



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-026622-00000-0000

Fecha: 2013-02-08 17:14:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

TITULO: COMPOSICIÓN NEMATOCIDA QUE COMPRENDE BACILLUS
SUBTILIS Y BACILLUS LICHENIFORMIS.

SOLICITANTE: Chr. Hansen A/S

DIRECCIÓN: Boege Alle 10-12, DK-2970 Hoersholm, Dinamarca

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 08 de febrero de 2013

P2013/000031



PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2013/000031

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: Chr. Hansen A/S

Dirección: Boege Alle 10-12, DK-2970
Hoersholm, Dinamarca

Nacionalidad o Domicilio: Danesa

Lugar de Constitución: Danesa

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2011/063685

Fecha Agosto 09, 2011

Publicación Internacional No. WO 2012/020014 A1

Fecha Febrero 16, 2012

6

Título (54) COMPOSICIÓN NEMATOCIDA QUE COMPRENDE BACILLUS SUBTILIS
Y BACILLUS LICHENIFORMIS.

Clasificación Internacional (51) A01N 63/00; C12N 1/20; C12R 1/125; C12R 1/10;
A01P 5/00.

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

EP

(32) Fecha

Agosto 10, 2010

(31) Número de Solicitud

10172373.2

9

Comprobante de pago No. 13-

Fecha _____

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones. Declaración bajo la Regla 4.17 (ii) del PCT.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☒

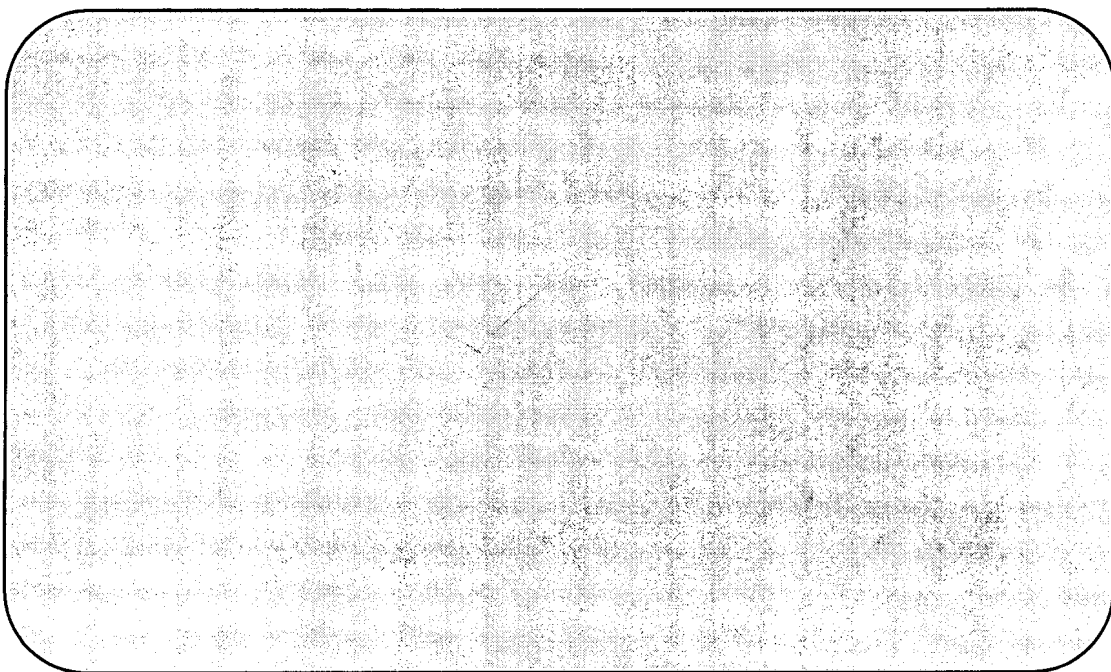
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/EP2011/063685

Abilio ALESSANDRI

Rua Antonieta, Flocco Costa 71,
Paulínia, 13140-000 Sao Paulo
Brasil
Nacionalidad: Brasileira

Inge KNAP

Graabynkevej 16,
DK-2700 Broenshoej
Dinamarca
Nacionalidad: Danesa

Luciana SEKITO DE FREITAS ZAMBELLI

Rua Rio Araguaia, 200
Terras de Santa Rosa II
Salto
13328-056 Sao Paulo
Brasil
Nacionalidad: Brasileira

2 / 2



Bogotá D.C., Febrero 01 de 2013 - 12:16:49

NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	181303253	30/01/2013	8.326.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES		
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsible:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-026622- -00000-0000

Fecha: 2013-02-08 17:14:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Febrero 1 de 2013 - 12:17:33

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español; tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen).
☐	Dibujos de ser estos pertinentes.
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-026622- -00000-0000

Fecha: 2013-02-08 17:14:21
Tra. 11 PATENTE IYI
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 4

PI02-F03 (2009-11-16)

100-303/12

P12/21

PODER

Chr. Hansen A/S, domiciliada en 10-12 Bøge Allé, 2970 Hørsholm, Dinamarca, representada por su apoderada **María Elena Cristina Pérez** (DNI 6.687.015), domiciliada en Av. del Libertador 5954, Ciudad de Buenos Aires, ARGENTINA,, confiere poder a **Carlos Reinaldo Olarte y/o Juan Guillermo Moure**, para que recaben ante las autoridades de COLOMBIA que correspondan, la obtención de sus patentes de invención, el registro y la renovación de sus marcas y modelos, a cuyo efecto los facultan para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes, formular descripciones, oposiciones, protestos, declaraciones, apelaciones y reclamos, oblar impuestos, justificar explotaciones, solicitar testimonios, aceptar transferencias, recibir documentos y valores, percibir y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades administrativas de cualquier orden. Por otra parte, les confiere mandato, para que en su nombre y representación puedan defender el nombre, las marcas, patentes y modelos, haciendo las protestas del caso. Al efecto podrán presentarse con escritos, pedidos y lo que fuere necesario, ante cualquier autoridad administrativa, presentar documentos y demás justificativos, comprometer en árbitros, hacer renunciaciones, prestar juramentos, desistir, percibir, otorgar recibos y en general practicar todos los actos y diligencias que sean precisos al desempeño de este mandato. Deseo sujetarme a Ley del Estado en que ha de ejercerse el mandato, dado que dicha Ley extranjera admite la forma adoptada.

Buenos Aires, 30 de Enero de 2013


María Elena Cristina PEREZ



(51) International Patent Classification:

A01N 63/00 (2006.01) *C12R 1/10* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01) *A01P 5/00* (2006.01)
C12R 1/125 (2006.01)

Graabynevej 16, DK-2700 Broenshoej (DK). **SEKITO DE FREITAS ZAMBELLI, Luciana** [BR/BR]; Rua Rio Araguaia, 200, Terras de Santa Rosa II, Salto, 13328-056 Sao Paulo (BR).

(21) International Application Number:

PCT/EP2011/063685

(22) International Filing Date:

9 August 2011 (09.08.2011)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

10172373.2 10 August 2010 (10.08.2010) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): **CHR. HANSEN A/S** [DK/DK]; Boege Alle 10-12, DK-2970 Hoersholm (DK).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **ALESSANDRI, Abilio** [BR/BR]; Rua Antonieta, Flocco Costa 71, Paulinia, 13140-000 Sao Paulo (BR). **KNAP, Inge** [DK/DK];

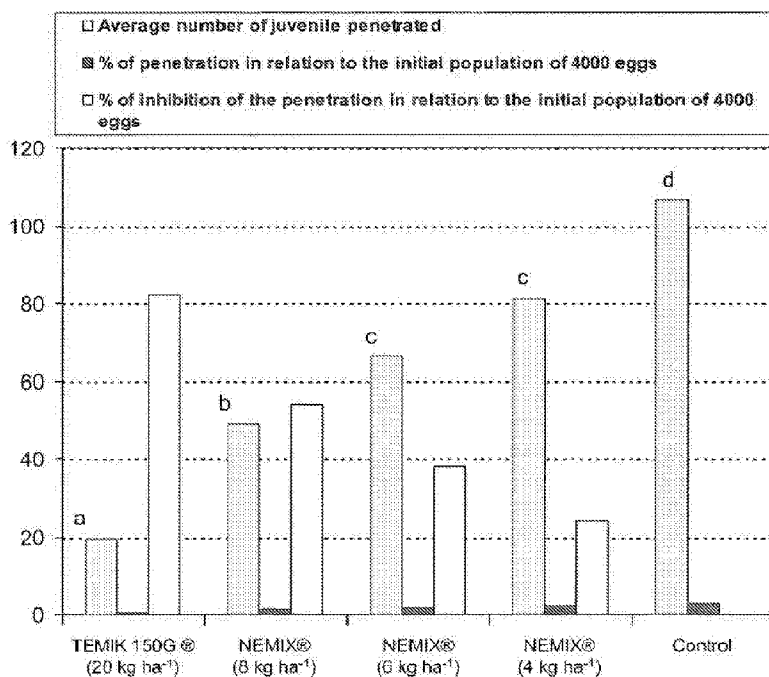
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,

[Continued on next page]

(54) Title: NEMATOCIDAL COMPOSITION COMPRISING BACILLUS SUBTILIS AND BACILLUS LICHENIFORMIS

FIGURE 4



(57) Abstract: The present invention refers to a composition comprising *Bacillus subtilis* (DSM 17231) and *Bacillus licheniformis* (DSM 17236) with nematicidal effect against phytonematodes on plants and/or its habitat, to its use and process for its preparation, use of *Bacillus subtilis* (DSM 17231) and *Bacillus licheniformis* (DSM 17236), processes for controlling, combating and conferring specific resistance to phytonematodes, and a kit.



LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:**Declarations under Rule 4.17:**

— *of inventorship (Rule 4.17(iv))*

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

NEMATOCIDAL COMPOSITION COMPRISING BACILLUS SUBTILIS AND BACILLUS LICHENIFORMIS

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a composition comprising *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* with nematicidal effect against phytonematodes on plants and/or its habitat, to its use, to a process for its preparation, to the use of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*, to processes for controlling, combating and/or conferring specific resistance to phytonematodes, and to a kit. Particularly, the invention relates to *Bacillus subtilis* (DSM 17231) and *Bacillus licheniformis* (DSM 17236).

FIELD OF THE INVENTION

Intensification of agricultural activity has caused an ecological imbalance, making it necessary for use of selective products that do not affect the balance between pests and their predators, parasitoids and pathogens, responsible for much of the natural biological control, since they retain pest population levels acceptable (DENT, D., Insect pest management. Cambridge: Cabi Bioscience 2000).

In order to reverse this situation, it is recommended to develop programs for integrated pest management, defined as a decision system for the use of control tactics, singly or combined harmoniously in a management strategy based on cost / benefit that take into account the interest and / or impact on farmers, society and environment. Among the control measures available for these management systems are entomopathogenic nematodes and insect parasitoids, which cover different areas of biological pest control.

In the current context of a modern and ecologic society, which is concerned with preserving the environment, biological control is considered an attractive alternative and/or supplement to conventional methods of control.

Biological control is the use of one organism (predator, parasite or pathogen) that attacks another organism which is causing economic damage to crops. This is a very common strategy in agro ecological systems, as well as in conventional agriculture which relies on the Integrated Pest Management (IPM).

5 Although the biological control brings positive responses in the reduction or withdrawal of pesticide use and improving farmers' income, the analysis of the set of experiments worldwide, shows that the results are still concentrated in only a few crops. There is still much to develop in areas of control of pests and diseases.

10 There has been a great emphasis on research on biological control with the use of bacteria colonizing the roots of plants, called rhizobacteria. The beneficial rhizobacteria for promoting growth and / or acting in the biological control of plant pathogenic bacteria are called plant growth-promoting rhizobacteria or PGPR. The PGPR increases the availability of nutrients to the
15 plant and can produce combinations and concentrations of substances that promote growth. However, the major effect of these rhizobacteria is to suppress plant pathogens deleterious to the growth of these plants. Inhibition of these harmful bacteria is through the production of siderophores, substances that act under conditions of low phosphorus availability by further reducing the
20 phosphorus available to other rhizosphere microorganisms or the production of antibiotics.

STATE OF THE ART

 The pressure of society to replace the nematicides with environmental
25 acceptable products or ecological techniques has encouraged the search for alternative methods to control nematodes. In this context, biological control has been considered one of the alternatives within an integrated approach, in which one seeks to ensure sustainable development of agriculture. The use of natural enemies has become a field of research, which may act to reduce nematode
30 populations below the threshold level of economic damage.

The risks to humans and environments presented by using synthetic pesticides emphasize the need for tools such as biological control in optimizing sustainable agricultural systems.

European patent application EP 0705807A1 relates to a bacterial
5 preparation for soil conditioning which comprises bacteria belonging to genus *Bacillus*, such as *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. The preparation can prevent the injuries to roots of crops caused by nematodes.

Brazilian patent application BR PI 0604602-9A relates to use of a
10 *Bacillus subtilis* in conjunction with *Bacillus licheniformes* for control of phyto-nematodes.

Siddiqui and Mahmood (1999) describe the role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes showing that *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* can be useful against phytonematodes, such as *Meloidogyne spp.*, *Heterodera spp.* and *Rotylenchulus*.

15 The inventors of the present invention have proceeded with extensive screening and research in order to solve the object of providing biological methods of controlling nematodes based on the identification of two wild-type *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* strains, which are particularly capable of reducing injuries to roots of crops caused by nematodes.

20

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 – Flow of the operating conditions of the manufacturing processes of mixing.

Figure 2 – Percentage of inhibition of movement of juveniles after effect of
25 biological products. A: *Meloidogyne incognita*; B: *M. javanica*, C: *M. paranaensis*.

Figure 3 – Percentage of inhibition of hatching after effect of biological products. A: *Meloidogyne incognita*; B: *M. javanica*, C: *M. paranaensis*.

Figure 4 – Average number of second stage juveniles of *Meloidogyne exigua* penetrated, percentages of penetration and inhibition of penetration in roots of tomato. 'Santa Cruz Kada Gigante', three weeks after inoculation.

5 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Rhizobacteria

The soils are home to a complex biological community, of which micro-organisms, prokaryotes and eukaryotes form a majority, both in number and in diversity. Some prokaryotes have ecological niches as the rhizosphere, and/or
10 the rhizoplane of plants, where they multiply, survive and protect themselves from the rest of the antagonistic action of soil microflora. These organisms have been generically called rhizobacteria.

In association with plants, rhizobacteria may have a deleterious effect, null or beneficial. Those who exercise a beneficial effect - growth promotion and
15 biological control of disease - are called PGPR ("Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). It is estimated that only 0.6 % of rhizobacteria have some beneficial effect for the plant with which they are associated.

PGPR as biocontrol agents

20 PGPR have been used for biological control of plant diseases and thereby increase the productivity of crops. How and why this biological control is exercised, is still a topic that needs complementary studies.

In some situations, it is possible that biological control occurs by direct antagonism exerted by PGPR against the pathogen, with involvement of the
25 known mechanisms of antibiosis: production of antimicrobial substances, direct parasitism, competition for nutrients and ecological niches. Research has shown that certain PGPR appear to act as elicitor of ISR (induced systemic resistance), in the sense that the plant becomes systemically

protected against more than one pathogen, unlike the classical biological control, which aims to implement the control more specifically.

When PGPR colonize the root system, the constituent molecules of the bacterial cell or synthesized by it act as elicitors of a biochemical signal. This signal is translocated to sites distant from the site of its origin. Genes coding for the synthesis of components of the dynamic resistance are disabled and expressed in the induced systemic resistance.

Some rhizobacteria produce toxic metabolites that affect the movement of nematodes *in vitro*, while others inhibit the hatching of juveniles and the process by which they penetrate to the roots.

Effect of rhizobacteria on plant parasitic nematodes

The control that the rhizobacteria exert on nematodes can be implemented in various ways and may effect different phases of the nematode life cycle:

- Egg: antibiotics and toxins produced by bacteria in the rhizosphere diffuse into the soil and can be absorbed by the eggs of the nematodes, killing cells and preventing their embryonic development.

- Hatching: rhizobacteria degrade the root exudates that act as hatching factor for many species of nematodes and then there is the possibility that compounds absorbed by the nematode egg inactivate or cause deformation during development that prevent hatch.

- Targeting and mobility: The transformation of root exudates in the metabolic byproducts of rhizobacteria can cause the nematode simply to not recognize the chemotropic stimulus, so it would continue to move randomly, and eventually to deplete its energy reserves and die without entering the root. If the nematode recognizes the root exudates and moves towards the roots, some bacterial

products can present nematostatic characteristics and reduce the mobility of the nematode to impede it reaching the root.

- Recognition of the host: Substances produced by rhizobacteria are absorbed by roots and can alter their chemical composition, causing the nematodes not to recognize their host. It is also believed that the rhizobacteria bind to lectins on the surface of roots, characterized by being the binding site between the nematode and its plant host, thereby preventing recognition.

- Penetration in the root: toxin or repellent produced by rhizobacteria in high concentration in the region of the rhizoplane or in the cellular content of the epidermis of roots, can discourage the penetration of nematodes in the host plant.

- Food: the rhizobacteria, or their metabolic products, can be absorbed by the plant and the latter to perceive the presence of the nematode, trigger a hypersensitive reaction in giant cells, which is the main mechanism of host resistance to nematodes of the genus *Meloidogyne*. This resistance, called systemic resistance, is not intrinsic to the plant, that is, a reaction that is induced in it by the presence of PGPR.

- Reproduction: Some rhizobacteria have a greater effect on the reduction of eggs than in reducing the number of galls, this may be one of the operating mechanisms.

The rhizosphere environment

One of the most convenient methods of introducing a rhizobacteria in the root environment is through the application on the seeds before sowing. The process of seed germination releases carbohydrates and amino acids in abundance in the form of seed exudates. Thus, these organisms introduced with the seeds in the soil utilize exudates as a source of nutrition and colonize the roots as they emerge. Rhizobacteria isolates that have greater ability to utilize root exudates of seeds may have selective advantage in colonization of roots.

Rhizobacteria of the genus *Bacillus* have been associated with nematode control. Sikora, R.A. (Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. Medicine Faculty Landbouww Rijksuniv Gent, Landbouww, v.53, n.2b, p. 867-878, 1988)

5 observed reductions in infection of *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* and *Rotylenchulus reniformis* around 60-65% with treatment of seeds of various crops with a strain of *Bacillus*.

Advantages of rhizobacteria for commercial application

10 The rhizobacteria have a number of advantages over nematicides or even on other biological control agents: they are easy to mass-produce, they are easy to store, they are adaptable to the formulation technology and require no genetic manipulation.

The rhizobacteria can be applied by treating the substrate, immersing the seedling root systems in bacterial suspensions, watering the plant with bacterial suspension by dipping the seeds in suspension of rhizobacteria or by applying PGPR with the pelleting of seeds in alginate.

15

Bacteria of the genus *Bacillus*

20 The *Bacillus* species are Gram-positive bacteria characterized by having thick cell walls and the absence of outer membranes, which differs from the Gram-negative bacteria. Much of the walls of Gram-positive bacteria is composed of peptidoglycan.

Gram-positive species are divided into groups according to their morphological and biochemical characteristics. The genus *Bacillus* is belonging to the group of sporulated bacteria. Species with spore-forming structures that are resistant to environmental changes, sustain dry heat and certain chemical disinfectants for moderate periods of time. They persist for years on dry land.

25

Use of *Bacillus* spp. in the control of nematodes

Nematodes are responsible for severe losses in agricultural production. The estimated losses are around \$ 100 billion per year worldwide in economically important crops.

The use of cultivars resistant to nematodes is not always possible due to lack of resistance sources for breeding, lack of adaptability of cultivars resistant to certain regions and planting seasons, or the breakdown of resistance in field conditions. Chemical control of nematodes is generally not recommended because it is not very effective; it is expensive, because the waste it leaves in food and the environmental contamination it causes. Because of these disadvantages, there is an increased pressure from society to restrict the use of chemicals which results in a demand by farmers for products that are at the same time, non-toxic to humans and animals, cheap and very effectively control nematodes.

Many soil microorganisms are known as parasites or predators of nematodes. The action of these microorganisms can result from direct or indirect effect through interference with steps in the life cycle of the pathogen.

Bacillus subtilis

The beneficial effect of *B. subtilis*, when applied near the seed or the soil, is not solely due to the antagonism afforded to pathogens. The bacterium has a positive influence on germination, development and crop yield due also to the production of substances which promote growth and improvement in plant nutrition by solubilization of phosphorus.

Genus *Meloidogyne*

Nematodes of the genus *Meloidogyne* (root-knot nematodes) exhibit great diversity on plant hosts and occur in various regions of the globe, causing

losses in different cultures. The main symptom is the presence of galls on plant roots. These galls are malformations or thickening of the root system. The affected plants show up weak, have low production, early defoliation and premature decline, and there may occasionally be plant death, with symptoms
5 potentiated under conditions of nutrient stress and drought.

Initially, the second stage juveniles (J2) of *Meloidogyne* penetrate the roots and establish a feeding site in the region of the central cylinder of roots. Through the development of the nematodes, the J2 differentiate into adult males or females. Adult males, leave the root system, and the females remain
10 in the roots. During the development of female *Meloidogyne* approximately 500 eggs are laid. They are deposited in a gelatinous matrix outside the roots of which the J2 hatch, and they thereby re-infect the root system. The life cycle of root-knot nematodes are approximately four weeks and may extend under temperature conditions less favorable. Temperatures below 20°C or above
15 35°C and conditions of drought or water logging of the soil reduces the development and survival of the nematode.

The control of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* can be done with the use of chemicals that contain certain active ingredients such as carbofuran, etoprophos, aldicarb, metham-sodium or fenamiphos, among others, depending
20 of the culture in question. The practice of crop rotation is also important in control due to deployment of non-host crops such as peanuts, pineapple, rice, or use plant species as ground cover also non-host such as oats.

25 The nematode *Meloidogyne exigua* is very aggressive and is very widespread in the plantations. Different methods of chemical control in areas infested by *M. exigua*, include the use of chemicals that contain any of the active ingredients terbufos or carbofuran, depending on the kind of culture. Among the non-host crops, stand out are cotton, peanuts, rice and oats.

Like *M. exigua*, *M. paranaensis* is widespread in the culture of coffee, but is not much of a problem in other cultures. As for its control, positive results have been obtained by the fungus *Paecilomyces lilacinus*, and this reduced the nematode populations in roots of the tomato "Santa Clara" in the greenhouse.

The use of rhizobacteria in relation to biological control is already known. However, the Applicant presently developed a composition comprising two species of *Bacillus*, namely: *Bacillus subtilis* DSM 17231 (also known as DSM 5750) or a mutant thereof and *Bacillus licheniformis* DSM 17236 (also known as DSM 5749) or a mutant thereof with nematicidal effect against phytonematodes in a plant culture.

Thus, the first aspect of the invention relates to the herein described novel strains or mutants thereof.

It is clear for the skilled person that by using the deposited strains as starting material, the skilled reader can by conventional mutagenesis or re-isolation techniques routinely obtain further mutants or derivatives thereof that retain the herein described relevant features and advantages. Accordingly, the term "a mutant thereof" of the first aspect relates to mutant strains obtained by using the deposited strain as starting material.

Phytonematodes are broadly considered any nematode having a negative impact on commercial crops. Nematodes which can be combated using the composition of the present invention include nematodes of the genus: *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Heterodera*, *Globodera*, *Ditylenchus*, *Tylenchulus*, *Xiphinema*, *Radopholus*, *Rotylenchulus*, *Helicotylenchus* and *Belonolaimus*. Species of the genus *Meloidogyne* are considered of particular relevance as they are responsible for around 95% of all infestations on crops causing

approximately 5% of all crop losses worldwide. The composition of the present invention may, besides the active components, contain agrochemical acceptable excipients and/or vehicles thereof. The composition of the invention further comprises agrochemically acceptable carriers, vehicles and/or
5 adjuvants.

The composition of this invention particularly serves to combat nematodes in crop plants.

Among the main crops of plants are sugar cane, coffee, soybeans, cotton, corn, potatoes, tomatoes, tobacco, banana, rice, wheat, avocado,
10 pineapple, squash, cacao, coconut, oats, onion, lettuce, beet, carrot, cassava, beans, sunflower, pepper, turnip, apple, strawberry, okra, radish and onion.

With regard to fruitculture: citrus, grape, guava, papaya, fig, peach, plum and nespeira are of particular relevance and with regard to horticulture: eggplant and cruciferous.

15 With regard to floriculture: rose, chrysanthemum, lisianthus, gerbera, amaryllis, begonia and celosia.

The present invention relates to a composition comprising *Bacillus subtilis* DSM 17231, or a mutant thereof, and *Bacillus licheniformis* DSM 17236, or a mutant thereof, and to a kit comprising the composition, or prepared by the
20 process of preparing the composition, as well as instructions and a suitable recipient.

A process for preparing a composition comprising *Bacillus subtilis* DSM 17231, or a mutant thereof, and *Bacillus licheniformis* DSM 17236, or a mutant thereof, together with agrochemically acceptable carriers, vehicles and/or
25 adjuvants, and use of said composition for controlling, combating and/or conferring specific resistance to phytonematodes are also given.

In addition, the invention refers to the use of effective amounts of *Bacillus subtilis* DSM 17231, or a mutant thereof, and *Bacillus licheniformis* DSM 17236, or a mutant thereof, in the manufacture of an agrochemical composition with

nematicidal effect against phytonematodes in a plant culture, as well as processes for controlling, combating and/or conferring specific resistance to phytonematodes.

5 The illustrative examples presented below serve to better describe the present invention. However, the formulations described merely refer to some means to some embodiments of the present invention and should not be taken as limiting the scope thereof.

EXAMPLES

10 Composition of the invention

Bacillus subtilis (DSM 17231): 1.6×10^{10} ufc/g

Bacillus licheniformis (DSM 17236): 1.6×10^{10} ufc/g

Ingredients	Percentage min. (%)	Percentage max. (%)
<i>Bacillus subtilis</i> (DSM 17231)	2.4	3.0
<i>Bacillus licheniformis</i> (DSM 17236)	2.4	3.0
Maltodextrin	94.2	93.0
Silico dioxide	1.0	1.0

The composition can be employed as wettable powder. However, the composition may also be provided in any other suitable form e.g. as a powder,
15 solution, slurry, granules etc.

Operating conditions of the manufacturing processes of mixing:

Front ingredients / materials: The receipt is carried out by trained personnel for verification and checking of goods received. According to production targets, a list of ingredients and their quantities is issued and the information is sent to the factory.

- 5 Weighing ingredients / materials: The ingredients are received at the factory, weighed and placed in a stainless steel mixer.

Mixture: The ingredients are mixed following the treatment described in SOP (Standard Operating Procedure).

Analysis: Samples are collected for counting the number of colonies in CFU / g..

- 10 Bottling: The product is packed in bags with internal protection kraft containing 20 kg or polyethylene plastic pots containing 1.0 or 5.0 kg.

Closing: The bags are sealed and stitched. The pots are sealed with cap and passed through magnetic induction.

- 15 Palletizing: Still in the factory packaging are placed on wooden pallets awaiting review by the Quality Control (QC).

Stocking: The final product is stored, sealed and properly identified. Each batch is recorded in an electronic program, available to all operators in each sector of interest.

- 20 Dispatch: Once released by the QC, the product remains stored in the warehouse of dispatch to the time of sale.

This flow is shown in Figure 1.

In vitro tests:

Test 1

- 25 Objective: to evaluate the *in vitro* effect of biological products based on *Bacillus* bacteria in the control of phytonematodes, namely, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, and *M. paranaensis*.

Material and Methods:

We studied three species of phytonematodes of the genus *Meloidogyne*: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. paranaensis* and two biological products in two
5 different doses: A Japanese product based on a *Bacillus* species and the product Nemix[®] composed of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* 97.8% lactose and silicon dioxide. The nematicide used as a standard of effectiveness was 150G TEMIK[®] (aldicarb), whose characteristics are:

- Trademark: TEMIK[®] 150
- 10 - Registrant: Bayer CropScience Ltda.
- Grade(s): Miticide – insecticide – nematicide
- Formulation: GR – Granular
- Active Ingredient (i.a.) aldicarb
- Concentration of i.a.: 150 g/Kg
- 15 - Method of Application: terrestrial
- Mode of Employment: soil
- Toxicological Classification: I – Extremely toxic

The experiment had six treatments:

- 20 - Water: absolute control;
- P1D2: Japanese product at a dose of 2 kg.ha⁻¹;
- P1D4: Japanese product at a dose of 4 kg.ha⁻¹;
- Nemix product at a dose of 2 kg.ha⁻¹;

- Nemix product at a dose of 4 kg.ha⁻¹;
- Nematicide aldicarb (TEMIK® 150G) at a dose of 15 kg.ha⁻¹.

Test for evaluating products in the activity of the nematode:

5 Obtaining 2nd stage juveniles of *Meloidogyne*

Coffee and tomato roots infected by *Meloidogyne* species were washed to remove excess soil adhered to them, cut and processed by the technique of blender (BONETI, J. I. S. & FERRAZ, S.: Modificação de método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. 10 Fitopatologia Brasileira, Brasília, DF, v.6, n.3, 553p, 1981).

The roots were cut into fragments about 1 cm long, were placed in a blender, filled with a solution of sodium hypochlorite 0.5% active chlorine to cover the material. The blender was turned on its lowest speed for 40 seconds on average. Then the suspension obtained was passed through a sieve of 100 15 mesh superimposed on a 500 mesh. The waste was collected from a 500 mesh sieve with the aid of jets of water from a squeeze for a cup of Becker, carefully so that the final volume to be as concentrated as possible.

The suspensions were centrifuged for 5 min at a speed of 650 gravities. Carefully, the supernatant was discarded and the inner wall of the centrifuge 20 tube was cleaned to remove organic impurities.

To the residue of each tube a sucrose solution (of a concentration of 454g of sugar to one liter of water) was added, mixed well and the centrifuge was switched on at the same speed for 1 min as described earlier.

The supernatant was poured through a sieve of 500 mesh, washed with 25 water to remove excess sucrose and collected with the aid of jets of water from a piseta in a cup of Becker.

Petri dishes with a diameter of 5 cm were inside a nylon containing layer of facial tissue paper. The suspension of eggs was added over the layer of tissue paper and the Petri dishes were placed in incubator at 30°C for 24 hours. After 24 h the screen with the tissue was suspended by the aid of forceps and the fluid inside the petri dish was removed to a plate Becker and washed with water. The screen was replaced with a paper plate and water was added. The plates remained in the incubator for 48 h.

After 48 h, the screens were removed and the liquid collected with the aid of jets of water from a piseta for a cup of Becker. The suspension was calibrated to contain 250, 50, 20 and 100 2nd stage juveniles / mL of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, and *M. paranaensis* for assembly of in vitro test, respectively.

Installation and evaluation of the in vitro

Petri dishes with a diameter of 11 cm containing a layer of water-agar 2% received 1 mL of the suspension of juvenile 2nd stage and 1 mL of each treatment to be tested: distilled water solution TEMIK® 150G (nematicide); solution of the Japanese product based on *Bacillus* in two strengths; Nemix solution of the product in two strengths. With spin, the two were thoroughly mixed mL. The plates were kept in the incubator at 30°C for 7 days.

After 7 days, each plate was examined under a magnifying glass for verification and counting of nematodes assets.

Testing for evaluating the inhibition of hatching of juvenile 2 stage *Meloidogyne*

Roots of tomato and coffee were prepared for the blender (BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S.: Modificação de método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, Brasília, DF, v.6, n.3, 553p., 1981), previously described in section "Obtaining 2nd stage juveniles of *Meloidogyne*".

The suspensions were calibrated to contain 1500 eggs / mL, 100 eggs / mL, 500 eggs / mL and 200 eggs / mL of *M. incognita*, *M. javanica*, and *M. paranaensis* respectively.

Installation and evaluation of the *in vitro*

- 5 Petri dishes with a diameter of 5 cm, containing in its interior, nylon fabric with a layer of tissue paper moistened, received 1 mL of each treatment being tested and 1 mL of the suspension of eggs. The plates were kept in incubator at 30°C for 7 days.

- 10 After 7 days, the screens were removed and the liquid from each plate was collected, using jets of water from a piseta to a glass.

Each suspension was examined under the microscope with the aid of a counting chamber for verification and counting of J₂ of *Meloidogyne*.

Design and Statistical Analysis

- 15 The experiment was a completely randomized design with six treatments and five replicates for each nematode. Each petri dish was the experimental unit.

- 20 The data were subjected to statistical procedures program Sisvar (FERREIRA, D. F.: Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA., 45, 2000, São Carlos: UFSCar, 2000, p. 255-258, 2000). In statistical analysis, data were subjected to analysis of variance and means compared by Scott-Knott test at 5% probability. (Results showing no statistically significant difference are marked with identical lower case letters in the figures).

- 25 In evaluating the effect of pesticides in controlling nematodes, were calculated percentage inhibition of movement and percentage inhibition of hatching of juveniles. The formula used in calculating these percentages were as follows:

$\frac{(B-A)}{B} \times 100$ where:

A = number of active nematodes or hatched in each repetition of each treatment.

- 5 B = number of nematodes used in the assay to evaluate inhibition of movement or the inhibition of hatching.

Results and Discussion

Figure 2 and 3 illustrates the inhibitory effect of different nematocides on movements (Figures 2) and hatching (Figures 3) of the nematodes *M. incognita* (A), *M. javanica* (B) and *M. paranaensis* (C).

The data presented in Figure 2A illustrates that only the nematicide TEMIK® differed significantly from other treatments featuring the best outcome for mortality and inhibition of hatching of juvenile *M. incognita*. Regarding the inhibition of hatching of juveniles, it was observed that the treatments did not differ from the control and only the chemical treatment with TEMIK® reduced hatching.

For the inhibition of *Meloidogyne javanica* no significant difference was observed between the biological products tested and TEMIK®, showing that the biological products had satisfactory effect on the inhibition of motion of the nematode (Figure 2B). The effect on hatching was not significant and only the chemical product TEMIK inhibited hatching (Figure 3B).

For the inhibition of *Meloidogyne paranaensis* the Nemix dose of 4 kg ha⁻¹ gave a result significantly equal to nematicide (Figure 2C). Following, are the Japanese products in doses of 2 and 4 kg ha⁻¹ and Nemix at a dose of 2 kg ha⁻¹, and all organic products had greater effect than the control treatment. Regarding the inhibition of hatching of juveniles, the product Nemix with two doses had similar effects showing the best results among the biological products tested (Figure 3C). All products tested differed from the absolute control and nematicide effect was superior to all other treatments.

The product TEMIK[®] and Nemix at a dose of 4 kg ha⁻¹ were the most effective and do not differ significantly with respect to mortality of *M. parananensis*. Regarding inhibition of hatching, TEMIK[®] differed significantly from all other treatments being superior to them. However, the Nemix product was more effective than the Japanese product (Figure 3C).

Thus, the composition Nemix showed a significant inhibition of the nematodes *M. javanica* and *M. paranaensis* an inhibition comparable to the chemical product TEMIK.

Test 2

- Objective: to evaluate the penetration of *Meloidogyne javanica* in tomato roots in relation to different doses of the biological product Nemix comprising *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* under conditions of greenhouse.

Obtaining the inoculum

- Getting the inoculum was made from the sample processing of coffee roots infected by *M. javanica*. The samples were taken to the Agricultural Nematology Laboratory of Institute of Agricultural Sciences and for processing, the roots were chopped into fragments of 2 cm and placed in a household blender cup containing sodium hypochlorite solution (1 part bleach: 4 parts water).

- The solution was spinned for 20 seconds. After this period, the suspension passed through a set of sieves of 200 and 500 mesh, respectively, overlap. The residue from the sieve of 500 mesh was collected, with the aid of a squeeze with water to a beaker. The suspension obtained was calibrated to contain 800 eggs nematode.mL⁻¹.

- Installation and driving test

The experimental design was completely randomized design with five treatments and five replications.

The tomato cultivar used was 'Santa Cruz Kada Gigante', with the doses used of the biological product NEMIX of 4, 6 and 8 kg ha⁻¹. The nematicide aldicarb (TEMIK® 20 G 150 kg ha⁻¹) was used as a standard check and control without any tomato product and the plant parasitic nematode *M. javanica* for the standard penetration.

The seeds of tomato cultivar 'Santa Cruz Kada Gigante' were sown in styrofoam trays of 128 cells filled with substratum Plantmax®. For inoculation, three holes were opened with 2 cm deep and spaced 2 cm from the stem of the seedling. In these three holes were distributed 5 ml suspension calibrated inoculum (4000 nematode / plastic cup). Soon after, the doses of the products were added in small plastic cups in open pits around each seedling.

Evaluation of the penetration of juvenile second stage of *M. javanica* in roots of tomato

The evaluation was done after 3 weeks of inoculation, where the roots after cutting the shoots and the separation of soil, were prepared for staining nematodes in plant tissues (Byrd Jr. et al., An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. Journal of Nematology, Lakeland, v. 5, n. 1, p. 142-143, 1983). The roots were fractured into pieces 1-2 cm and transferred to a cup Becker 50 mL of water to which were added 20 mL of commercial bleach (5.25% NaOCl), which resulted in a final concentration of 1,5% NaOCl. The root segments remained for 6 min in this solution, promoting a manual shaking for 10 s at intervals of 1 min. The roots were washed under running water for 30 to 45s and kept at rest for 15s in water to remove residual sodium hypochlorite.

Then, there was complete drainage and added 30 mL of distilled water plus 1 mL of dye solution (3.35 g acid fuchsin + 25 mL glacial acetic acid + 75 mL water style). The roots of this solution were heated to the boiling point, leaving them for 30 seconds in boiling, and soon after the container was placed on the counter to reach room temperature. Subsequently, the dye solution was removed what remained, and the material was washed in tap water and placed in 20-30 mL of glycerin acidified with few drops of 5N HCl. The root segments

were pressed between microscope slides and observed in optical microscope. The second stage juvenile that penetrated the roots were counted.

Statistical Analysis

The data were subjected to statistical procedures program SISVAR (FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA., 45, 2000, São Carlos: UFSCar, 2000, p. 255-258, 2000). In statistical analysis, means were compared by Tukey test at 5% probability.

Results and Discussion

From the data presented in Table 3 it appears that the penetration of second stage juveniles of *M. javanica* was affected in all treatments when compared with the control without any product. Treatment with aldicarb product to 20 kg ha⁻¹ showed the lowest penetration. Of the different doses of NEMIX, the best was 8 kg ha⁻¹, which provided greater inhibition than the other tested doses.

Table 3 – Number of second stage juveniles of *Meloidogyne javanica* penetrated and percentage of penetration in tomato roots cultivar. 'Santa Cruz Kada Gigante', 3 weeks after inoculation. Uberlândia, UFU, 2007.

Products	Penetrated	Penetration %	% Inhibition of Penetration
Aldicarbe (TEMIK 150 G [®] 20 kg. ha ⁻¹)	10,20* a**	0,26***a	88,00
<i>Bacillus</i> spp. (NEMIX 8 kg. ha ⁻¹)	28,80 b	0,72b	66,12
<i>Bacillus</i> spp. (NEMIX 6 kg. ha ⁻¹)	50,40 c	1,26c	40,70
<i>Bacillus</i> spp. (NEMIX 4 kg. ha ⁻¹)	62,20 d	1.57d	26,82
Control (without product application)	85,00 e	2,13e	-

C.V (%)= 12,5

* Average of five repetitions

** Means followed by same letter at the column do not differ from each other by Tukey test at 5% probability

5 *** % Penetration= N° of J₂ / 4.000 eggs

It was found that the percentage of penetration of nematodes ranged from 0.26 for the dose of aldicarb and 2.13 for the control without product application.

10 Regarding the biological product, this may have acted in the orientation of second stage juveniles of *M. javanica* causing dispersal of juveniles, hindering the penetration thereof, or such a reduction may have been caused by interference in the process of emergence of juveniles of *M. javanica*. There is still the possibility that compounds absorbed by the egg inactivate nematode or cause deformation during development that prevent hatch.

15 Among the three doses evaluated the biological product based on *Bacillus* spp., the dose of 8 kg ha⁻¹ showed better results in reducing the penetration of second stage juveniles of *M. javanica* in roots of tomato cultivar 'Santa Cruz Kada Gigante' with penetration of 0.72 percent.

Test 3

20 Objective: To evaluate the penetration of *Melodogyne exigua* in the tomato roots exposed to different doses of biological product based on *Bacillus* spp. under greenhouse conditions.

Obtaining the inoculum

25 Getting the inoculum was made from the sample processing of coffee roots infected by *M. exigua*. The samples were taken to the Agricultural Nematology Laboratory of Institute of Agricultural Sciences and for processing, the roots were chopped into fragments of 2 cm and placed in a household blender cup containing sodium hypochlorite solution (1 part bleach: 4 parts water).

There has been grinding in the lower spin for 20 seconds. After this period, the suspension passed through a set of sieves of 200 and 500 mesh, respectively, overlap. The residue from the sieve of 500 mesh was collected, with the aid of a squeeze with water to a becker (BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. 5 Modificação de método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, Brasília, DF, v.6, n.3, 553p., 1981). The suspension obtained was calibrated to contain 800 nematode eggs / mL.

Installation and driving test

10 The experimental design was completely randomized design with five treatments and five replications. The genotype of tomato used was the 'Santa Cruz Kada Gigante', with the doses used the product based on *Bacillus* (NEMIX®) were 4, 6 and 8 kg ha⁻¹, Aldibarbe nematicide (Temik® 150 G) at a dose of 20 kg of commercial product per hectare as a standard check and 15 control tomato plants without any product to the standard penetration.

The seeds of tomato cultivar 'Santa Cruz Kada Gigante' were sown in styrofoam trays of 128 cells and after 8 days, seedlings were transplanted into plastic cups with 500 mL capacity filled with substratum Plantmax®. For inoculation, three holes were opened with 2 cm deep and spaced 2 cm from the 20 stem of the seedling. In these three holes were distributed 5 ml suspension calibrated inoculum (4000 nematode / plastic cup). Soon after, the doses of the product based on *Bacillus* spp. were added in plastic cups with a squeeze. The nematicide aldicarb was also added immediately after inoculation, open groove around each seedling.

25 Evaluation of the penetration of juvenile second stage of *M. exigua* in roots

The evaluation was done after 3 weeks of inoculation, where the roots after cutting the shoots and the separation of soil, were prepared for staining nematodes in plant tissues (Byrd Jr., et. al., An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. Journal of Nematology, 30 Lakeland, v. 5, n. 1, p. 142-143, 1983). The roots were fractured into pieces 1-2

cm and transferred to a cup Becker containing 50 mL of water to which were added 20 mL of commercial bleach (5.25% NaOCl), which resulted in a final concentration of 1 , 5% NaOCl. The root segments remained for 6 min in this solution, promoting a manual shaking for 10 s at intervals of 1 min. The roots
5 were washed under running water for 30 to 45s are kept at rest for 15 s in water to remove residual sodium hypochlorite.

Then, there was complete drainage and added 30 mL of distilled water plus 1 mL of dye solution (3.35 g acid fuchsin + 25 mL glacial acetic acid + 75 mL water style). The roots of this solution were heated to the boiling point,
10 leaving them for 30 seconds in boiling, and soon after the container was placed on the counter to reach room temperature. Subsequently, we removed the dye is left, and the material was washed in tap water and placed in 20-30 mL of glycerin acidified with few drops of 5N HCl. The root segments were pressed between microscope slides that were observed in the optical microscope. We
15 observed the root fragments and determined the number of juvenile second stage that penetrated the roots of tomato.

Maximum and minimum temperatures of air inside the greenhouse

The daily maximum and minimum temperatures of air inside the greenhouse were recorded for the purposes of the calculation of averages for
20 the period of the experiment.

The average maximum and minimum temperatures of air were 35.9°C and 15.3°C, respectively.

Statistical Analysis

The data were subjected to statistical procedures program SISVAR
25 (FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA., 45, 2000, São Carlos. **Anais**. São Carlos: UFSCar, 2000, p. 255-258, 2000), verifying the homogeneity of variance and

normality of errors. In statistical analysis, means were compared by Tukey test at 5% probability level.

Results and Discussion

From the data presented in Table 4 and illustrated in Figure 3, it appears that the penetration of second stage juveniles of *M. exigua* was significantly affected in all treatments when compared with the control without any product. Treatment with the aldicarb product (TEMIK) to 20 kg ha⁻¹ was the most affected penetration. Among doses of the NEMIX product, the best was 8 kg ha⁻¹, which showed higher percentage of inhibition 54.13% compared to the nematicide aldicarb which showed a significant inhibition of 81.95%.

Table 4 - Number of second stage juveniles of *Meloidogyne exigua* penetrated, the penetration percentage and percentage of inhibition in roots of tomato. 'Santa Cruz Kada Gigante', three weeks after inoculation. Uberlândia, UFU, 2007.

Products	Nº of J ₂ of <i>M. exigua</i> penetrated	Percentage	
		Penetration	Inhibition of penetration
Aldicarbe (TEMIK® 150 G 20 kg. ha ⁻¹)	19.40* a**	0.48***	81.95***
<i>Bacillus</i> spp. (NEMIX 8 kg. ha ⁻¹)	49.00 b	1.22	54.13
<i>Bacillus</i> spp. (NEMIX 6 kg. ha ⁻¹)	66.20 c	1.65	37.97
<i>Bacillus</i> spp. (NEMIX 4 kg. ha ⁻¹)	81.00 c	2.02	24.06
Control (without application)	106.60 d	2.66	-----

C.V (%) 13.04

* Average of five repetitions

** Means followed by same letter at the column do not differ from each other by Tukey test at 5% probability

*** % Penetration= Nº of J₂ / 4.000 eggs

*** Values compared with the initial population of 4000 eggs of *M. exigua*

It is also observed that there was no difference in effect between doses of 4 and 6 kg ha⁻¹ of the NEMIX product with percentages of penetration of 1.65 and 2.02% respectively. The percentage of penetration of nematodes ranged between 0.48 and 2.66% in control and penetration control pattern, respectively, for the initial population.

The effect of pesticides on the migration of *M. exigua* shows that there is interference in the direction causing the dispersal of juveniles. The reduction in the presence of juveniles penetrated the roots of tomato in relation to control, may also have been due to interference in the processes of hatching and orientation of juvenile *M. exigua*.

The hypothesis of reduction in nematode penetration in roots can be clarified as the ability of the bacterium, which comprises the product, to engage or connect to the surface lectins, which in this case may be minimal due to gram-positive bacteria.

The temperatures inside the greenhouse may also influence the penetration of juveniles in the roots. Some authors report that the antagonist action of some microorganisms on populations of *Meloidogyne* spp. is greater at temperatures ranging 23-25°C than 18-32°C (AL-HAZMI, A. S.; SCHIMITT, D. P.; SASSER, J. N. The effect of *Arthrobotrys conoides* on *Meloidogyne incognita* populations densities in corn as influenced by temperature, fungus inoculum density and of fungus introduction in the soil. Journal of Nematology, DeLeon Springs, v. 14, n. 2, p. 168-174, Apr., 1982).

Among the three tested doses of the product based on *Bacillus* spp., the dose of 8 kg ha⁻¹ proved more effective in reducing the penetration of second stage juveniles of *M. exigua* in roots of tomato cultivar 'Santa Cruz Kada Gigante' with the percentage of penetration of 1.22% and 54.13% inhibition.

In conclusion

The specific combination of a *Bacillus subtilis* strain with a *Bacillus licheniformis* strains such as e.g. *Bacillus subtilis* (DSM 17231) and *Bacillus licheniformis* (DSM 17236) proves to be a strong alternative to chemical nematocidal products and also an improved composition as compared to available biological products. The combined effect of the two strains are beneficial for inhibition of the nematodes causing crop losses.

DEPOSITS and EXPERT SOLUTION

5 The applicant requests that a sample of the deposited microorganisms stated below may only be made available to an expert, until the date on which the patent is granted.

10 The *Bacillus subtilis* strain was deposited 2005-04-07 at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig (DSMZ) and given the accession No.: DSM 17231.

15 The *Bacillus licheniformis* strain was deposited 2005-04-07 at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig (DSMZ) and given the accession No.: DSM 17236.

The deposits were made according to the Budapest treaty on the international recognition of the deposit of microorganisms for the purposes of patent procedure.

20 **REFERENCES**

EP 0705807

BR PI 0604602-9

Siddiqui and Mahmood (1999). Bioresource Technology 69; 167-179.

CLAIMS

1. Composition, comprising as active ingredients a *Bacillus subtilis* having the characteristics of the strain deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen with accession No. DSM 17231 or a mutant thereof, wherein the mutant is obtained by using the deposited strain as starting material, and wherein the mutant has retained or further improved the nematicidal properties of DSM 17231, and a *Bacillus licheniformis* having the characteristics of the strain deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen with accession No. DSM 17236 or a mutant thereof, wherein the mutant is obtained by using the deposited strain as starting material, and wherein the mutant has retained or further improved the nematicidal properties of DSM 17236, and agrochemically acceptable excipients and/ or carriers thereof.

2. Composition according to claim 1, comprising the *Bacillus subtilis* and the *Bacillus licheniformis* in a mixture of maltodextrin and silico dioxide, wherein said components are present in a minimum rate of 2.4 (%), 2.4 (%), 94.2 (%) and 1.0 (%), respectively, and in a maximum rate of 3.0 (%), 3.0 (%), 93.0 (%) and 1.0(%), respectively.

3. Composition according to any of claims 1 and 2, in the form of a wettable powder.

4. Process for preparing a composition, as defined in any one of claims 1 to 3, comprising mixing, in desired ratios, effective amounts of the *Bacillus subtilis* and the *Bacillus licheniformis* for applying, together with agrochemically acceptable carriers, vehicles and/or adjuvants.

5. Use of a composition, according to any one of claims 1 to 3, or obtainable from a process as defined in claim 4, for controlling, combating and/or conferring specific resistance to phytonematodes.

6. Use according to claim 5, wherein the phytonematodes are selected from the group consisting of *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Heterodera*,

Globodera, *Ditylenchus*, *Tylenchulus*, *Xiphinema*, *Radopholus*, *Rotylenchulus*, *Helicotylenchus* and *Belonolaimus*.

7. Use according to claim 6, wherein the phytonematode is selected from the group consisting of *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*,
5 *Meloidogyne exigua*, *Meloidogyne paranaensis*, *Heterodera glycines* and *Pratylenchus zeae*.

8. Use according to any of claims 5 to 7, wherein the plant culture is selected from the group consisting of sugar cane, soybean, potato, carrot, coffee and banana.

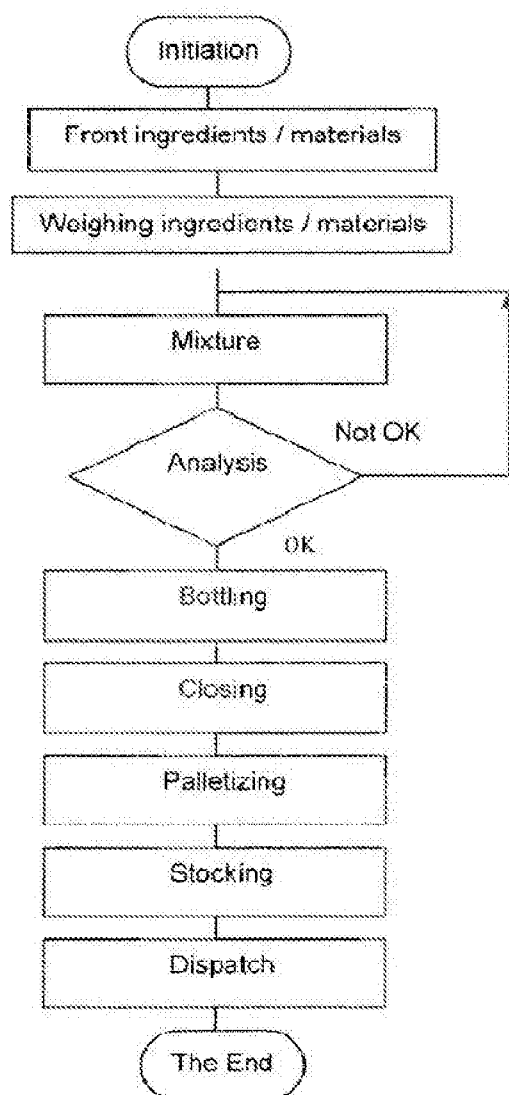
10 9. Process for controlling and/or combating phytonematodes on plants and/or their habitat, wherein the composition as defined in any one of claims 1 to 3, is allowed to act on the phytonematodes and/or their habitat.

10. Process for conferring specific resistance to phytonematodes, comprising applying an effective amount of a composition, as defined in any
15 one of claims 1 to 3, on plants and/or their habitat.

11. Kit, comprising the composition, as defined in any one of claims 1 to 3, or obtainable from a process as defined in claim 4, instructions and a suitable recipient.

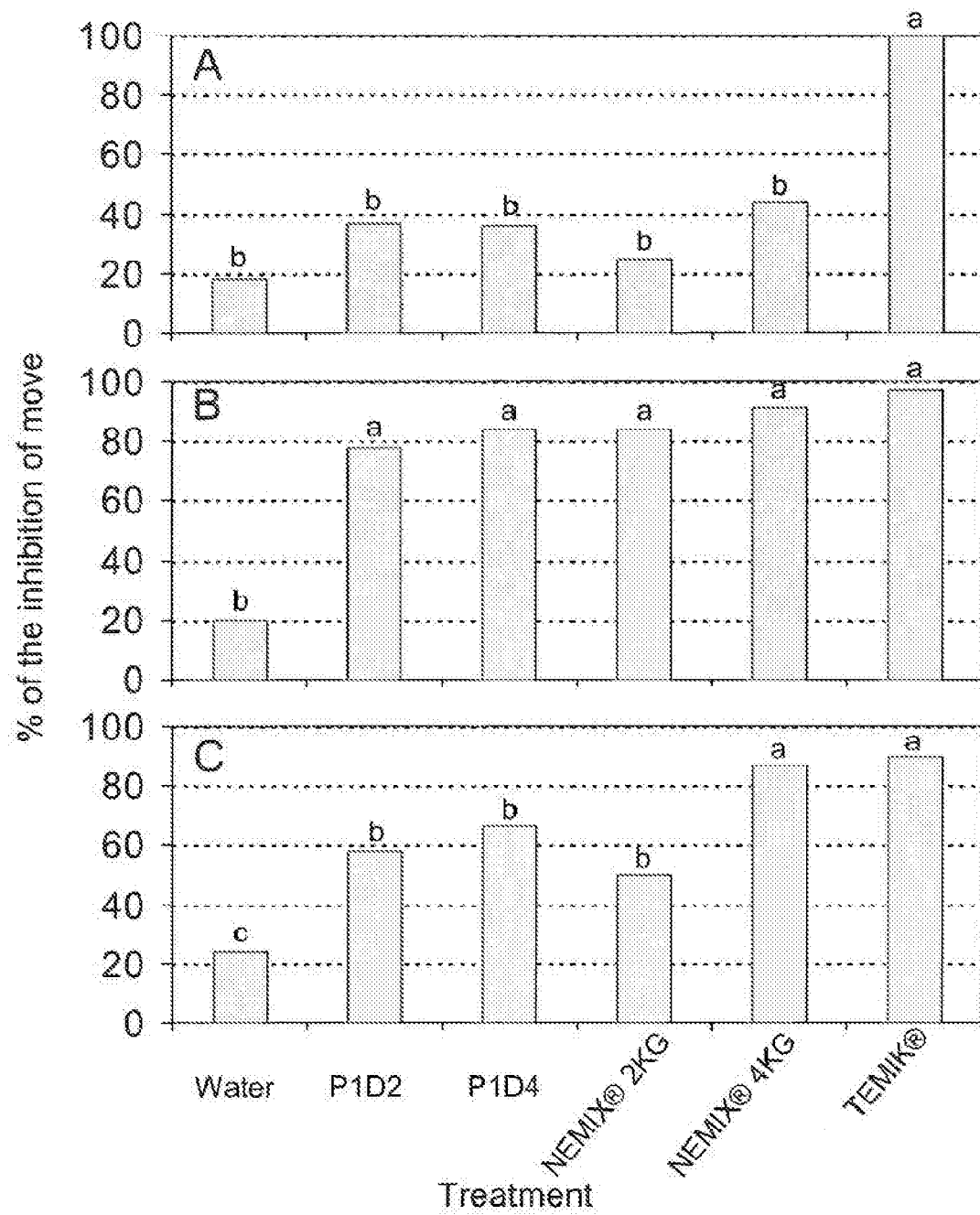
1/4

FIGURE 1



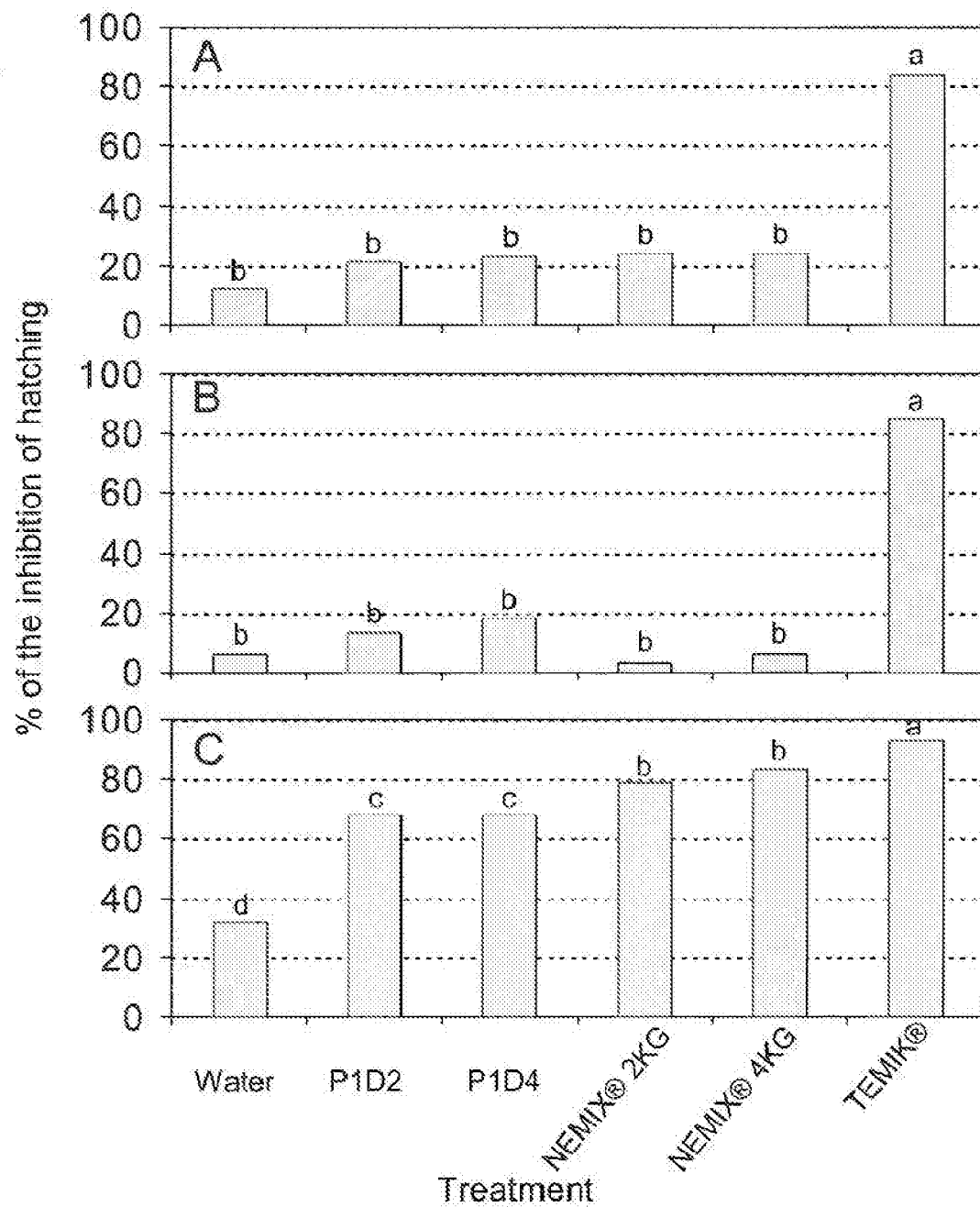
2/4

FIGURE 2



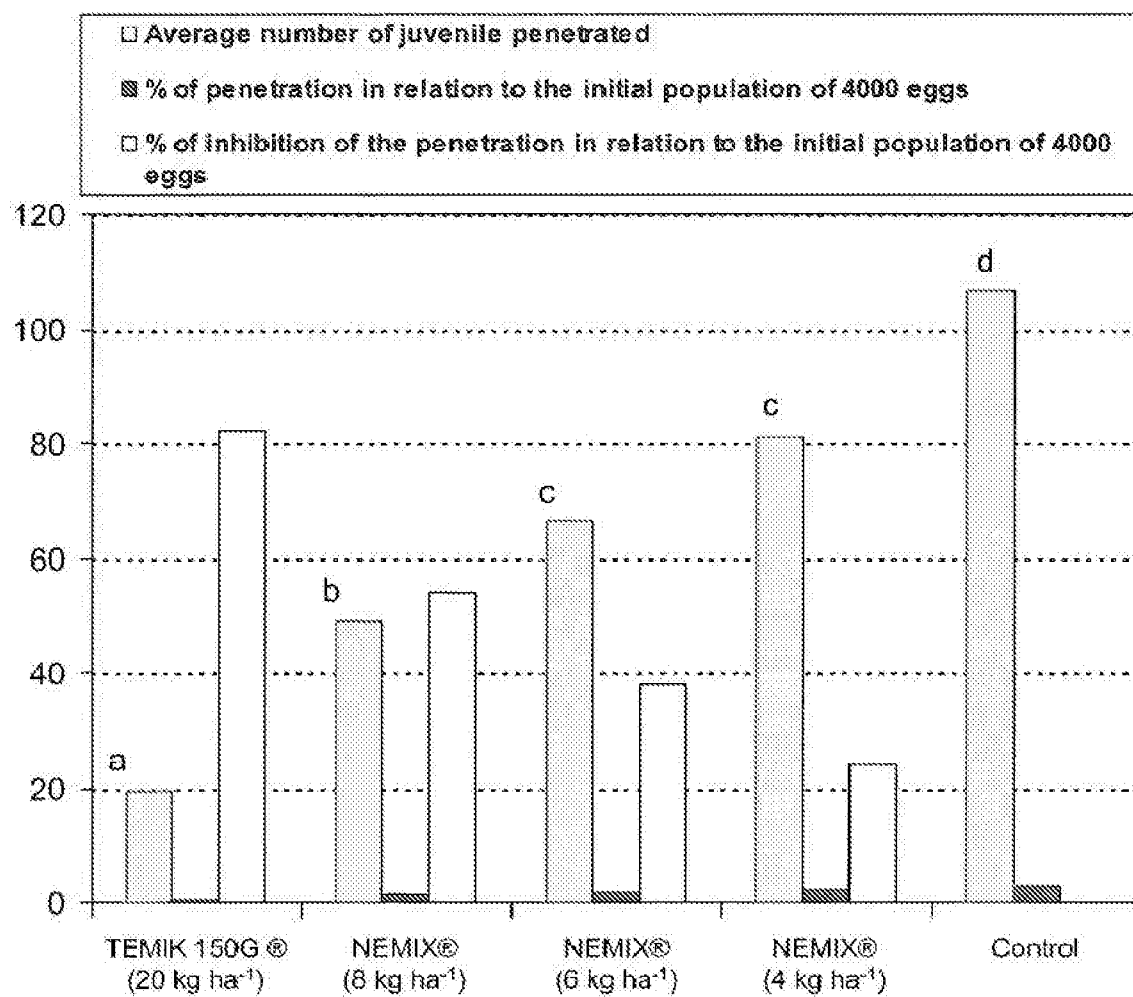
3/4

FIGURE 3



4/4

FIGURE 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/063685

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A01N63/00 C12N1/20 C12R1/125 C12R1/10 A01P5/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N C12N C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, COMPENDEX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 705 807 A1 (HIBINO SUSUMU [JP] HIBINO SUSUMU [JP]; RISAHRU KOSAN LTD [JP]) 10 April 1996 (1996-04-10) cited in the application page 7; table 1 page 30, line 23 - line 25	1-11
X	BR PI0 604 602 A (CAZARRE MARCUS MACEDO) 27 May 2008 (2008-05-27) cited in the application claim 3 ----- -/--	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 January 2012

Date of mailing of the international search report

25/01/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sawicki, Marcin

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/063685

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Z.A SIDDIQUI, I. MAHMOOD: "Role of bacteria in management of plant parasitic nematodes. A review.", BIORESOURCE TECHNOLOGY, vol. 69, no. 2, 28 September 1999 (1999-09-28), pages 167-179, XP007916664, ISSN: 0960-8524, DOI: doi:10.1016/S0960-8524(98)00122-9 cited in the application page 173; table 7	1-11
X	----- ZAIED, K.A.; KAWTHER, S. KASH; IBRAHIM S.A.; TAWFIK T.M.: "Improving Nematocidal Activity of Bacteria via Protoplast Fusion", AUSTRALIAN JOURNAL OF BASIC AND APPLIED SCIENCES, vol. 3, no. 2, 30 June 2009 (2009-06-30), pages 1412-1427, XP007916665, Australia ISSN: 1991-8178 page 1418; examples ARC-BS.7; tables 6, 7	1-11
X	----- SHAHNAZ DAWAR, MARIUM TARIQ, M.J. ZAKI: "Application of Baccillus species in control of Meloidogyne Javanica (Treub) chitwood on cowpea and mash bean", PAKISTAN JOURNAL OF BOTANY, vol. 40, no. 1, 7 November 2008 (2008-11-07), pages 439-444, XP007916667, Pakistan ISSN: 2070-3368 page 441; table 1 page 442; table 2	1-11
X	----- LI BIN, XIE GUAN-LIN, SOAD A., COOSEMANS J.: "SUPPRESSION OF MELOIDOGYNE JAVANICA BY ANTAGONISTIC AND PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA", JOURNAL OF ZHEJIANG UNIVERSITY SCIENCE B, vol. 6, no. 6, 30 June 2005 (2005-06-30), pages 496-501, XP002616271, Zhejiang ISSN: 1862-1783, DOI: 10.1631/jzus.2005.B0496 abstract	1-11
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/063685

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZAKI A SIDDIQUI AND KAZUYOSHI FUTAI: "Biocontrol of Meloidogyne incognita on tomato using antagonistic fungi, plant-growth-promoting rhizobacteria and cattle manure", PEST MANAGEMENT SCIENCE, vol. 65, no. 9, 8 June 2009 (2009-06-08), pages 943-948, XP002624533, Germany ISSN: 1526-4998, DOI: 10.1002/ps.1777 page 944; table 1 page 945; table 2 -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/063685

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0705807	A1	10-04-1996	DE 69420411 D1 07-10-1999
			DE 69420411 T2 06-04-2000
			EP 0705807 A1 10-04-1996

BR PI0604602	A	27-05-2008	NONE

**COMPOSICIÓN NEMATOCIDA QUE COMPRENDE *BACILLUS SUBTILIS* Y
*BACILLUS LICHENIFORMIS***

SÍNTESIS DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con una composición que comprende *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*, que presenta un efecto nematocida sobre los fitonematodos que atacan las plantas y/o su hábitat, con su uso, con un proceso para elaborarla, con el uso de *Bacillus subtilis* y de *Bacillus licheniformis*, con procesos para controlar y/o combatir los fitonematodos y/o para conferir una resistencia específica a ellos y con un conjunto de elementos. En particular, la invención se relaciona con *Bacillus subtilis* (DSM 17231) y con *Bacillus licheniformis* (DSM 17236).

CAMPO DE LA INVENCION

La intensificación de la actividad agrícola ha dado como resultado un desequilibrio ecológico, por lo que actualmente es imprescindible usar productos selectivos que no afecten el equilibrio entre las plagas y sus depredadores, sus parasitoides y sus patógenos, los cuales son responsables de la mayor parte del control biológico, ya que con ellos pueden mantenerse las poblaciones de plagas en niveles aceptables (Dent, D., Insect pest gestión. Cambridge: Cabi Bioscience 2000).

Con el objeto de revertir esta situación, se ha recomendado el desarrollo de programas con los que puedan gestionarse las plagas de manera integrada, que sean útiles

como sistemas de decisión para el uso de las tácticas de control, de manera individual o en una combinación armoniosa, en el contexto de una estrategia de gestión que esté basada en una relación costo/beneficio en la que se tenga en cuenta el interés de los granjeros, de la sociedad y de el ambiente y/o el impacto sobre ellos. Entre las medidas de control que se encuentran disponibles para estos sistemas de gestión pueden mencionarse los nematodos entomopatogénicos y los insectos parasitoides, con los cuales pueden abarcarse diversas áreas del control biológico de las plagas.

En el contexto de la sociedad moderna y ecológica actual, donde existe la preocupación de preservar el medio ambiente, se considera que el control biológico es una alternativa y/o un suplemento atractivo para los métodos de control convencionales. El control biológico está relacionado con el uso de un organismo (un depredador, un parásito o un patógeno) que ataca otro organismo, que es el que provoca daños en los cultivos. Esta es una estrategia muy común en los sistemas agroecológicos y en la agricultura convencional, que está basada en la gestión integrada de las plagas (IPM).

Aunque con el control biológico ha sido posible obtener respuestas positivas relacionadas con la reducción o la eliminación del uso de plaguicidas y con la mejora del ingreso de los granjeros, sobre la base del análisis del conjunto de experimentos que se han llevado a cabo a nivel

mundial puede concluirse que los resultados se han concentrado en unos pocos cultivos, por lo que todavía es necesario continuar con el desarrollo en las áreas relacionadas con el control de las plagas y de las enfermedades.

La atención se ha centrado principalmente en la investigación del control biológico basado en el uso de bacterias capaces de colonizar las raíces de las plantas, que se conocen como rizobacterias. Las rizobacterias que resultan beneficiosas para promover una mejora en el control biológico de las bacterias patogénicas de las plantas y/o para actuar en el contexto de dicho control se conocen como rizobacterias capaces de promover el crecimiento de las plantas o PGPR. A través de las PGPR, puede incrementarse la disponibilidad de los nutrientes para las plantas y pueden obtenerse combinaciones y concentraciones de las sustancias con las que puede promoverse el crecimiento. Sin embargo, el efecto más importante de las rizobacterias es la supresión de los patógenos que resultan perjudiciales para el crecimiento de las plantas. La inhibición de las bacterias perjudiciales tiene lugar a través de la producción de sideróforos, es decir, sustancias que actúan bajo condiciones de baja disponibilidad de fósforo, con lo que puede reducirse en una medida mayor el nivel de fósforo disponible para otros microorganismos de la rizosfera o para la producción de antibióticos.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La presión de la sociedad para reemplazar los nematicidas por productos o técnicas que sean aceptables desde el punto de vista ambiental ha motivado el desarrollo de métodos alternativos que sean útiles para controlar los nematodos. En este contexto, se ha considerado que el control biológico es una alternativa para poner en práctica un abordaje integrado, cuyo propósito sería asegurar el desarrollo sostenible de la agricultura. Determinadas áreas de la investigación se han centrado en el uso de enemigos naturales, que pueden dar como resultado una disminución en las poblaciones de nematodos hasta niveles inferiores a los que están asociados a los daños a nivel económico.

A causa del riesgo que representan los plaguicidas sintéticos para el ser humano y para el ambiente, se ha incrementado la necesidad de desarrollar herramientas como el control biológico con el propósito de optimizar los sistemas agrícolas sostenibles.

La solicitud de patente europea EP 0705807A1 está relacionada con una preparación de bacterias con la que puede acondicionarse el suelo, que comprende bacterias que pertenecen al género *Bacillus*, tales como *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*. Con esta preparación, pueden prevenirse las lesiones en las raíces de los cultivos que suelen ser provocadas por los nematodos.

La solicitud de patente brasilera BR PI 0604602-9A está relacionada con el uso de una cepa de *Bacillus*

subtilis en combinación con *Bacillus licheniformis* en el control de los fitonematodos.

Siddiqui y Mahmood (1999) han descripto la función que cumplen las bacterias en la gestión de los nematodos parásitos de las plantas, y han demostrado que *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* pueden ser útiles contra fitonematodos como *Meloidogyne spp.*, *Heterodera spp.* o *Rotylenchulus*.

Los inventores de la presente invención han llevado a cabo una investigación y un análisis extensos para desarrollar métodos biológicos con los que puedan controlarse los nematodos, sobre la base de la identificación de dos cepas salvajes de *Bacillus subtilis* y de *Bacillus licheniformis*, que en particular, son útiles para reducir las lesiones en las raíces que son provocadas por los nematodos.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Flujo de las condiciones de operación de los procesos de mezcla en la manufactura.

Figura 2. Porcentaje de inhibición del movimiento de los juveniles después del efecto de los productos biológicos. A: *Meloidogyne incognita*; B: *M. javanica*, C: *M. paranaensis*.

Figura 3. Porcentaje de inhibición de eclosión después del efecto de los productos biológicos. A: *Meloidogyne incognita*; B: *M. javanica*, C: *M. paranaensis*.

Figura 4. Promedio de la cantidad de juveniles de la segunda etapa de *Meloidogyne exigua* que han penetrado, porcentaje de la penetración e inhibición de la penetración en raíces de tomate "Santa Cruz Kada Gigante", tres semanas después de la inoculación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Rizobacterias

En el suelo se aloja una comunidad biológica compleja que abarca microorganismos procariotas y eucariotas que son tanto numerosos como diversos. Algunos procariotas ocupan el nicho ecológico de la rizosfera y/o el rizoplasma de las plantas, donde se multiplican, sobreviven y se protegen de la acción antagónica de la microflora restante del suelo. En general, estos organismos se conocen como rizobacterias. En asociación con las plantas, las rizobacterias pueden tener un efecto perjudicial, nulo o beneficioso. Las rizobacterias que presentan un efecto beneficioso, por ejemplo, en el contexto de la promoción del crecimiento y el control biológico de las enfermedades, se conocen como PGPR (rizobacterias capaces de promover el crecimiento de las plantas). Se estima que solamente 0,6% de las rizobacterias presentan efectos beneficiosos sobre las plantas a las que están asociadas.

Las PGPR como agentes de control biológico

Las PGPR han sido usadas en el control biológico de las enfermedades de las plantas con el propósito de

incrementar la productividad de los cultivos. Todavía es necesario profundizar la investigación en los mecanismos y las razones que rigen este control biológico.

En algunas situaciones, es posible que el control biológico tenga lugar a través del antagonismo directo que es ejercido por las PGPR sobre el patógeno, con la participación de mecanismos antibióticos conocidos: la producción de sustancias antimicrobianas, el parasitismo directo y la competición por los nutrientes y por los nichos ecológicos. A través de diversas investigaciones, se ha demostrado que determinadas PGPR parecen actuar a través de un mecanismo de ISR (resistencia sistémica inducida), de manera tal que la planta adquiere una protección sistémica contra más de un patógeno, a diferencia del control biológico clásico, cuyo propósito es implementar el control de una manera más específica.

Cuando las PGPR colonizan el sistema radicular, las moléculas que constituyen las células bacterianas o que son sintetizadas por ellas actúan como desencadenantes de una señal bioquímica. Esta señal es trasladada hasta sitios distantes del sitio donde se origina. Los genes que codifican los componentes de la resistencia dinámica se desactivan y se expresan en presencia de una resistencia sistémica inducida.

Algunas rizobacterias producen metabolitos tóxicos que afectan el movimiento de los nematodos in vitro, mientras que otras inhiben la eclosión de los juveniles y el proceso

a través del cual penetran en las raíces.

Efecto de las rizobacterias sobre los nematodos parásitos de las plantas

El control que ejercen las rizobacterias sobre los nematodos puede implementarse de diversas maneras y puede afectar distintas fases del ciclo de vida de los nematodos:

- los huevos: los antibióticos y las toxinas que son producidos por las bacterias en la rizosfera se transportan por difusión hasta el suelo, desde donde pueden ser absorbidos por los huevos de los nematodos, en los cuales pueden exterminar las células e impedir el desarrollo de los embriones;
- la eclosión: las rizobacterias degradan los exudados de las raíces que actúan como factores que favorecen la eclosión de nematodos de diversas especies, y también es posible que los compuestos que son absorbidos por los huevos de los nematodos inactiven la eclosión o provoquen deformaciones durante el desarrollo que la impidan por completo;
- el direccionamiento y la movilidad: la transformación de los exudados de las raíces con los subproductos del metabolismo de las rizobacterias puede impedir que los nematodos reconozcan los estímulos quimiotrópicos, lo que dará como resultado un movimiento al azar hasta que se agoten sus reservas de energía y mueran sin ingresar en las raíces; si los nematodos pueden reconocer los exudados de las raíces y pueden dirigirse hasta ellas, algunos

productos de origen bacteriano pueden presentar características nematostáticas y pueden reducir la movilidad de los nematodos, de manera tal de impedirles que ingresen en las raíces;

- el reconocimiento del huésped: las sustancias que son producidas por las rizobacterias son absorbidas por las raíces y pueden alterar su composición química, lo que puede impedir que los nematodos reconozcan su huésped; también se cree que las rizobacterias pueden unirse a las lectinas en la superficie de las raíces, que son el sitio donde tiene lugar la unión entre los nematodos y las plantas que los hospedan, con lo que puede impedirse que tenga lugar el reconocimiento;

- la penetración en las raíces: las toxinas o los repelentes que se producen en las rizobacterias pueden hallarse en una concentración elevada en la región del rizoplasma o en el contenido de las células que conforman la epidermis de las raíces, desde donde pueden impedir que los nematodos penetren en las plantas huésped;

- los alimentos: las rizobacterias y los productos de su metabolismo pueden ser absorbidos por las plantas, donde pueden permitir que se perciba la presencia de los nematodos y se desencadene una reacción de hipersensibilidad en las células gigantes, lo que constituye el mecanismo principal que rige la resistencia del huésped a los nematodos del género *Meloidogyne*; esta resistencia, que se conoce como resistencia sistémica, no

es intrínseca de la planta, sino que se trata de una reacción que es inducida en presencia de las PGPR.

- la reproducción: algunas rizobacterias presentan un efecto mayor en el contexto de la reducción de la cantidad de huevos que en el contexto de la reducción de la cantidad de agallas, por lo que aquél podría ser uno de sus mecanismos de operación.

El ambiente de la rizosfera

Uno de los métodos más convenientes para introducir las rizobacterias en el ambiente de las raíces está basado en una aplicación previa a la siembra sobre las semillas. Durante el proceso de germinación de las semillas, se liberan hidratos de carbono y aminoácidos en cantidades abundantes, en forma de exudados de las semillas. De esta manera, los organismos que se introducen en el suelo junto con las semillas pueden utilizar los exudados como fuente de nutrición, para luego colonizar las raíces a medida que emergen. Los aislados de rizobacterias que presentan una mayor capacidad de utilizar los exudados de las raíces y de las semillas pueden poseer una ventaja selectiva en el contexto de la colonización de las raíces.

Las rizobacterias del género *Bacillus* han sido asociadas al control de los nematodos. Sikora, R. A. (Interrelationship between plant health promoting rizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. Medicine Faculty Landbouww Rijksuniv Gent, Landbouww, v. 53, n. 2b, p. 867-878, 1988), observó una

disminución de aproximadamente 60-65% en las infecciones de *Meloidogyne arenaria*, de *M. incognita* y de *Rotylenchulus reniformis* cuando trató las semillas de diversos cultivos con una cepa de *Bacillus*.

Ventajas de las rizobacterias para las aplicaciones comerciales

Las rizobacterias presentan numerosas ventajas sobre los nematocidas, e incluso sobre otros agentes de control biológico: son fáciles de producir en masa, resultan fáciles de almacenar, pueden adaptarse a la tecnología que se emplea para la formulación y no es necesario someterlas a una manipulación genética.

Las rizobacterias pueden aplicarse tratando el sustrato, sumergiendo los sistemas radiculares de los retoños en suspensiones de las bacterias, regando las plantas con suspensiones de las bacterias, sumergiendo las semillas en suspensiones de las rizobacterias o elaborando pellets con las PGPR y las semillas en alginato.

Bacterias del género *Bacillus*

Las especies de *Bacillus* son bacterias Gram positivas que se caracterizan por presentar paredes celulares gruesas y por carecer de membranas externas, lo que las diferencia de las bacterias Gram negativas. La mayor parte de las paredes de las bacterias Gram positivas está compuesta por peptidoglucanos.

Las especies Gram positivas se dividen en grupos sobre la base de sus características morfológicas y bioquímicas.

El género *Bacillus* pertenece al grupo de las bacterias que son capaces de esporular. Las especies que presentan estructuras que pueden formar esporas son resistentes a los cambios en el ambiente, al calor seco y a determinados desinfectantes químicos durante períodos de tiempo moderados. Pueden subsistir en tierra seca durante varios años.

Uso de *Bacillus* spp. en el control de los nematodos

Los nematodos son responsables de pérdidas severas en la producción agrícola. Las pérdidas estimadas en los cultivos de importancia económica a nivel mundial son de aproximadamente 100000 millones de dólares por año.

No siempre resulta posible usar cultivares resistentes a los nematodos, debido a que no hay fuentes de resistencia disponibles para el desarrollo, a que algunos cultivares resistentes no pueden adaptarse a determinadas regiones o temporadas de cultivo y a que ocasionalmente la resistencia puede degradarse en el campo. En general, no se recomienda el control químico de los nematodos debido a que suele carecer de eficacia, a que es costoso, a que deja residuos en los alimentos y a que provoca contaminación en el ambiente. A causa de estas desventajas, existe una presión creciente por parte de la sociedad para restringir el uso de las sustancias químicas, lo que se traduce en la demanda por parte de los granjeros de productos que no sean tóxicos para los seres humanos y para los animales, que resulten económicos y que sean muy eficaces para controlar los nematodos.

Se sabe que diversos microorganismos del suelo son parásitos o depredadores de los nematodos. La acción de estos microorganismos puede ser el resultado de un efecto directo o indirecto, y puede estar mediada por una interferencia con diversas etapas del ciclo de vida del patógeno.

Bacillus subtilis

Cuando *B. subtilis* se aplica sobre las semillas o sobre al tierra, los efectos beneficiosos que produce no solamente se deben al antagonismo sobre los patógenos, sino también a que esta bacteria tiene una influencia positiva sobre la germinación, el desarrollo y el rendimiento de los cultivos, lo cual puede atribuirse a la producción de sustancias que promueven el crecimiento y la mejora de la nutrición de la planta, principalmente merced a la solubilización del fósforo.

Género *Meloidogyne*

Los nematodos del género *Meloidogyne* (los nematodos de los nudos de las raíces) presentan una diversidad notable sobre las plantas que los hospedan y pueden hallarse en diversas regiones del mundo, donde provocan pérdidas en una variedad de cultivos. El síntoma principal es la presencia de agallas en las raíces de las plantas. Estas agallas toman la forma de deformaciones o espesamientos en el sistema radicular. Las plantas afectadas se debilitan, se caracterizan por una productividad baja, una defoliación temprana y una declinación prematura, y ocasionalmente

pueden perecer. Estos síntomas pueden potenciarse bajo condiciones de estrés a causa de la falta de nutrientes o de sequía.

Inicialmente, los juveniles de la segunda etapa (J2) de *Meloidogyne* penetran en las raíces y establecen un sitio de alimentación en la región del cilindro central. Durante el desarrollo de los nematodos, los juveniles J2 se desarrollan hasta producir machos o hembras adultas. Los machos adultos abandonan el sistema radicular, mientras que las hembras permanecen en las raíces. Durante su desarrollo, las hembras de *Meloidogyne* generan aproximadamente 500 huevos, que son depositados en una matriz gelatinosa en el exterior de las raíces. Una vez que eclosionan los huevos, surgen los juveniles J2, que infectan nuevamente el sistema radicular. El ciclo de vida de los nematodos de los nudos de las raíces tiene una duración aproximada de cuatro semanas, y puede desarrollarse bajo condiciones de temperatura poco favorables. Las temperaturas inferiores a 20°C o superiores a 35°C y las condiciones de sequía o de exceso de agua en el suelo pueden dar como resultado una demora en el desarrollo y una disminución en la supervivencia de los nematodos.

El control de *Meloidogyne incognita* y de *M. javanica* puede llevarse a cabo mediante el uso de sustancias químicas que contienen ingredientes activos determinados, tales como el carbofurano, el etoprofos, el aldicarb, el metam-sodio o el fenamifos, entre otros, en función del

cultivo en cuestión. La práctica de rotación en los cultivos también es importante en el control, debido a que de esta manera pueden desarrollarse cultivos diferentes del huésped, como es el caso del maní, el ananá o el arroz, o pueden emplearse plantas de otras especies como cobertura para el suelo, tales como la avena.

El nematodo *Meloidogyne exigua* es agresivo y se ha dispersado ampliamente en las plantaciones. Hay diversos métodos disponibles con los cuales es posible ejercer un control químico en las áreas que se encuentran infestadas por *M. exigua*, que incluyen el uso de sustancias químicas que contienen terbufos o carbofurano como ingrediente activo, en función del tipo de cultivo. Entre los cultivos diferentes del huésped que pueden mencionarse en este contexto se encuentran el algodón, el maní, el arroz y la avena.

Al igual que *M. exigua*, *M. paranaensis* se ha dispersado ampliamente en los cultivos de café, pero no es un problema tan severo en otros cultivos. Con relación a su control, se han obtenido resultados positivos mediante el uso del hongo *Paecilomyces lilacinus*, con el cual ha sido posible reducir las poblaciones de este nematodo en las raíces de tomates "Santa Clara" cultivados en invernaderos. El uso de las rizobacterias en el contexto del control biológico es conocido. Sin embargo, el solicitante ha desarrollado una composición que comprende dos cepas de *Bacillus*: *Bacillus subtilis* DSM 17231 (que también se

conoce como DSM 5750), o una mutante de ésta, y *Bacillus licheniformis* DSM 17236 (que también se conoce como DSM 5749), o una mutante de ésta, que presenta efectos nematocidas sobre los fitonematodos en las plantas de cultivo.

Por lo tanto, el primer aspecto de la invención se relaciona con las cepas o las mutantes novedosas que se describen en la presente.

Para aquellos versados en la técnica, ha de resultar evidente que, mediante el uso de las cepas que se han depositado como material de partida y procedimientos de mutagénesis o re-aislamiento convencionales, será posible desarrollar mutantes o derivados adicionales que retengan las características y las ventajas relevantes que se describen en la presente. En el contexto del primer aspecto, el término "mutante" hace referencia a una cepa mutante que puede obtenerse usando cualquiera de las cepas que se han depositado como material de partida.

En general, se considera que los fitonematodos tienen un impacto negativo sobre los cultivos comerciales. Los nematodos que pueden combatirse con una composición de acuerdo con la presente invención incluyen los nematodos de los géneros *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Heterodera*, *Globodera*, *Ditylenchus*, *Tylenchulus*, *Xiphinema*, *Radopholus*, *Rotylenchulus*, *Helicotylenchus* y *Belonolaimus*. Se considera que las especies del género *Meloidogyne* son particularmente relevantes, ya que dan cuenta de aproximadamente 95% del

total de infestaciones en los cultivos y de aproximadamente 5% de las pérdidas totales en los cultivos a nivel mundial. Además de los componentes activos, las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden contener excipientes, portadores y/o vehículos apropiados para aplicaciones agroquímicas.

En particular, las composiciones de acuerdo con esta invención son útiles para combatir los nematodos en las plantas de cultivo.

Entre las plantas de cultivo más importantes puede mencionarse la caña de azúcar, el café, la soja, el algodón, el maíz, la papa, el tomate, el tabaco, la banana, el arroz, el trigo, el avocado, el ananá, el zapallo, el cacao, el coco, la avena, la cebolla, la lechuga, el yute, la zanahoria, la casava, el haba, el girasol, el pimiento, el nabo, la manzana, la frutilla, la okra y el rábano.

En el contexto de la fruticultura, puede mencionarse el pomelo, la vid, la guava, la papaya, el higo, el durazno, la ciruela y la néspera. En el contexto de la horticultura, puede mencionarse la berenjena y las crucíferas.

En el contexto de la floricultura, puede mencionarse la rosa, el crisantemo, el lisianto, la margarita, *Amaryllis*, la begonia y la celosía.

La presente invención está relacionada con una composición que comprende *Bacillus subtilis* DSM 17231, o una mutante de ésta, y *Bacillus licheniformis* DSM 17236, o una mutante de ésta, y con un conjunto de elementos que

comprende una composición como la que se ha mencionado o una composición que puede prepararse con el proceso de elaboración que se describe en la presente, además de instrucciones y un recipiente apropiado.

También se provee un proceso con el que puede prepararse una composición que comprende *Bacillus subtilis* DSM 17231, o una mutante de ésta, y *Bacillus licheniformis* DSM 17236, o una mutante de ésta, junto con vehículos, portadores y/o coadyuvantes aceptables para aplicaciones agroquímicas, así como el uso de dicha composición en el control y/o el combate de los fitonematodos y/o en la introducción de una resistencia específica a ellos.

Por otro lado, la invención está relacionada con el uso de una cantidad eficaz de *Bacillus subtilis* DSM 17231, o de una mutante de ésta, y de *Bacillus licheniformis* DSM 17236, o de una mutante de ésta, en la manufactura de una composición agroquímica que presenta efectos nematocidas sobre los fitonematodos en las plantas de cultivo. La invención también está relacionada con procesos para controlar y/o combatir los fitonematodos y/o para conferir una resistencia específica a ellos.

Los ejemplos ilustrativos que se proveen a continuación tienen por objeto describir la presente invención con mayor detalle. En este contexto, las formulaciones que se describen pueden ser meras referencias a algunos medios relacionados con determinadas formas de realización de la presente invención, por lo que no han de

ser interpretados como una limitación para su alcance.

EJEMPLOS

Composición de acuerdo con la invención

Bacillus subtilis (DSM 17231): 1,6 x 10¹⁰ cfu/g

Bacillus licheniformis (DSM 17236): 1,6 x 10¹⁰ cfu/g

Ingredientes	Porcentaje mínimo (%)	Porcentaje máximo (%)
<i>Bacillus subtilis</i> (DSM 17231)	2,4	3,0
<i>Bacillus licheniformis</i> (DSM 17236)	2,4	3,0
Maltodextrina	94,2	93,0
Dióxido de silicio	1,0	1,0

Esta composición puede ser empleada como un polvo mojable. Sin embargo, esta composición también puede proveerse en cualquier otra forma apropiada, por ejemplo, en forma de un polvo, de una solución, de una suspensión o de gránulos, entre otros.

Condiciones de operación de los procesos de mezcla en la manufactura

Presentación de los ingredientes/materiales

La receta es elaborada por personal capacitado en la verificación de los artículos recibidos. De acuerdo con el objetivo de la elaboración, se envía una lista de ingredientes y de las cantidades en que han de ser usados a la fábrica.

Pesaje de los ingredientes/materiales

Los ingredientes se reciben en la fábrica, se pesan y se colocan en una mezcladora de acero inoxidable.

Mezcla

Los ingredientes se mezclan después de someterlos al tratamiento que se describe en el SOP (procedimiento de operación convencional).

Análisis

Se toman muestras para determinar la cantidad de colonias, lo cual se expresa en cfu/g.

Embotellado

El producto se coloca en bolsas con una capacidad de 20 kg que comprenden una lámina de protección interna, o bien en recipientes de polietileno con una capacidad de 1,0 ó 5,0 kg.

Cierre

Las bolsas se cierran y se sellan. Los recipientes se sellan con un tapón y se someten a un procedimiento de inducción magnética.

Tratamiento con paletas

Los productos envasados se colocan en paletas de madera para someterlos a un control de calidad (QC).

Almacenaje

El producto final se almacena, se sella y se identifica apropiadamente. Cada lote se registra con un programa electrónico que se encuentra disponible para todos los operadores en cada sector de interés.

Despacho

Una vez que es liberado por el área de QC, el producto permanece en el almacén de despacho hasta el momento de la comercialización.

En la figura 1 se representa un diagrama de flujo de este proceso.

Análisis in vitro

Análisis 1

El objetivo fue analizar el efecto in vitro de los productos biológicos basados en bacterias *Bacillus*, en el contexto del control de fitonematodos como *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. paranaensis*.

Materiales y métodos

Se analizaron fitonematodos de tres especies del género *Meloidogyne*: *M. incognita*, *M. javanica* y *M. paranaensis*, y dos productos biológicos en dos dosis diferentes: un producto japonés que estaba basado en una especie de *Bacillus* y el producto Nemix®, que está compuesto por *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*, con 97,8% de lactosa y dióxido de silicio. El nematicida que se empleó como referencia para la efectividad fue 150G TEMIK® (aldicarb), cuyas características se detallan a continuación:

- Marca: TEMIK® 150,
- Proveedor: Bayer CropScience, Ltd.,
- Calificación: acaricida, insecticida, nematicida,
- Formulación: GR - Granular,
- Ingrediente activo (i.a.): aldicarb,

- Concentración del i.a: 150 g/kg,
- Método de aplicación: sobre la tierra,
- Modo de empleo: en el suelo,
- Clasificación toxicológica: I - extremadamente tóxico.

En el experimento, se emplearon seis tratamientos:

- Agua: control absoluto,
- P1D2: el producto japonés en una dosis de $2 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$,
- P1D4: el producto japonés en una dosis de $4 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$,
- El producto Nemix en una dosis de $2 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$,
- El producto Nemix en una dosis de $4 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$,
- El nematicida aldicarb (TEMIK® 150G) en una dosis de $15 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$.

Análisis para evaluar la actividad de los productos sobre los nematodos

Obtención de los juveniles de la segunda etapa de *Meloidogyne*

Se lavaron raíces de café y de tomate que habían sido infectadas con diversas especies de *Meloidogyne* para remover el exceso de tierra adherida. Posteriormente, se las cortó y se las procesó en una licuadora, según se ha descrito (Boneti, J. I. S., y Ferraz, S., Modificação de método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, Brasília, DF, v. 6, N° 3, p. 553, 1981).

Las raíces fueron cortadas en fragmentos con una longitud aproximada de 1 cm. Éstos se colocaron en una licuadora que había sido rellena con una solución de

hipoclorito de sodio con cloro activo al 0,5%, con el propósito de cubrir el material. En promedio, la licuadora fue accionada a la velocidad más baja durante 40 segundos. Luego se hizo pasar la suspensión a través de un tamiz de malla 100 que estaba superpuesto sobre un tamiz de malla 500. Se recolectó el residuo del tamiz de malla 500 mediante el uso de un chorro de agua, y posteriormente se lo colocó cuidadosamente en un recipiente de Becker, de manera tal que el volumen final fuera lo más concentrado posible.

Las suspensiones se centrifugaron durante 5 minutos a 650 gravedades. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante y se limpió la pared interna del tubo de la centrífuga para remover las impurezas orgánicas.

Al residuo en cada tubo se le agregó una solución de sacarosa (que comprendió 454 g de azúcar en un litro de agua), se mezcló y se accionó la centrífuga a la velocidad que se ha mencionado durante 1 minuto.

El sobrenadante se hizo pasar a través de un tamiz de malla 500, se lo lavó con agua para remover el exceso de sacarosa y se lo colocó en un recipiente de Becker con la ayuda de un chorro de agua, que se aplicó con una pipeta. Se colocaron placas de Petri con un diámetro de 5 cm en el interior de una lámina de nylon que contenía una capa de papel para el cuidado facial. La suspensión que comprendía los huevos se colocó sobre la capa de papel. Las placas de Petri se introdujeron en una incubadora a 30°C durante 24

horas. Una vez transcurridas 24 horas, se suspendió el sustrato que contenía el tejido mediante el uso de fórceps, se removi6 el fluido del interior de la placa de Petri, se lo coloc6 en una placa de Becker y se lo lav6 con agua. Se reemplaz6 el sustrato por un filtro de papel y se agreg6 agua. Las placas permanecieron en la incubadora durante 48 horas.

Despu6s de 48 horas, se removieron los sustratos y se coloc6 el l6quido en un recipiente de Becker con la ayuda de un chorro de agua, que se aplic6 con una pipeta. Las suspensiones fueron calibradas de manera tal que comprendieran 250, 50, 20 6 100 juveniles de la segunda etapa de *Meloidogyne incognita*, de *M. javanica* o de *M. paranaenses* por ml para luego emplearlas en el an6lisis in vivo.

Instalaci6n y evaluaci6n in vitro

En placas de Petri que ten6an un di6metro de 11 cm, que conten6an una capa de agua con 2% de agar, se coloc6 1 ml de la suspensi6n que comprend6a los juveniles de la segunda etapa y 1 ml de cada uno de los tratamientos que se deseaba evaluar: una soluci6n que comprendi6 TEMIK® 150G (un nematicida) en agua destilada, dos soluciones que comprendieron el producto japon6s basado en *Bacillus* en sendas concentraciones y dos soluciones que comprendieron el producto Nemix en sendas concentraciones. Se realiz6 una mezcla exhaustiva mediante la aplicaci6n de agitaci6n. Las placas se mantuvieron en una incubadora a 30°C durante 7 d6as.

Una vez transcurridos 7 días, se examinó cada placa bajo una lupa para contar los nematodos y para verificar su estado.

Análisis para determinar la inhibición de la eclosión de juveniles de la segunda etapa de *Meloidogyne*

Se prepararon raíces de café y de tomate mediante el uso de una licuadora (Boneti, J. I. S., y Ferraz, S., Modificação de método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, Brasília, DF, v. 6, N° 3, p. 553, 1981), según se describió en la sección correspondiente a la obtención de los juveniles de la segunda etapa de *Meloidogyne*.

Las suspensiones fueron calibradas de manera tal que comprendieran 1500 huevos/ml, 100 huevos/ml, 500 huevos/ml o 200 huevos/ml de *M. incognita*, de *M. javanica* o de *M. paranaensis*.

Instalación y evaluación in vitro

Se colocó 1 ml de cada uno de los tratamientos que se deseaba analizar y 1 ml de la suspensión que comprendía los huevos en placas de Petri con un diámetro de 5 cm en cuyo interior había una lámina de nylon con una capa de pañuelos de papel humedecidos. Las placas se mantuvieron en una incubadora a 30°C durante 7 días.

Una vez transcurridos 7 días, se removieron los sustratos, se recolectó el líquido de cada placa y se lo colocó en un recipiente con la ayuda de un chorro de agua,

que se aplicó con una pipeta.

Cada suspensión se examinó bajo un microscopio que contenía una recámara de conteo, con el objeto de verificar y contar los juveniles J₂ de *Meloidogyne*.

Diseño y análisis estadístico

El experimento estuvo basado en un diseño con una distribución completamente al azar, con seis tratamientos y cinco réplicas para cada nematodo. Cada placa de Petri fue una unidad experimental.

Los datos fueron sometidos a los procedimientos estadísticos del programa Sisvar (Ferreira, D. F., Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0., REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA., 45, 2000, São Carlos: UFSCar, 2000, p. 255-258, 2000). En el análisis estadístico, se sometieron los datos a un análisis de la varianza y se compararon las medias con una prueba de Scott-Knott, con un nivel de probabilidad de 5% (los resultados que no difirieron de manera significativa en la estadística están indicados con letras minúsculas idénticas en las figuras). Cuando se analizó el efecto de los plaguicidas en el contexto del control de los nematodos, se calculó el porcentaje de inhibición del movimiento y el porcentaje de inhibición de la eclosión de los juveniles. La fórmula que se empleó en los cálculos se detalla a continuación:

$$\frac{(B-A)}{B} \times 100$$

B,

donde

A representa la cantidad de nematodos activos o la cantidad de nematodos que eclosionaron en cada repetición de cada tratamiento y

B representa la cantidad de nematodos que se usaron en el análisis para determinar la inhibición del movimiento o la inhibición de la eclosión.

Resultados y discusión

En las figuras 2 y 3 se ilustra el efecto de inhibición del movimiento (figura 2) y la eclosión (figuras 3) de los nematodos *M. incognita* (A), *M. javanica* (B) y *M. paranaensis* (C) que se obtuvo con los diversos nematicidas. Sobre la base de los datos que se proveen en la figura 2A, puede comprobarse que el nematicida TEMIK® difirió de manera significativa de los otros tratamientos, ya que presentó el mejor desempeño en el contexto de la mortalidad y la inhibición de la eclosión de los juveniles de *M. incognita*. Con relación a la inhibición de la eclosión de los juveniles, se observó que los tratamientos no difirieron del control, y que solamente el tratamiento químico con TEMIK® dio como resultado una reducción en la eclosión.

Con relación a la inhibición de *Meloidogyne javanica*, no se observaron diferencias significativas entre los productos biológicos que se analizaron y TEMIK®, por lo que puede concluirse que los productos biológicos no tuvieron un efecto satisfactorio en el contexto de la inhibición del

movimiento de los nematodos (figura 2B). El efecto sobre la eclosión no fue significativo, y solamente el producto químico TEMIK dio como resultado una inhibición de la eclosión (figura 3B).

En el contexto de la inhibición de *Meloidogyne paranaensis*, con la dosis de 4 kg·ha⁻¹ de Nemix se obtuvo un resultado que no difirió de manera significativa del que se obtuvo con el nematicida (figura 2C). Se obtuvo un efecto menor con el producto japonés en las dosis de 2 y 4 kg·ha⁻¹, con Nemix en una dosis de 2 kg·ha⁻¹ y con la totalidad de los productos orgánicos, todos los cuales igualmente presentaron un efecto superior al del tratamiento de control. Con relación a la inhibición de la eclosión de los juveniles, el producto Nemix presentó un efecto similar en cualquiera de las dos dosis que se emplearon, y el resultado que se obtuvo con él fue superior al de los productos biológicos que se analizaron (figura 3C). Todos los productos que se analizaron difirieron del control absoluto, y el efecto nematicida fue superior al de los otros tratamientos.

Los productos TEMIK® y Nemix, en una dosis de 4 kg·ha⁻¹, fueron los más eficaces y no difirieron de manera significativa en el contexto de la mortalidad que indujeron sobre *M. parananensis*. Con relación a la inhibición de la eclosión, el resultado que se obtuvo con TEMIK® fue significativamente superior al que se obtuvo con cualquiera de los otros tratamientos. En este contexto, el producto

Nemix fue más eficaz que el producto japonés (figura 3C).

De esta manera, puede concluirse que la composición Nemix dio como resultado una inhibición significativa de los nematodos *M. javanica* y *M. paranaensis*, que fue comparable a la que se obtuvo con el producto químico TEMIK.

Análisis 2

El objetivo fue evaluar el efecto de diversas dosis del producto biológico Nemix, que comprende *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*, sobre la penetración de *Meloidogyne javanica* en raíces de tomate, bajo condiciones de invernadero.

Obtención del inóculo

El inóculo se obtuvo procesando muestras de raíces de café que habían sido infectadas por *M. javanica*. Las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Agricultura del Instituto de Ciencias Agrícolas para procesarlas. Las raíces se cortaron en fragmentos de 2 cm y se colocaron en una taza común que contenía una solución de hipoclorito de sodio (1 parte de lavandina y 4 partes de agua).

La solución se centrifugó durante 20 segundos. Después de este período, la suspensión se hizo pasar a través de un conjunto de tamices superpuestos de malla 200 y 500. Se recolectó el residuo del tamiz de malla 500 con la ayuda de un chorro de agua y se lo colocó en un frasco. La suspensión obtenida fue calibrada de manera tal que contuviera 800 huevos de los nematodos por ml.

Instalación y protocolo del análisis

El experimento estuvo basado en un diseño con una distribución completamente al azar, con cinco tratamientos y cinco réplicas.

El cultivar de tomate que se empleó fue “Santa Cruz Kada Gigante”. Las dosis que se usaron del producto biológico NEMIX fueron de 4, 6 y 8 kg·ha⁻¹. Como verificación, se usó el nematicida aldicarb (TEMIK® 20 G, 150 kg·ha⁻¹). Como control, se emplearon plantas de tomate a las que no se les agregó producto alguno. Para determinar la penetración de referencia, se usó el nematodo parásito de las plantas *M. javanica*.

Las semillas del cultivar de tomate “Santa Cruz Kada Gigante” fueron cultivadas en bandejas de espuma de estireno que comprendieron 128 celdas que estuvieron rellenas con el sustrato Plantamax®. Para llevar a cabo la inoculación, se perforaron tres orificios con una profundidad de 2 cm y una separación de 2 cm con relación al tallo de los retoños. En estos tres orificios, se distribuyeron 5 ml de la suspensión que había sido calibrada con el inóculo (4000 nematodos por recipiente plástico). Inmediatamente después, se agregaron las dosis de los productos, a través de recipientes plásticos pequeños que se colocaron en los orificios alrededor de cada retoño.

Evaluación de la penetración de los juveniles de la segunda etapa de *M. javanica* en las raíces del tomate

La evaluación se llevó a cabo 3 semanas después de la inoculación. Las raíces se separaron de los brotes y se extrajeron del suelo según se ha descrito (Byrd Jr. et al., An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. Journal of Nematology, Lakeland, v. 5, N° 1, p. 142-143, 1983), con el propósito de aplicar una coloración para los nematodos sobre los tejidos vegetales. Las raíces fueron cortadas en trozos de 1-2 cm y fueron transferidas a un recipiente de Becker de 50 ml que comprendía agua y 20 ml de lavandina comercial (con 5,25% de NaOCl), por lo que comprendía una concentración final de 1,5% de NaOCl. Los segmentos de las raíces permanecieron en esta solución durante 6 minutos. Durante este período, se los agitó manualmente durante 10 segundos a intervalos de 1 minuto. Las raíces se lavaron con agua corriente durante un período de entre 30 y 45 segundos, y se mantuvieron en reposo en agua durante 15 segundos para remover el hipoclorito de sodio residual.

Luego se llevó a cabo un drenaje completo y se agregaron 30 ml de agua destilada más 1 ml de una solución colorante (que comprendió 3,35 g de fucsina ácida, 25 ml de ácido acético glacial y 75 ml de agua). La solución que comprendía las raíces fue calentada hasta el punto de ebullición y fue mantenida a esta temperatura durante 30 segundos, inmediatamente después de lo cual se colocó el recipiente en una mesada hasta que alcanzara la temperatura ambiente. Posteriormente, se removió la solución colorante

remanente, se lavó el material con agua corriente y se lo colocó en 20-30 ml de glicerina acidificada con unas pocas gotas de HCl 5 N. Los segmentos de las raíces se comprimieron entre dos portaobjetos y se observaron bajo un microscopio óptico. Se contaron los juveniles de la segunda etapa que penetraron en las raíces.

Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a los procedimientos estadísticos del programa Sisvar (Ferreira, D. F., Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0., REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA., 45, 2000, São Carlos: UFSCar, 2000, p. 255-258, 2000). En el análisis estadístico, las medias fueron comparadas con una prueba de Tukey, con un nivel de probabilidad de 5%.

Resultados y discusión

Sobre la base de los datos que se proveen en la tabla 3, puede concluirse que la penetración de los juveniles de la segunda etapa de *M. javanica* se vio afectada por todos los tratamientos, en comparación con el control al que no se le agregó producto alguno. El tratamiento con el producto aldicarb en una dosis de 20 kg·ha⁻¹ dio como resultado la penetración más baja. De las diversas dosis de NEMIX que se emplearon, la que brindó el mejor resultado, es decir, la inhibición más alta, fue la de 8 kg·ha⁻¹.

Tabla 3. Cantidad de juveniles de la segunda etapa de *Meloidogyne javanica* que penetraron en las raíces del

cultivar de tomate "Santa Cruz Kada Gigante" 3 semanas después de la inoculación y porcentaje de penetración; Uberlândia, UFU, 2007

Productos	Cantidad de nematodos que penetraron	% de penetración	% de inhibición de la penetración
Aldicarb (TEMIK, 150 G® 20 kg·ha ⁻¹ ¹⁾)	10,20* a**	0,26***a	88,00
<i>Bacillus</i> spp. (NEMIX, 8 kg·ha ⁻¹)	28,80 b	0,72 b	66,12
<i>Bacillus</i> spp. (NEMIX, 6 kg·ha ⁻¹)	50,40 c	1,26 c	40,70
<i>Bacillus</i> spp. (NEMIX, 4 kg·ha ⁻¹)	62,20 d	1,57 d	26,82
Control (sin la aplicación de producto alguno)	85,00 e	2,13 e	-

C.V. (%): 12,5

* Promedio de cinco réplicas

** Las medias en las columnas que están seguidas por la misma letra no difirieron en la prueba de Tukey, con un nivel de probabilidad de 5%

*** % de penetración = cantidad de juveniles J₂/4000 huevos
Se determinó que el porcentaje de penetración de los nematodos varió desde 0,26, que se obtuvo con la dosis de

aldicarb, hasta 2,13, que se obtuvo en el control al que no se le aplicó producto alguno.

Con relación al producto biológico, es posible que haya afectado la orientación de los juveniles de la segunda etapa de *M. javanica* y haya provocado su dispersión, de manera tal de impedir su penetración. Como alternativa, es posible que la penetración se haya reducido a causa de una interferencia con el proceso de emergencia de los juveniles de *M. javanica*. Aun otra posibilidad es que los compuestos que hayan sido absorbidos por los huevos hayan inactivado los nematodos o hayan provocado deformaciones durante el desarrollo que hayan impedido la eclosión.

De las tres dosis que se evaluaron del producto biológico que estaba basado en *Bacillus* spp., la dosis de 8 kg·ha⁻¹ dio como resultado la mayor reducción en la penetración de los juveniles de la segunda etapa de *M. javanica* en las raíces del cultivar de tomate "Santa Cruz Kada Gigante", con una penetración de 0,72 por ciento.

Análisis 3

El objetivo fue evaluar la penetración de *Meloidogyne exigua* en raíces de tomate que fueron expuestas a diversas dosis de un producto biológico basado en *Bacillus* spp., bajo condiciones de invernadero.

Obtención del inóculo

El inóculo se obtuvo procesando muestras de raíces de café que habían sido infectadas por *M. javanica*. Las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Agricultura del

Instituto de Ciencias Agrícolas para procesarlas. Las raíces se cortaron en fragmentos de 2 cm y se colocaron en una taza común que contenía una solución de hipoclorito de sodio (1 parte de lavandina y 4 partes de agua).

La solución se centrifugó durante 20 segundos. Después de este período, la suspensión se hizo pasar a través de un conjunto de tamices superpuestos de malla 200 y 500. Se recolectó el residuo del tamiz de malla 500 con la ayuda de un chorro de agua y se lo colocó en un frasco (Boneti, J. I. S., Ferraz, S., Modificação de método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, Brasília, DF, v.6, n.3, 553p., 1981). La suspensión obtenida fue calibrada de manera tal que contuviera 800 huevos de los nematodos por ml.

Instalación y protocolo del análisis

El experimento estuvo basado en un diseño con una distribución completamente al azar, con cinco tratamientos y cinco réplicas. El tomate que se empleó comprendió el genotipo "Santa Cruz Kada Gigante". Las dosis que se usaron del producto biológico NEMIX fueron de 4, 6 y 8 kg·ha⁻¹. Como verificación, se usó el nematicida comercial aldicarb (TEMIK® 150 G) en una dosis de 20 kg por hectárea. Como control para determinar la penetración de referencia, se emplearon plantas de tomate a las que no se les agregó producto alguno.

Las semillas del cultivar de tomate "Santa Cruz Kada

Gigante" fueron cultivadas en bandejas de espuma de estireno que comprendieron 128 celdas. Después de 8 días, los retoños se transplantaron a recipientes de plástico con una capacidad de 500 ml que habían sido rellenos con el sustrato Plantamax®. Para llevar a cabo la inoculación, se perforaron tres orificios con una profundidad de 2 cm y una separación de 2 cm con relación al tallo de los retoños. En estos tres orificios, se distribuyeron 5 ml de la suspensión que había sido calibrada con el inóculo (4000 nematodos por recipiente plástico). Inmediatamente después, se colocaron las dosis del producto basado en *Bacillus* spp. en los recipientes de plástico mediante la aplicación de presión. El nematicida aldicarb también fue colocado en los orificios alrededor de cada retoño inmediatamente después de la inoculación.

Evaluación de la penetración de los juveniles de la segunda etapa de *M. exigua* en las raíces

La evaluación se llevó a cabo 3 semanas después de la inoculación. Las raíces se separaron de los brotes y se extrajeron del suelo según se ha descrito (Byrd Jr. et al., An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. Journal of Nematology, Lakeland, v. 5, N° 1, p. 142-143, 1983), con el propósito de aplicar una coloración para los nematodos sobre los tejidos vegetales. Las raíces fueron cortadas en trozos de 1-2 cm y fueron transferidas a un recipiente de Becker de 50 ml que comprendía agua y 20 ml de lavandina comercial

(con 5,25% de NaOCl), por lo que comprendía una concentración final de 1,5% de NaOCl. Los segmentos de las raíces permanecieron en esta solución durante 6 minutos. Durante este período, se los agitó manualmente durante 10 segundos a intervalos de 1 minuto. Las raíces se lavaron con agua corriente durante un período de entre 30 y 45 segundos, y se mantuvieron en reposo en agua durante 15 segundos para remover el hipoclorito de sodio residual.

Luego se llevó a cabo un drenaje completo y se agregaron 30 ml de agua destilada más 1 ml de una solución colorante (que comprendió 3,35 g de fucsina ácida, 25 ml de ácido acético glacial y 75 ml de agua). La solución que comprendía las raíces fue calentada hasta el punto de ebullición y fue mantenida a esta temperatura durante 30 segundos, inmediatamente después de lo cual se colocó el recipiente en una mesada hasta que alcanzara la temperatura ambiente. Posteriormente, se removi6 la solución colorante remanente, se lavó el material con agua corriente y se lo colocó en 20-30 ml de glicerina acidificada con unas pocas gotas de HCl 5 N. Los segmentos de las raíces se comprimieron entre dos portaobjetos y se observaron bajo un microscopio óptico. Se contaron los juveniles de la segunda etapa que penetraron en las raíces.

Temperaturas máximas y mínimas del aire en el interior del invernadero

Se registraron las temperaturas máximas y mínimas del aire en el interior del invernadero para poder calcular el

promedio durante la totalidad del experimento.

Los promedios de las temperaturas máximas y mínimas del aire fueron de 35,9°C y 15,3°C, respectivamente.

Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a los procedimientos estadísticos del programa Sisvar (Ferreira, D. F., Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0., REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA., 45, 2000, São Carlos: UFSCar, 2000, p. 255-258, 2000) para verificar la homogeneidad de la varianza y la normalidad de los errores. En el análisis estadístico, las medias fueron comparadas con una prueba de Tukey, con un nivel de probabilidad de 5%.

Resultados y discusión

Sobre la base de los datos que se proveen en la tabla 4 y se ilustran en la figura 3, puede concluirse que la penetración de los juveniles de la segunda etapa de *M. exigua* se vio afectada de manera significativa por todos los tratamientos, en comparación con el control al que no se le agregó producto alguno. El tratamiento con el producto aldicarb (TEMIK) en una dosis de 20 kg·ha⁻¹ dio como resultado la penetración más baja. De las diversas dosis de NEMIX que se emplearon, la que brindó el mejor resultado fue la de 8 kg·ha⁻¹, con un porcentaje de inhibición de 54,13%, particularmente en comparación con el nematicida aldicarb, que dio como resultado una inhibición significativa de 81,95%.

Tabla 4. Cantidad de juveniles de la segunda etapa de *Meloidogyne exigua* que penetraron en las raíces del cultivar de tomate “Santa Cruz Kada Gigante” 3 semanas después de la inoculación y porcentaje de penetración; Uberlândia, UFU, 2007

Productos	Cantidad de juveniles J ₂ de <i>M. exigua</i> que penetraron	Porcentaje	
		Penetración	Inhibición de la penetración
Aldicarbe (TEMIK® 150 G, 20 kg·ha ⁻¹)	19,40* a**	0,48***	81,95***
<i>Bacillus</i> spp. (NEMIX, 8 kg·ha ⁻¹)	49-00* b**	1,22***	54,13***
<i>Bacillus</i> spp. (NEMIX, 6 kg·ha ⁻¹)	66,20* c**	1,65***	37,97***
<i>Bacillus</i> spp. (NEMIX, 4 kg·ha ⁻¹)	81,00* c**	2,02***	24,06***
Control (sin aplicación)	106,60* d**	2,66***	-----***

C.V. (%): 13,04

* Promedio de cinco repeticiones

** Las medias en las columnas que están seguidas por la misma letra no difirieron en la prueba de Tukey, con un nivel de probabilidad de 5%

*** % de penetración = cantidad de juveniles J_2 /4000 huevos

*** Los valores fueron comparados con la población inicial de 4000 huevos de *M. exigua*

También se observó que no hubo diferencias entre los efectos que se obtuvieron con las dosis de 4 y 6 kg·ha⁻¹ del producto NEMIX, con porcentajes de penetración de 1,65% y 2,02%, respectivamente. Con relación al patrón, el porcentaje de penetración de los nematodos varió desde 0,48% en el control hasta 2,66% en la población inicial.

Sobre la base del efecto que presentaron los plaguicidas sobre la migración de *M. exigua*, puede demostrarse que hubo una interferencia con la dirección, que dio como resultado la dispersión de los juveniles. La reducción con relación al control en la presencia de juveniles que penetraron en las raíces del tomate también podría deberse a una interferencia con los procesos de eclosión y orientación de los juveniles de *M. exigua*.

La hipótesis de que la reducción en la penetración en las raíces se debe a la capacidad de las bacterias que están presentes en los productos de unirse a las lectinas en la superficie o de conectarse con ellas es poco probable, ya que se trata de bacterias Gram positivas.

Las temperaturas en el interior del invernadero también pueden haber influido en la penetración de los

juveniles en las raíces. De acuerdo con algunos autores, la acción antagónica que presentan algunos microorganismos sobre las poblaciones de *Meloidogyne spp.* es mayor a una temperatura de 23 y 25°C que a una temperatura de 18-32°C (Al-Hazmi, A. S., Schmitt, D. P., Sasser, J. N., The effect of *Arthrobotrys conoides* on *Meloidogyne incognita* populations densities in corn as influenced by temperature, fungus inoculum density and fungus introduction in the soil. Journal of Nematology, DeLeon Springs, v. 14, N° 2, p. 168-174, Abril de 1982).

Entre las tres dosis que se analizaron del producto basado en *Bacillus spp.*, la dosis de 8 kg·ha⁻¹ resultó la más eficaz para reducir la penetración de los juveniles de la segunda etapa de *M. exigua* en las raíces de tomate del cultivar "Santa Cruz Kada Gigante", con un porcentaje de penetración de 1,22% y un porcentaje de inhibición de 54,13%.

Conclusión

La combinación específica de una cepa de *Bacillus subtilis* con una cepa de *Bacillus licheniformis*, por ejemplo, *Bacillus subtilis* DSM 17231 y *Bacillus licheniformis* DSM 17236, resultó ser una alternativa válida para diversos productos nematicidas químicos, y también fue superior a diversos productos biológicos que se encuentran disponibles en la actualidad. El efecto de las dos cepas combinadas resulta beneficioso para inhibir los nematodos que provocan pérdidas en los cultivos.

DEPÓSITOS Y SOLUCIÓN DEL EXPERTO

El solicitante solicita que, hasta la fecha en la que se otorgue la patente, las muestras de los microorganismos depositados que se detallan más adelante solamente les sean provistas a los expertos.

La cepa de *Bacillus subtilis* fue depositada el 7/4/2005 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig (DSMZ), bajo el número de acceso DSM 17231.

La cepa de *Bacillus licheniformis* fue depositada el 7/4/2005 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig (DSMZ), bajo el número de acceso DSM 17236.

Los depósitos fueron realizados de acuerdo con el tratado de Budapest para el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para propósitos de procedimientos de patentes.

REFERENCIAS

EP 0705807

BR PI 0604602-9

Siddiqui y Mahmood (1999). Bioresource Technology 69; 167-179

REIVINDICACIONES

1. Una composición que como ingredientes activos comprende una cepa de *Bacillus subtilis* que tiene las características de la cepa que fue depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen bajo el número de acceso DSM 17231, o de una mutante de ésta, donde la mutante puede obtenerse usando la cepa depositada como material de partida, y donde la mutante presenta propiedades nematocidas idénticas o superiores a las de DSM 17231, una cepa de *Bacillus licheniformis* que tiene las características de la cepa que fue depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen bajo el número de acceso DSM 17236, o de una mutante de ésta, donde la mutante puede obtenerse usando la cepa depositada como material de partida, y donde la mutante presenta propiedades nematocidas idénticas o superiores a las de DSM 17236, y excipientes y/o vehículos apropiados para aplicaciones agroquímicas.

2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las cepas de *Bacillus subtilis* y de *Bacillus licheniformis* en una mezcla con maltodextrina y dióxido de silicio, donde dichos componentes están presentes entre una proporción mínima de 2,4 (%), 2,4 (%), 94,2 (%) y 1,0 (%), respectivamente, y una proporción máxima de 3,0 (%), 3,0 (%), 93,0 (%) y 1,0(%), respectivamente.

3. Una composición de acuerdo con cualquiera de

las reivindicaciones 1 y 2, que toma la forma de un polvo mojable.

4. Un proceso para elaborar una composición como la que se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende mezclar las cepas de *Bacillus subtilis* y de *Bacillus licheniformis*, en las proporciones deseadas y en cantidades eficaces para la aplicación, junto con vehículos, portadores y/o coadyuvantes apropiados para aplicaciones agroquímicas.

5. El uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o de una composición que puede obtenerse con un proceso como el que se define en la reivindicación 4 en el control y/o el combate de los fitonematodos y/o en la introducción de una resistencia específica a ellos.

6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde los fitonematodos se seleccionan del grupo que consiste en *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Heterodera*, *Globodera*, *Ditylenchus*, *Tylenchulus*, *Xiphinema*, *Radopholus*, *Rotylenchulus*, *Helicotylenchus* y *Belonolaimus*.

7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el fitonematodo se selecciona del grupo que consiste en *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne exigua*, *Meloidogyne paranaensis*, *Heterodera glycines* y *Pratylenchus zeae*.

8. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde la planta de cultivo se

selecciona del grupo que consiste en la caña de azúcar, la soja, la papa, la zanahoria, el café y la banana.

9. Un proceso para controlar y/o combatir los fitonematodos en las plantas y/o en su hábitat, donde se permite que una composición como la que se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 actúe sobre los fitonematodos y/o sobre su hábitat.

10. Un proceso para conferir resistencia específica a los fitonematodos, que comprende aplicar una cantidad eficaz de una composición como la que se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 sobre las plantas y/o sobre su hábitat.

11. Un conjunto de elementos que comprende una composición como la que se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una composición que puede obtenerse con un proceso como el que se define en la reivindicación 4, instrucciones y un recipiente apropiado.

RESUMEN

Composición que comprende *Bacillus subtilis* (DSM 17231) y *Bacillus licheniformis* (DSM 17236), que presenta efectos nematocidas sobre los fitonematodos en las plantas y/o en su hábitat. Su uso. Proceso para elaborarla. Uso de *Bacillus subtilis* (DSM 17231) y de *Bacillus licheniformis* (DSM 17236). Procesos para controlar y combatir los fitonematodos y para conferir una resistencia específica a ellos. Conjunto de elementos.

Figura 1

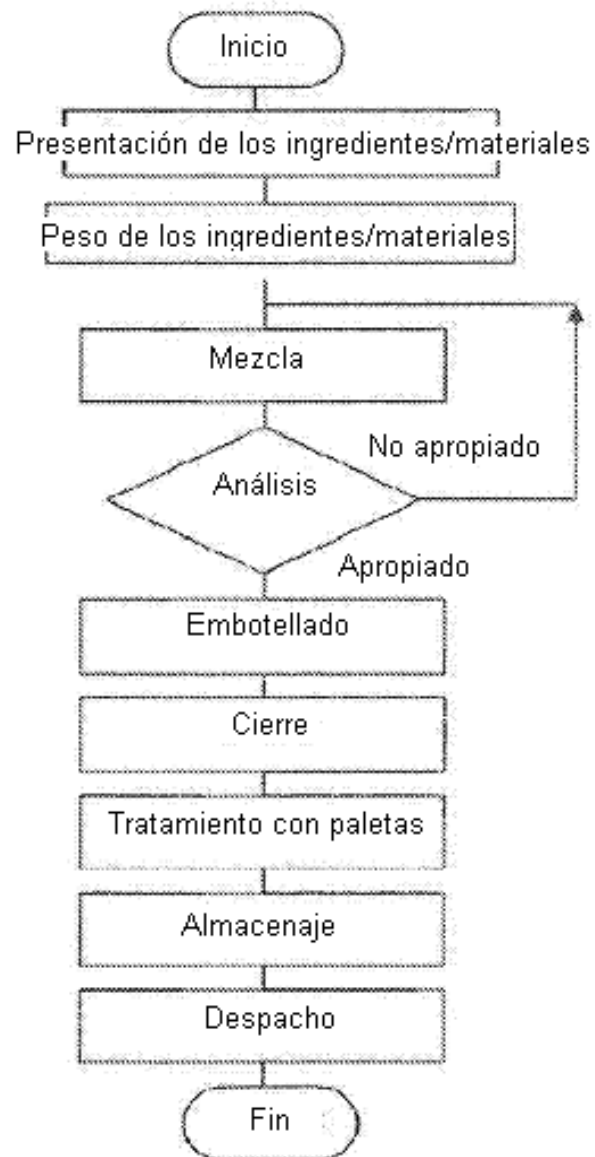


Figura 2

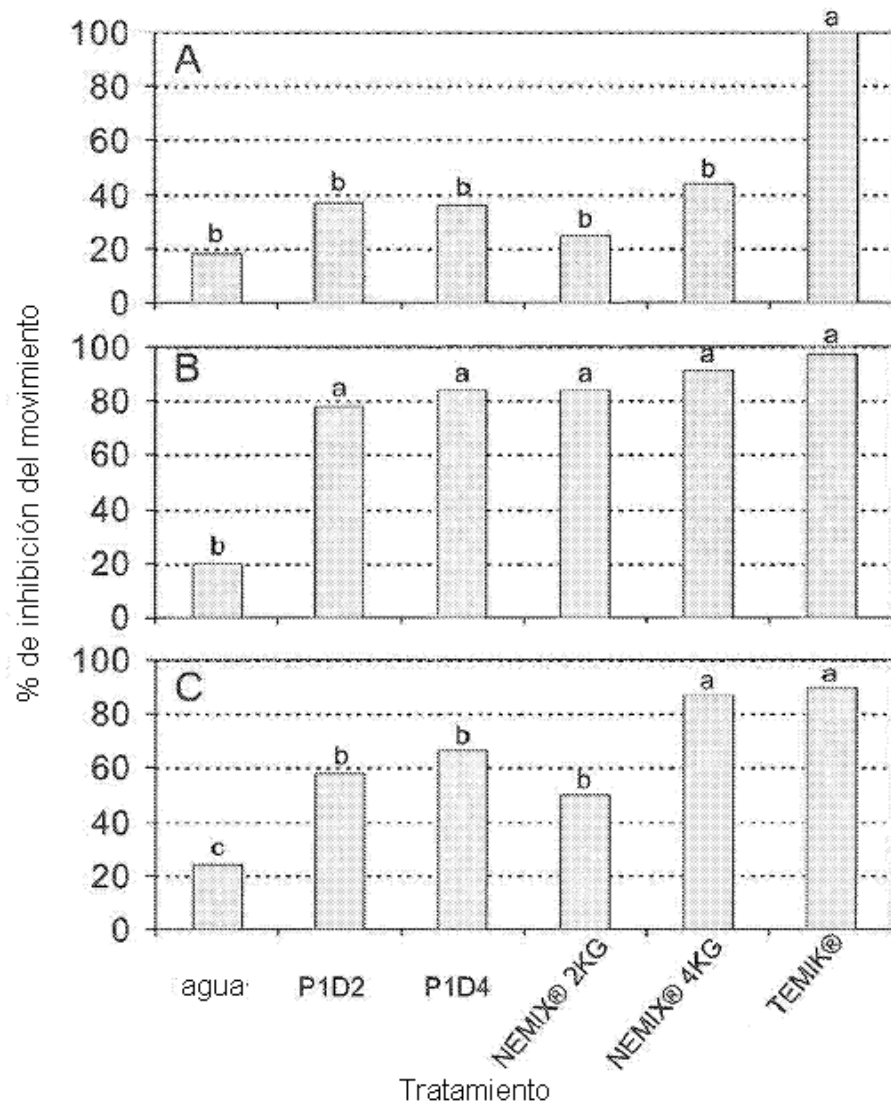


Figura 3

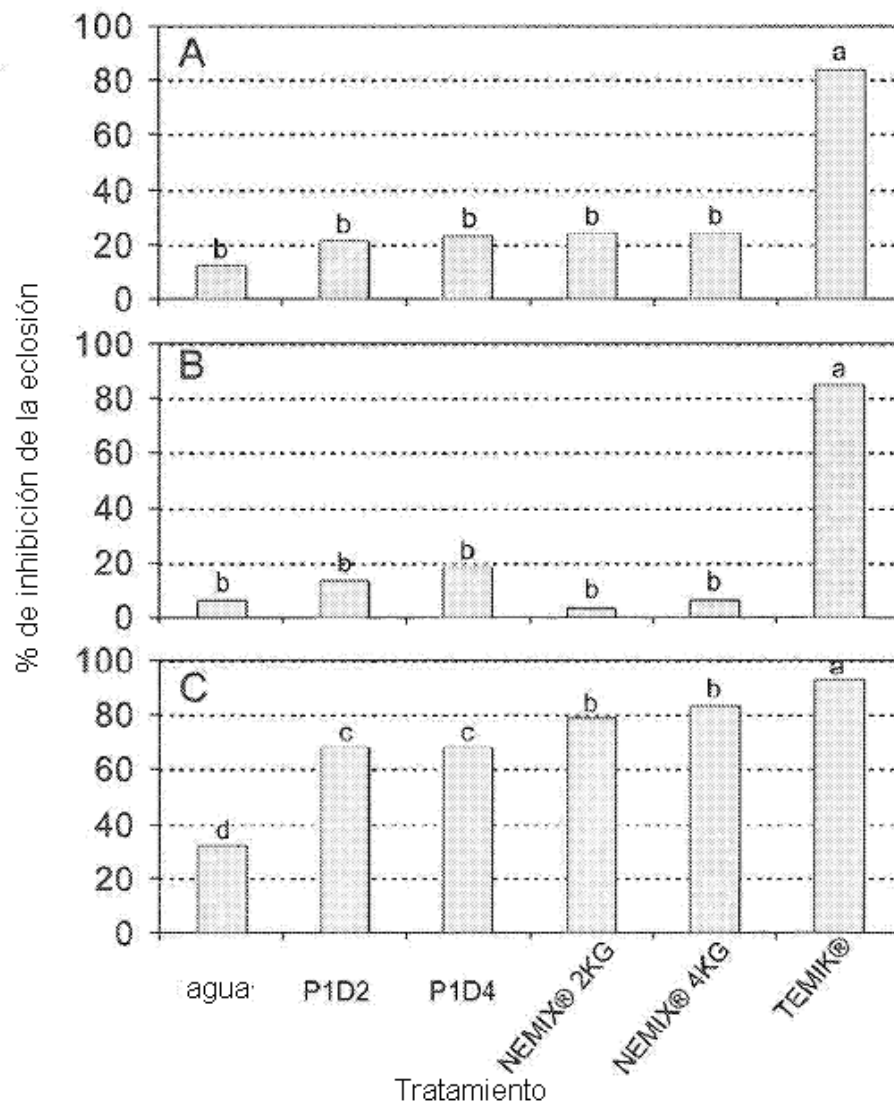
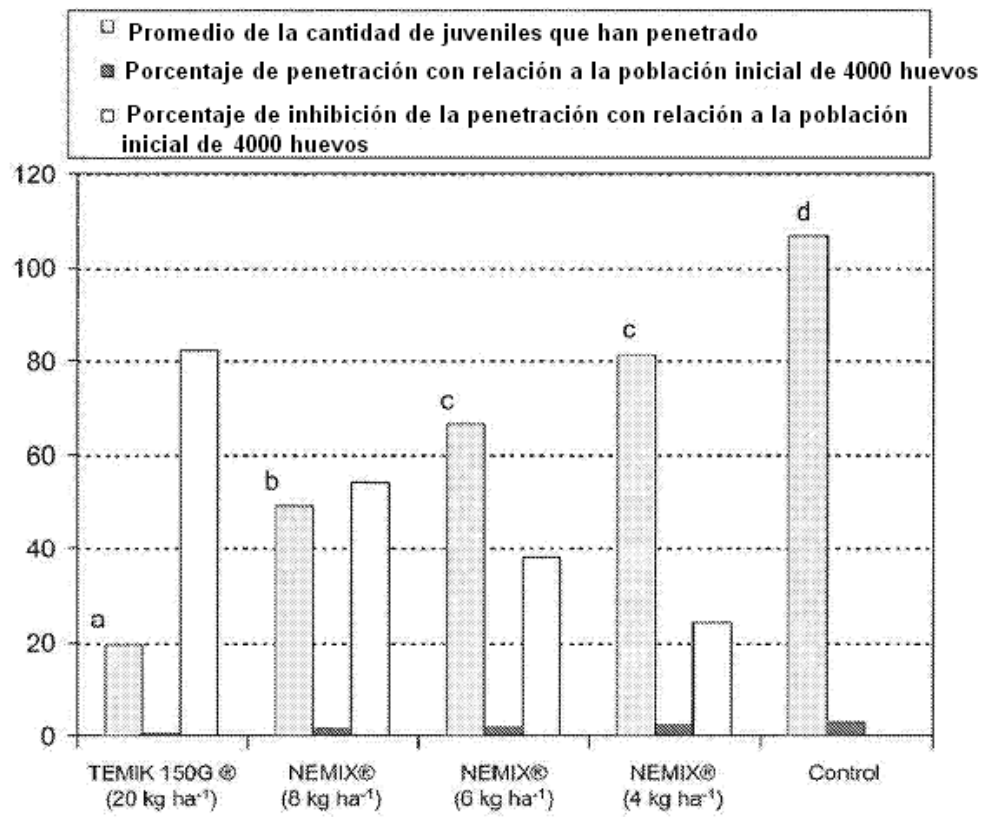


Figura 4



From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

CHR. HANSEN A/S
Boege Alle 10-12
DK-2970 Hoersholm
DANEMARK

Date of mailing (day/month/year) 03 January 2012 (03.01.2012)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference P4053PC00	
International application No. PCT/EP2011/063685	International filing date (day/month/year) 09 August 2011 (09.08.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address de Freitas Zambelli, Luciana Sekito Rua Rio Araguaia, 200 Terras de Santa Rosa II Salto 13328-056 Sao Paulo Brazil	State of Nationality BR	State of Residence BR
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☒ the name	☐ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address SEKITO DE FREITAS ZAMBELLI, Luciana Rua Rio Araguaia, 200 Terras de Santa Rosa II Salto 13328-056 Sao Paulo Brazil	State of Nationality BR	State of Residence BR
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	
☒ the International Searching Authority	☐ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned	
	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Kirchner Maria e-mail pt06.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 06
Facsimile No. +41 22 338 89 70	

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

Notificación de registro de una modificación

(regla PCT 92bis.1 e
Instrucciones Administrativas, sección 422)

A:

*CHR. HANSEN A/S
Boege Alle 10 – 12
DK-2970 Hoersholm
DINAMARCA*

Fecha de envío (día/mes/año): <i>03 de enero de 2012 (03.01.2012)</i>	
Referencia del solicitante o del agente: <i>P4053PC00</i>	NOTIFICACIÓN IMPORTANTE
Solicitud Internacional N°: <i>PCT/EP 2011/063685</i>	Fecha de presentación internacional (día/mes/año): <i>09 de agosto de 2011 (09.08.2011)</i>

1. Las siguientes indicaciones aparecen en los registros concernientes a: ☒ el solicitante ☒ el inventor ☐ el agente ☐ el representante común		
Nombre y dirección: <i>de Freitas Zambelli, Luciana Sekito Rua Rio Araguaia, 200 Terras de Santa Rosa II Salto 13328-056 San Pablo Brasil</i>	País de Nacionalidad <i>BR</i>	País de Residencia <i>BR</i>
Teléfono N°: 		
Facsímil N°: 		
Dirección de E-mail 		
2. La Oficina Internacional notifica por este medio al solicitante que se registró la siguiente modificación, concerniente a: ☐ la persona ☒ el nombre ☐ el domicilio ☐ la nacionalidad ☐ la residencia		
Nombre y dirección: <i>SEKITO DE FREITAS ZAMBELLI, Luciana Rua Rio Araguaia, 200 Terras de Santa Rosa II Salto 13328-056 San Pablo Brasil</i>	País de Nacionalidad <i>BR</i>	País de Residencia <i>BR</i>
Teléfono N°: 		
Facsímil N°: 		
Dirección de E-mail 		
☐ Se autoriza notificar por E-mail		
3. Otras observaciones, si son necesarias: 		
4. Se envía una copia de esta notificación a: ☒ la Oficina receptora ☒ el Organismo de Búsqueda Internacional ☐ el Organismo especificado para búsquedas suplementarias ☐ el Organismo de Examen Preliminar Internacional ☐ las Oficinas designadas concernientes ☐ las Oficinas seleccionadas concernientes ☐ otros:		

La Oficina Internacional de WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Suiza Facsímil N°: +41 22 338 89 70 Formulario PCT/IB/306 (enero 2009)	Funcionario autorizado: <i>Kirchner Maria</i> e-mail: pt06.pct@wipo.int Teléfono N°: +41 22 338 74 06
--	--

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference P4053PC00	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2011/063685	International filing date (<i>day/month/year</i>) 09/08/2011	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 10/08/2010
Applicant CHR. HANSEN A/S		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III)

4. With regard to the **title**,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
- ☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

NEMATOCIDAL COMPOSITION COMPRISING BACILLUS SUBTILIS AND BACILLUS LICHENIFORMIS

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 4
- ☒ as suggested by the applicant
- ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
- ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/063685

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A01N63/00 C12N1/20 C12R1/125 C12R1/10 A01P5/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N C12N C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, COMPENDEX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 705 807 A1 (HIBINO SUSUMU [JP] HIBINO SUSUMU [JP]; RISAHRU KOSAN LTD [JP]) 10 April 1996 (1996-04-10) cited in the application page 7; table 1 page 30, line 23 - line 25	1-11
X	BR PI0 604 602 A (CAZARRE MARCUS MACEDO) 27 May 2008 (2008-05-27) cited in the application claim 3	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 January 2012

Date of mailing of the international search report

25/01/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sawicki, Marcin

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/063685

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Z.A SIDDIQUI, I. MAHMOOD: "Role of bacteria in management of plant parasitic nematodes. A review.", BIORESOURCE TECHNOLOGY, vol. 69, no. 2, 28 September 1999 (1999-09-28), pages 167-179, XP007916664, ISSN: 0960-8524, DOI: doi:10.1016/S0960-8524(98)00122-9 cited in the application page 173; table 7	1-11
X	----- ZAIED, K.A.; KAWTHER, S. KASH; IBRAHIM S.A.; TAWFIK T.M.: "Improving Nematocidal Activity of Bacteria via Protoplast Fusion", AUSTRALIAN JOURNAL OF BASIC AND APPLIED SCIENCES, vol. 3, no. 2, 30 June 2009 (2009-06-30), pages 1412-1427, XP007916665, Australia ISSN: 1991-8178 page 1418; examples ARC-BS.7; tables 6, 7	1-11
X	----- SHAHNAZ DAWAR, MARIUM TARIQ, M.J. ZAKI: "Application of Baccillus species in control of Meloidogyne Javanica (Treub) chitwood on cowpea and mash bean", PAKISTAN JOURNAL OF BOTANY, vol. 40, no. 1, 7 November 2008 (2008-11-07), pages 439-444, XP007916667, Pakistan ISSN: 2070-3368 page 441; table 1 page 442; table 2	1-11
X	----- LI BIN, XIE GUAN-LIN, SOAD A., COOSEMANS J.: "SUPPRESSION OF MELOIDOGYNE JAVANICA BY ANTAGONISTIC AND PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA", JOURNAL OF ZHEJIANG UNIVERSITY SCIENCE B, vol. 6, no. 6, 30 June 2005 (2005-06-30), pages 496-501, XP002616271, Zhejiang ISSN: 1862-1783, DOI: 10.1631/jzus.2005.B0496 abstract	1-11
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/063685

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZAKI A SIDDIQUI AND KAZUYOSHI FUTAI: "Biocontrol of Meloidogyne incognita on tomato using antagonistic fungi, plant-growth-promoting rhizobacteria and cattle manure", PEST MANAGEMENT SCIENCE, vol. 65, no. 9, 8 June 2009 (2009-06-08), pages 943-948, XP002624533, Germany ISSN: 1526-4998, DOI: 10.1002/ps.1777 page 944; table 1 page 945; table 2 -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/063685

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0705807	A1	10-04-1996	DE 69420411 D1 07-10-1999
			DE 69420411 T2 06-04-2000
			EP 0705807 A1 10-04-1996

BR PI0604602	A	27-05-2008	NONE
