar ARNm de NirS

<400> 3
 5 ggcggcgcgcg cgcccgcccc gcccccgcgc cccgacttcg gatgcgtctt ga 52

<210> 4

10 <211> >20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> Cebador inverso para detectar ARNm de NirS

<400> 4
 20 gtcaacgtca aggaaaccgg 20

<210> 5
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador directo para detectar ARNm de NosZ

<220>
 30 <221> misc_feature

<222> (6)..(6)
 <223> n is a, c, g o t

35 <220>
 <221> misc_feature

<222> (10)..(10)
 <223> n is a, c, g o t

40 <400> 5
 45 tggggngayn tbcayca 17

<210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Cebador inverso para detectar ARNm de NosZ

<400> 6

55 garcaraagt tgtrcarta 19

<210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo para detectar ARNm de NifH

<400> 7

5

tgcgacccga aagccgactc 20

<210> 8

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso para detectar ARNm de NifH

15

<400> 8

atggccatca tctcaccgga 20

20 <210> 9

<211> 1449

<212> ADN

<213> Desconocido

25 <220>

<223> Especies relacionadas de Bacillus pumilus o Bacillus safensis

<400> 9

gacagaaggg agcttgctcc cggatgttag cggcggacgg gtgagtaaca cgtgggtaac 60
 ctgcctgtaa gactgggata actccgggaa accggagcta ataccgata gttccttgaa 120
 ccgcatgggt caaggatgaa agacggtttc ggctgtcact tacagatgga cccgcggcgc 180
 attagctagt tgggtgggta atggctcacc aaggcgacga tgcgtagccg acctgagagg 240
 gtgatcggcc aactgggac tgagacacgg cccagactcc tacgggaggg agcagtaggg 300
 aatcttccgc aatggacgaa agtctgacgg agcaacgccg cgtgagtgat gaaggttttc 360
 ggatcgtaaa gctctgttgt tagggaagaa caagtgcgag agtaactgct cgcaccttga 420
 cggtagctaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt 480
 ggcaagcgtt gtccggaatt attgggcgta aagggtcgc aggcggtttc ttaagtctga 540
 tgtgaaagcc cccggctcaa cgggggaggg tcattggaaa ctgggaaact tgagtgcaga 600
 agaggagagt ggaattccac gtgtagcggg gaaatgcgta gagatgtgga ggaacaccag 660
 tggcgaaggc gactctctgg tctgtaactg acgctgagga gcgaaagcgt ggggagcgaa 720
 caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgatga gtgctagtgt taggggtttc 780
 cggcccttag tgctgcagct aacgcattaa gcactccgcc tggggagtag ggtcgcaaga 840
 ctgaaactca aaggaattga cgggggccc cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg 900
 aagcaacgcg aagaacctta ccaggtcttg acatcctctg acaaccctag agatagggct 960
 ttcccttcgg ggacagagtg acaggtggtg catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat 1020
 gttgggttaa gtcccgcaac gagcgcaacc cttgatctta gttgccagca ttcagttggg 1080
 cactctaagg tgactgccgg tgacaaaccg gaggaagggt gggatgacgt caaatcatca 1140
 tgccccttat gacctgggct acacacgtgc tacaatggac agaacaagg gctgcaagac 1200
 cgcaagggtt agccaatccc ataaatctgt tctcagttcg gatcgagtc tgcaactcga 1260
 ctgcgtgaag ctggaatcgc tagtaatcgc ggatcagcat gccgcgggtga atacgttccc 1320
 gggccttgta cacaccgccc gtcacaccac gagagtttgc aacacccgaa gtcggtgagg 1380
 taacctttat ggagccagcc gccgaagggt gggcagatga ttggggtgaa gtcgtacaaa 1440
 ggtagccca 1449

<210> 10

<211> 820

5 <212> ADN

<213> Desconocido

<220>

<223> Especies relacionadas de *Brevibacillus choshinensis* o *Brevibacillus brevis*

10

<400> 10

ctgccggcgt gcctatactg caagtcgagc gagtctcttc ggaggctagc ggcggacggg	60
tgagtaacac gtaggcaacc tgcctctcag actgggataa catagggaaa cttatgctaa	120
taccggatag gtttttggat cgcctgatcc aaaaagaaaa ggcggcttta agctgtcact	180
gggagatggg cctgcggcgc attacctagt tgggtgggta atggcctacc aaggcgacaa	240
tgcgtacccg acctgaaagg gtgaccggcc aactggggac tgaaacacgg cccaaactcc	300
tacgggaggg agcagtaggg aattttccac aatggacgaa agtctgatgg agcaacgcgg	360
cgtgaacgat gaaggctctc ggattgtaaa gttctgttgt tagggacaaa caagtaccgt	420
tcgaataggg cggtagcttg acggtacctg acgagaaagc cacggctaac tacgtgccac	480
cagccgcggg aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt tattgggcgt aaagcgcgcg	540
caggcggcta tgtaagtctg gtgttaaagc ccggagctca actccgggtc gcatcggaaa	600
ctgtgtagct tgagtgcaaa agaggaaagc ggtattccac gtgtagcggg gaaatgcgta	660
gagatgtgga ggaacaccag tggcgaaggc ggctttctgg tctgtaactg acgctgaggg	720
gcgaaagctg tgggtggagc aacaggatta gataccctgc tagtccacgc cgtaaaogat	780
gagtgcctagg tgttgggggt tcataacctc attgccgcag	820

REIVINDICACIONES

1. Un método para usos agrícolas de un material microbiano, donde el material microbiano se obtiene por un método que comprende
 - 5 una etapa de agitación de agitar un material de partida derivado de planta y un material de partida marino derivado de animal para obtener un material de partida de fermentación;
 - y una etapa de fermentación de someter el material de partida de fermentación obtenido por la etapa de agitación a
 - 10 fermentación usando microorganismos compuestos de 70 - 90 % en peso designados por el número de depósito PTA-1773 y 30 - 10 % en peso designados por el número de depósito NITE BP-1051.

FIG. 1 Representación conceptual

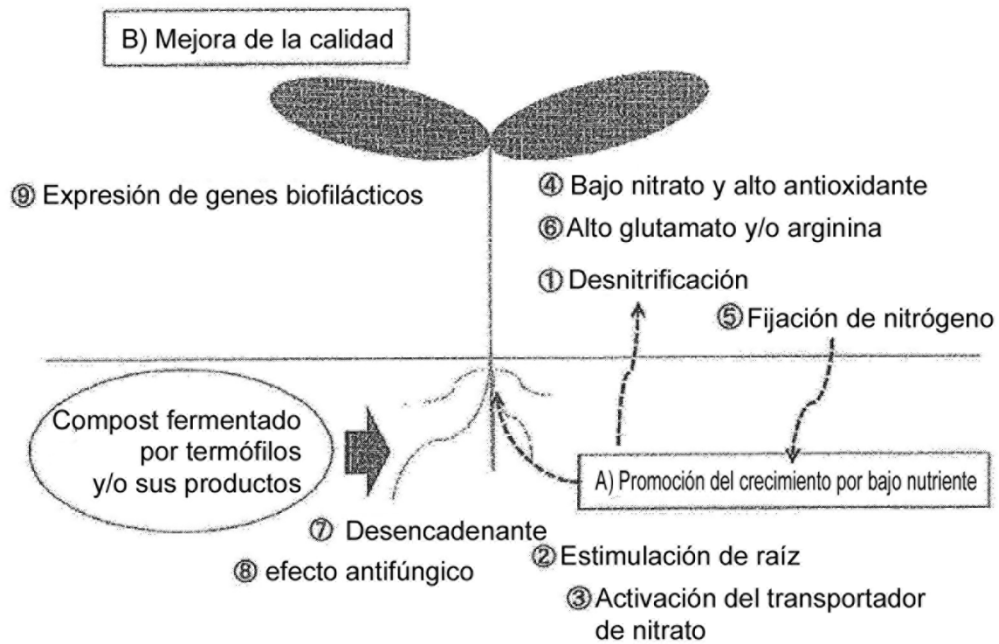


FIG. 2 Flora bacteriana (no aceptada en NITE)

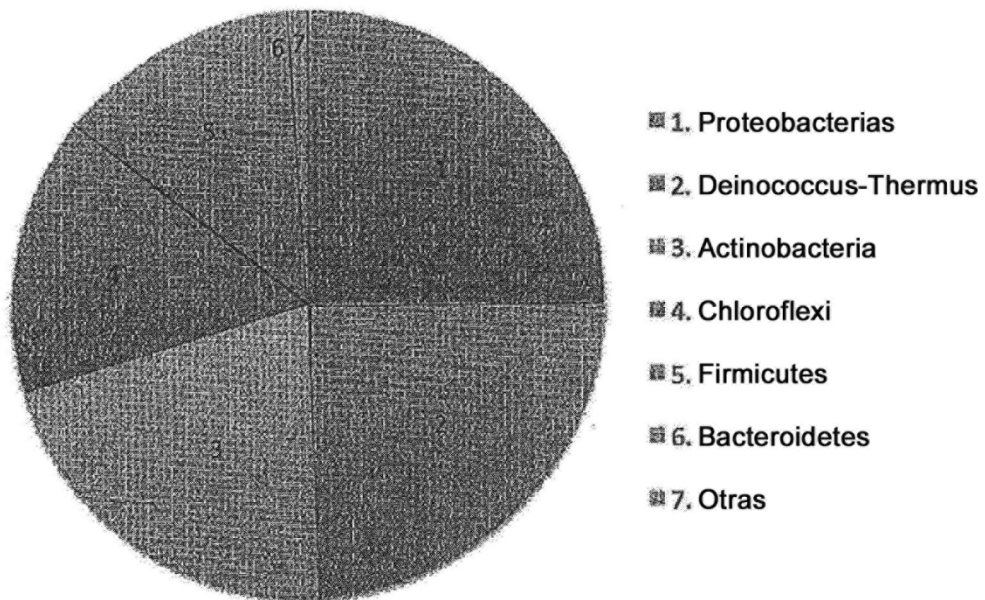


FIG. 3 Efecto de aumentar el nitrógeno del nitrato dentro del cuerpo de la planta (mejora de la calidad):

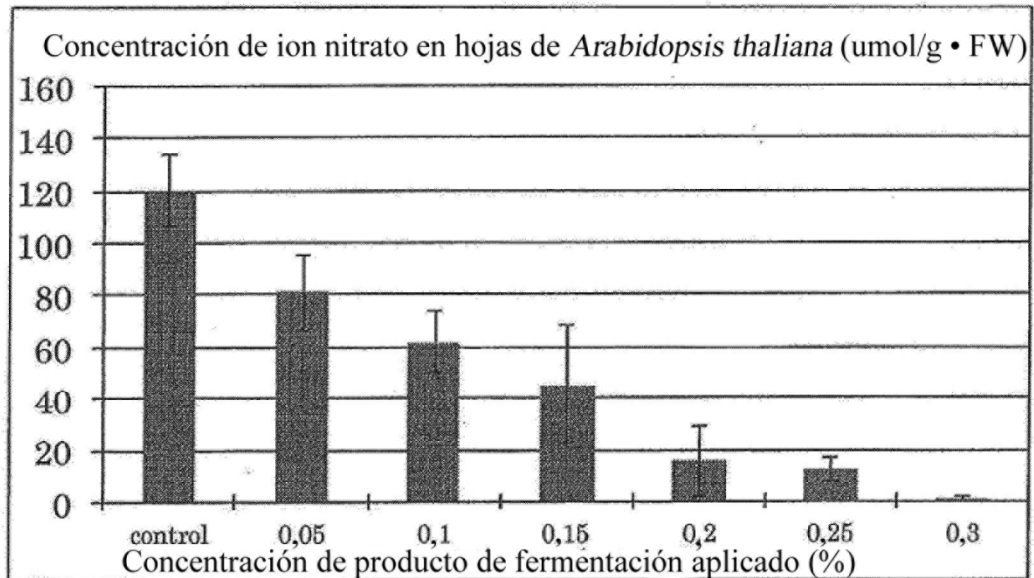


FIG. 4 Efecto de disminuir el nitrógeno del nitrato en la tierra (efecto de reducir la contaminación del agua subterránea):

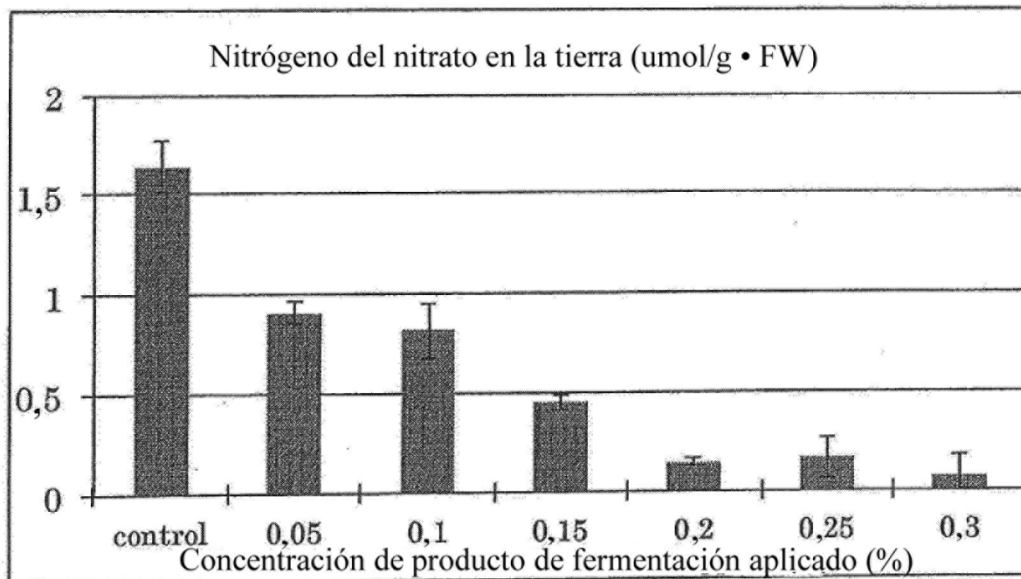


FIG. 5 Efecto sobre la longitud de las raíces de *Brassica rapa* var. *perviridis*:

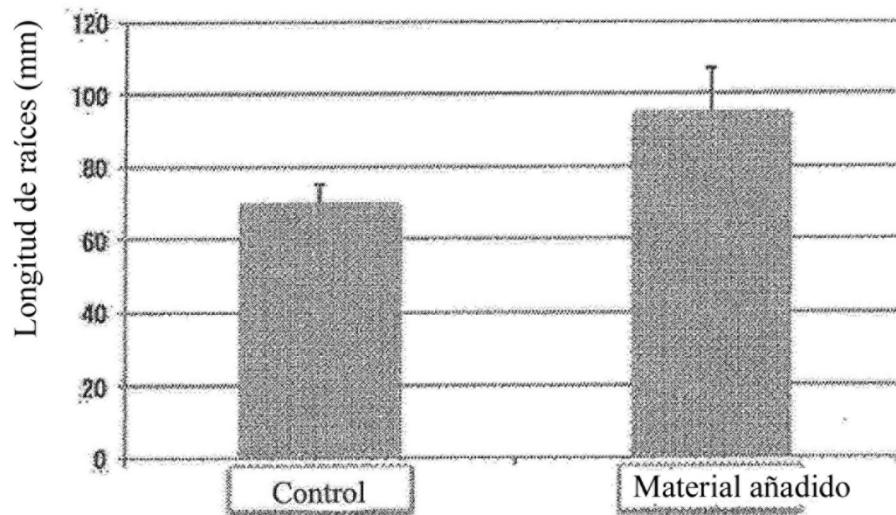


FIG. 6 Efecto sobre la expresión del transportador de nitrato:

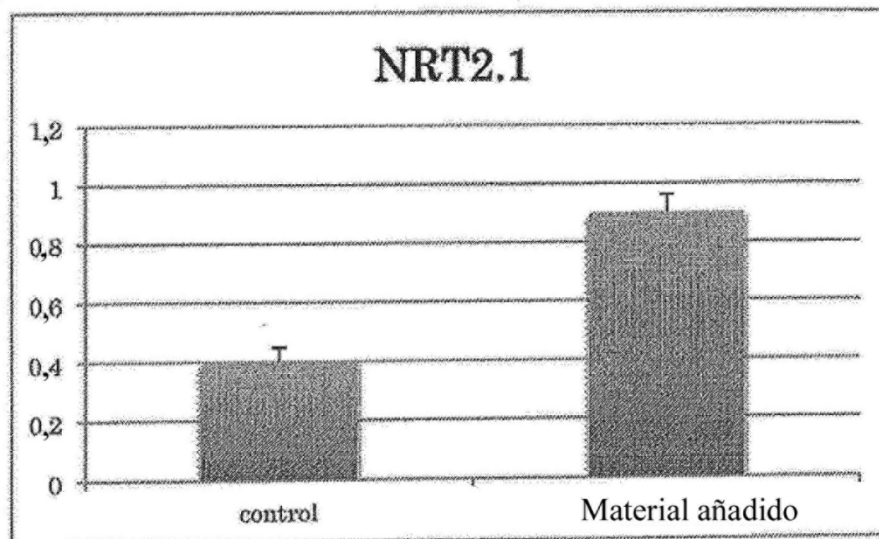


FIG. 7 .Concentración de nitrato en la tierra bajo bloqueo de acetileno:

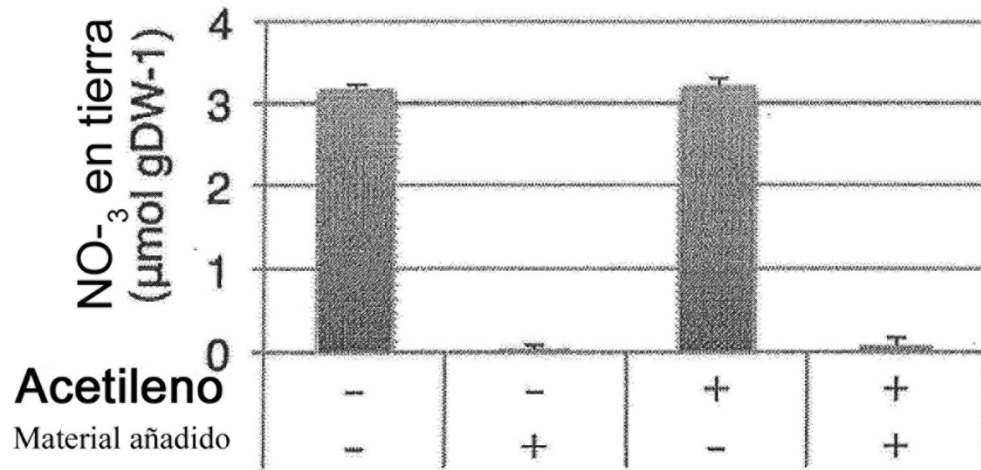


FIG. 8 Detección de N_2O bajo bloqueo de acetileno:

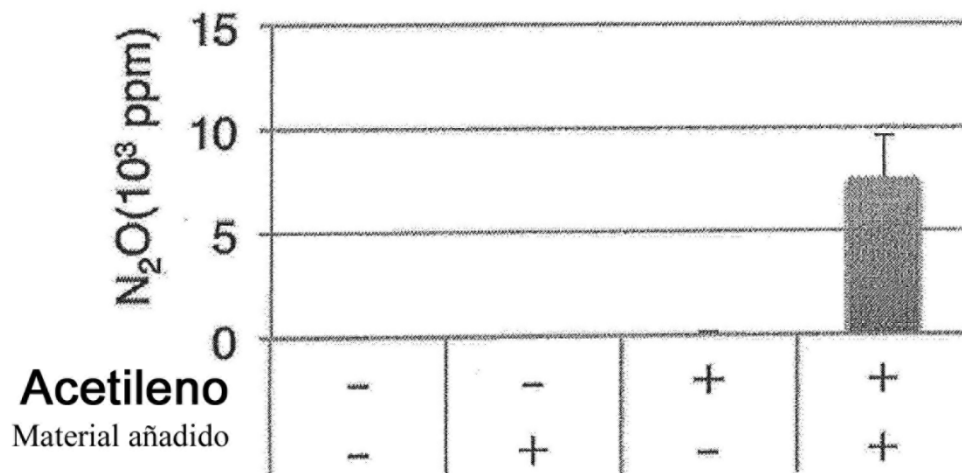


FIG. 9. Concentración de ion amonio en *Arabidopsis thaliana*:

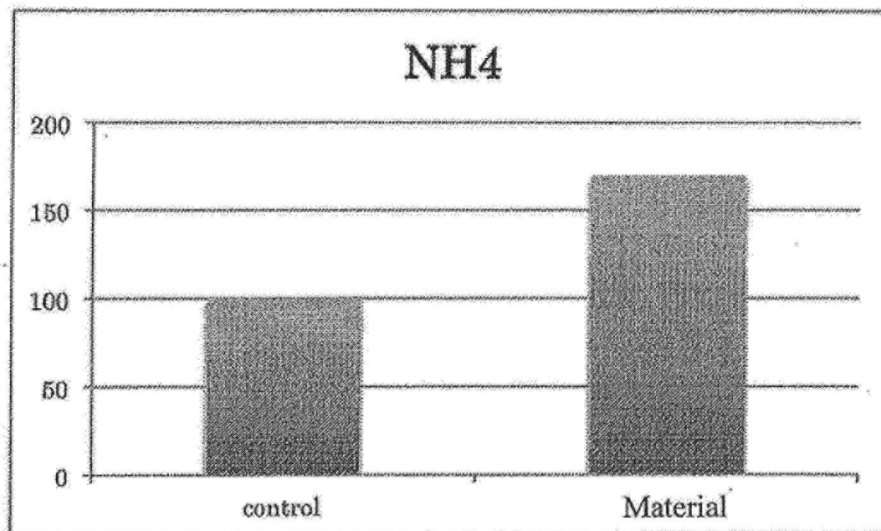


FIG. 10 Concentraciones de glutamina y ácido glutámico en *Arabidopsis thaliana*:

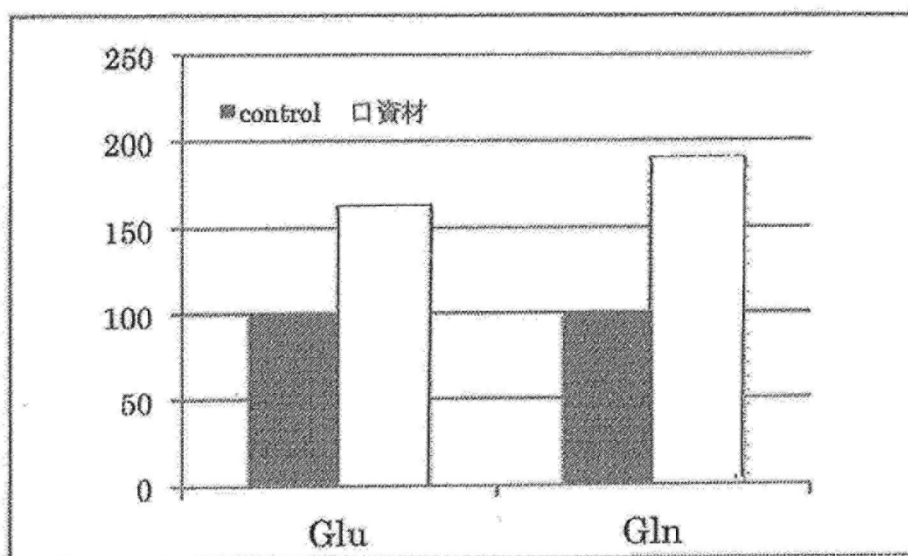


FIG. 11 Concentración de prolina en *Arabidopsis thaliana*.

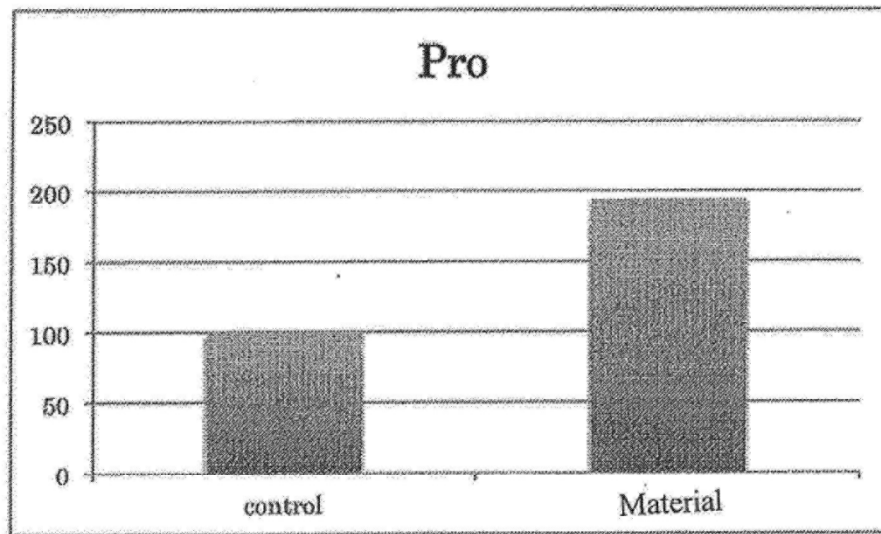


FIG.12

