



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 343 217**

(51) Int. Cl.:
A01N 63/00 (2006.01)
A01P 7/04 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **07820223 .1**
(96) Fecha de presentación : **14.09.2007**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2079314**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **22.07.2009**

(54) Título: **Cepa de *Brevibacillus laterosporus*, composiciones que contienen la misma y procedimiento para el control biológico de dípteros.**

(30) Prioridad: **15.09.2006 IT MI06A1765**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.07.2010

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

(73) Titular/es: **Universita' degli Studi di Sassari
Piazza Università 21
07100 Sassari, IT**

(72) Inventor/es: **Floris, Ignazio;
Ruiu, Luca;
Satta, Alberto;
Delrio, Gavino;
Rubino, Salvatore;
Paglietti, Bianca;
Ellar, David John y
Pantaleoni, Roberto A.**

(74) Agente: **Trullols Durán, María del Carmen**

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

DESCRIPCIÓN

Cepa de *Brevibacillus laterosporus*, composiciones que contienen la misma y procedimiento para el control biológico de dípteros.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una nueva cepa bacteriana utilizada en el control biológico de insectos, especialmente dípteros.

Estado de la técnica

La *Musca domestica* es un insecto común de importancia veterinaria y médica en todo el mundo. Su nocividad se debe tanto a las molestias que provocan a los seres humanos y a los animales, con el impacto que supone en la producción zootécnica, como al riesgo de transmisión de diversos microorganismos que pueden provocar enteropatías.

Los niveles favorables de temperatura y humedad durante las estaciones de primavera y verano, y la abundancia de sustratos para el desarrollo y proliferación de fases jóvenes en entornos zootécnicos y vertederos, provocan un crecimiento exponencial de la densidad de la población de moscas, por lo que se requiere intervención y control.

Las medidas habituales de control se basan en la utilización de insecticidas químicos con consecuencias negativas inevitables en lo que se refiere al impacto ambiental. Los riesgos para el medio ambiente y la salud humana, junto con los fenómenos de la muy conocida resistencia a los insecticidas de dicho insecto, apoyan la introducción de medidas de control ecológicas en el contexto de los programas integrados de control, centrándose especialmente en las medidas biológicas.

La introducción de formulaciones que contienen cepas bacterianas efectivas contra la *Musca domestica* ha constituido uno de los objetivos que han perseguido diversos investigadores, considerando que se pudieron obtener unos resultados positivos similares en el control de otros insectos nocivos con la utilización de fórmulas comerciales basadas en bacterias entomopatógenas, especialmente cepas específicas de *Bacillus thuringiensis* (el principal insecticida biológico del mercado).

El *Brevibacillus laterosporus* es una bacteria aeróbica caracterizada por la producción de un cuerpo paraesporal laminar en forma de canoa, que se adhiere fuertemente a la pared de la espora. Ésta es una cepa bacteriana que se aisló inicialmente en agua (Laubach, 1916) y ya se propuso como agente entomopatógeno potencial a principios del siglo XX al observarse que se podía aislar a partir de abejas enfermas (McCray, 1917).

Sólo recientemente se han demostrado sus propiedades insecticidas contra larvas de mosquito (*Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*) y contra larvas de *Simulium vittatum* (Favret & Yousten, 1985; Rivers *et al.*, 1991), coleópteros, nemátodos, moluscos (Singer, 1996) y lepidópteros (Oliveira *et al.*, 2004). Además, algunas cepas que producen unas inclusiones paraesporales similares a las producidas por el *Bacillus thuringiensis* (Smirnova *et al.*, 1996) resultaron ser especialmente tóxicas contra larvas de mosquitos (*Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* y *Culex pipiens*) (Orlava *et al.*, 1998).

Ruiu *et al.*, 2006, describen una cepa de la que se ha demostrado que afectan a las larvas y a los adultos de *Musca domestica*, produciendo unos efectos letales y subletales. Sin embargo, dicha cepa presenta un nivel inferior de toxicidad en comparación con las que se pueden obtener con la cepa UNISS18 objetivo de la presente invención.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una nueva cepa bacteriana que pertenece al género *Brevibacillus laterosporus* depositada con el n.º NCIMB 41419 en NCIMB Ltd. Aberdeen, Reino Unido y a sus derivados obtenidos mediante la mutación o transformación genética o mediante el crecimiento en unas condiciones selectivas.

Los productos obtenidos mediante la extracción, fraccionamiento subcelular y/o lisis de cultivos que contienen esta bacteria se consideran también como derivados del *Brevibacillus laterosporus*.

Según un aspecto principal de la presente invención, dicha bacteria y sus derivados con actividad insecticida constituyen el principio activo de composiciones y cebos alimenticios utilizados para el control biológico de dípteros.

Según un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método de control biológico de insectos que pertenecen al orden de los dípteros caracterizado porque utiliza el microorganismo según la presente invención o sus derivados y/o composiciones según la presente invención o cebos alimenticios.

El principio activo presenta actividad contra nematódicos y braquiceros (moscas, mosquitos, tábanos y quironómidos) y especialmente contra la especie *Musca domestica*.

Descripción detallada de la invención

El presente estudio se refiere al aislamiento a partir de muestras de suelo de la Cerdeña central (Italia) de una nueva cepa bacteriana de *Brevibacillus laterosporus* depositada el 28 de julio de 2006 con el n.º NCIMB 41419 (NCIMB Ltd. Aberdeen, Reino Unido) denominado asimismo UNISS18.

Junto con el presente descubrimiento, los presentes inventores han desarrollado asimismo un método para el control biológico y especialmente para el control microbiológico de insectos que pertenecen a los dípteros, especialmente la *Musca domestica*, utilizando unas formulaciones que contienen la nueva cepa bacteriana y/o sus derivados.

El término derivado se refiere a esporas y esporangios obtenidos a partir de la propia UNISS18 utilizando unos procedimientos muy conocidos de cultivo y aislamiento, a partir de cepas obtenidas mediante el crecimiento en unas condiciones mutágenas o selectivas, así como a partir de cepas obtenidas mediante la transformación genética con secuencias de ADN de origen exógeno diverso o endógeno. Las fracciones subcelulares obtenidas mediante la separación y/o lisis celular, tal como por ejemplo inclusiones paraesporales, siempre que se conserven las propiedades características de la cepa original (actividad insecticida), se consideran asimismo como derivados de la cepa.

Los extractos celulares de cultivos bacterianos total o parcialmente lisados, cepas liofilizadas o fracciones obtenidas con enzimas o mediante un tratamiento a presión elevada o con un tratamiento suave con detergentes, ácidos o bases se consideran asimismo como derivados de la cepa.

Las propiedades como insecticida del *Brevibacillus laterosporus* se han demostrado especialmente contra larvas de mosquitos (*Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*), larvas de *Simulium vittatum*, coleópteros, nemátodos, moluscos y lepidópteros. Las inclusiones paraesporales especialmente activas contra mosquitos se producen en unas condiciones determinadas.

La actividad insecticida se puede observar asimismo sin inclusiones.

Los mismos solicitantes han demostrado por primera vez los efectos letales y subletales de cepas específicas de *Brevibacillus laterosporus* contra la *Musca domestica* mediante las pruebas de laboratorio publicadas por Ruiu *et al.*, 2006.

Sin embargo, cada uno de los distintos componentes (esporas, esporangios, células vegetativas) de la cepa UNISS18, objetivo de la presente invención, presenta una actividad superior en comparación con otras cepas conocidas. Dicha actividad se determina como la capacidad para matar moscas, haciendo especial referencia al período de acción que, en condiciones similares, es más breve que el período requerido por la cepa descrita por Ruiu *et al.* 2006. Los datos comparativos de la actividad se presentan en la parte experimental, ejemplo 2.

En particular, se ha demostrado que la cepa de *Brevibacillus laterosporus* NCIMB 41419 es más efectiva para el control de dípteros, especialmente de la especie *Musca domestica*, en entornos zootécnicos. Aparte de las moscas, presenta una actividad superior a cepas muy conocidas también en otros tipos de dípteros, tales como los braquíceros y nematóceros, tal como por ejemplo mosquitos (mosquito común: *Culex pipiens*, anófeles: *Anopheles maculipennis*, mosquito tigre: *Aedes albopictus*), tábanos y quironómidos.

Dicho amplio espectro de actividad, junto con la falta de patogenicidad en seres humanos (*Brevibacillus laterosporus* se clasifica como bacteria no patógena para los seres humanos), hace que la cepa UNISS18 y sus derivados resulten particularmente apropiados para el control biológico de insectos.

El proceso de preparación de la composición/formulación de insecticida comprende sustancialmente las etapas siguientes:

a) Inocular la bacteria en un medio de cultivo y amplificación en un medio de cultivo enriquecido (siendo un medio de cultivo enriquecido un medio que contiene asimismo aminoácidos y/o proteínas, además de sales y una fuente de carbono) según procedimientos muy conocidos en la técnica, tal como, por ejemplo, en un caldo L-B, a una temperatura comprendida entre 20°C. y 40°C., comprendida preferentemente entre 25°C. y 35°C., aún más preferentemente entre 28°C. y 32°C.; se pueden obtener unos resultados similares utilizando distintos medios de cultivo líquidos o sólidos según procedimientos muy conocidos;

b) hacer crecer las bacterias preferentemente hasta la etapa de esporulación; dicho crecimiento es habitualmente espontáneo tras un período de por lo menos 24-48 horas de incubación en medio de cultivo enriquecido al intervalo preferido de temperatura; se pueden obtener unos resultados similares utilizando distintos medios de cultivo líquidos o sólidos según procedimientos muy conocidos en la técnica; la esporulación se puede observar directamente con un microscopio óptico de contraste de fases;

c) proceder a una lisis y/o fraccionamiento celular opcionales;

d) recoger esporas, células vegetativas de esporangios o sus etapas intermedias, por ejemplo, por centrifugación, preferentemente con lavados secuenciales con agua destilada estéril, tal como resulta muy conocido en la técnica, a fin de retirar los componentes solubles (véase el ejemplo 1);

- 5 e) volver a suspender el sedimento de esporas, células vegetativas o esporangios, o sus preparaciones intermedias tal como se han obtenido en la etapa d), en agua o en una disolución amortiguadora acuosa apta para obtener una suspensión sin contaminantes y que presente actividad insecticida.

10 En general, el producto obtenido de este modo correspondiente al principio activo se formula adecuadamente en función de la utilización pretendida, mezclando directamente el sedimento y/o suspensión con los excipientes y diluentes apropiados.

15 Tal como se ha mencionado anteriormente, la actividad insecticida se encuentra asimismo presente en suspensiones que contengan células vegetativas o esporangios: de hecho, se pueden obtener unos resultados similares utilizando bacterias en etapas distintas de la etapa de spora (esporangios, células vegetativas) o etapas intermedias.

20 Cada etapa del desarrollo o crecimiento se puede obtener con un cultivo bacteriano sincronizado que se puede conseguir tal como resulta muy conocido en la técnica. Se detiene el cultivo y se recogen las bacterias tanto cuando se encuentran simultáneamente en la fase vegetativa, como cuando hasta el 100% de bacterias se encuentran en forma esporulada o cuando las bacterias se encuentran en forma de esporangios o cuando se encuentran en las diversas fases intermedias. Por cultivo sincronizado se entiende un cultivo en el que las bacterias de la población bacteriana se someten a reproducción simultánea, por lo tanto, en un momento determinado, las bacterias se encuentran en la misma fase de desarrollo o crecimiento (células vegetativas, esporangios, esporas, diversas fases intermedias).

25 Las esporas, esporangios y células vegetativas, o sus mezclas que contienen principios activos, se pueden tratar y/o fraccionar adicionalmente antes de mezclarlos en formulaciones. Dichos tratamientos o fraccionamientos comprenden, por ejemplo la lisis y el fraccionamiento subcelular, la extracción parcial por procedimientos fisicoquímicos (por ejemplo centrifugación) o bioquímicos (por ejemplo enzimáticos). Las fracciones subcelulares obtenidas utilizando la cepa UNISS18 y que presentan actividad insecticida se incluyen asimismo en la presente invención.

30 Las formulaciones pueden ser de diversos tipos, en función de la utilización pretendida: pueden ser cebos alimenticios o composiciones para el tratamiento de prados o para el tratamiento, por ejemplo, mediante irrigación o pulverización, de áreas pequeñas o amplias, por ejemplo de áreas zootécnicas.

35 Se presentan preferentemente, pero no necesariamente, en forma de pasta fluida que se ha demostrado que resulta efectiva para el control de la *Musca domestica* tanto en la etapa previa a la de imago y en la etapa adulta, en entornos zootécnicos. Se puede obtener una efectividad similar en otros ambientes poblados por los dípteros mencionados anteriormente.

40 Otros tipos de formulaciones comprenden la cepa UNISS18 (o sus derivados) como principio activo solo o combinado con uno o diversos principios activos distintos (por ejemplo fertilizantes, sustancias que liberan micronutrientes, insecticidas químicos o biológicos, fungicidas, nematodocidas, etc.) a unas concentraciones comprendidas entre el 0,01 y el 99,9%. Tal como resulta muy conocido en la técnica, se preparan las composiciones con excipientes líquidos o sólidos, o incluso con excipientes en forma de polvo, mezclando homogéneamente el principio activo con disolventes, 45 tensioactivos o vehículos sólidos o pulverulentos.

Según la presente invención, se entiende por principio activo la cepa *Brevibacillus laterosporus* UNISS18 depositada con el número NCIMB 41419 y sus derivados definidos anteriormente.

50 El efecto insecticida en los adultos se puede alcanzar mediante la utilización de cebos alimenticios que incorporen la formulación que contiene *Brevibacillus laterosporus*, a fin de obtener una concentración final de por lo menos 1×10^5 esporas y/o esporangios y/o células vegetativas/g, más preferentemente comprendida entre 1×10^6 y 1×10^{12} o más preferentemente comprendida entre 1×10^7 y 1×10^{11} esporas y/o esporangios y/o células vegetativas/g, aunque la mortalidad de larvas o insectos adultos alcance el 100% en 24 y 48 horas, respectivamente, ya a una concentración 55 de 1×10^9 esporas y/o esporangios y/o células vegetativas/g. Los cebos alimenticios se formulan preferentemente de tal modo que contengan, además de *Brevibacillus laterosporus*, cualquier tipo de agente que atraiga los insectos, por ejemplo azúcar, sustancias de naturaleza proteica, sustancias con nitrógeno, feromonas.

60 Por lo tanto el principio activo contenido en las formulaciones de insecticida y en los cebos, en forma de esporas o esporangios o de sedimento bacteriano o sus derivados, se encuentra generalmente presente en el mismo intervalo de concentración definido anteriormente: se utiliza una concentración equivalente en el caso de los derivados u otros componentes.

65 Dentro de los intervalos de concentración mencionados anteriormente relacionados con la actividad insecticida, unas concentraciones más elevadas permiten un efecto letal más inmediato, mientras que unas concentraciones inferiores tienen como resultado una acción más lenta.

ES 2 343 217 T3

Diversos ejemplos de formulación para las preparaciones de la cepa bacteriana UNISS18 y sus derivados según la presente invención resultan muy conocidos para los expertos en la materia y comprenden:

- suspensiones acuosas de cápsulas (microcápsulas): esta formulación aplicada a algunos insecticidas hace posible la seguridad tanto toxicológica como medioambiental. El principio activo insecticida se encapsula en microsferas de material atóxico e inerte, por ejemplo nailon, en suspensión acuosa;
- formulaciones microgranulares: dicha formulación se denomina asimismo microgránulos hidrodispersables, se produce mediante la aglomeración del principio activo sólido con un sistema que actúa de sistema humectante/dispersante;
- suspensiones acuosas concentradas (SC): dichas formulaciones se denominan asimismo: pasta fluida, pasta coloidal (fluida), pasta líquida. El principio activo sólido e insoluble se microniza finamente en suspensión acuosa.
- bioencapsulación, con respecto a *Bacillus thuringiensis*. Se encapsula el principio activo en células debilitadas de otro microorganismo, por ejemplo levaduras o bacterias, por ejemplo, *Pseudomonas fluorescens*. El procedimiento de bioingeniería de la encapsulación, denominado Cell Cap, permite la protección del principio activo o de las endotoxinas de la acción destructora de la luz solar, el calor, el agua. Dicha protección biológica proporciona a la fórmula una mayor duración, una eficacia más estable y un período de almacenamiento más prolongado;
- bolsas hidrosolubles, que consisten en recipientes realizados con una capa de plástico fino rápidamente hidrosoluble que aísla completamente el principio activo del entorno y del agricultor.

Según un aspecto adicional, la presente invención se refiere a la utilización de la cepa UNISS18 para el control de dípteros, braquíceros y nematóceros, más específicamente de moscas, mosquitos (mosquito común: *Culex pipiens*, anófeles: *Anopheles maculipennis*, mosquito tigre: *Aedes albopictus*) de tábanos y quironómidos.

El control de las etapas previas a imago se alcanza tratando el sustrato orgánico en el que se desarrollan. El efecto insecticida es independiente del modo de incorporación de la formulación que contiene *Brevibacillus laterosporus* en dicho sustrato de desarrollo. De este modo se obtiene un efecto significativo que depende de la dosis y la concentración en la reducción de la capacidad de desarrollo de las larvas, así como un aumento general de la mortalidad en las etapas previas a imago. Estas técnicas comprenden asimismo la utilización de una cepa formulada adecuadamente o de sus derivados, de aditivos y/o complementos para alimentar animales en la producción zootécnica con el resultado de una liberación fecal de residuos bacterianos.

Los trabajos de laboratorio con experimentos sobre la toxicidad, tras la ingestión de diversas fracciones extraídas a partir de la bacteria, demuestran que la toxicidad es un proceso en el que intervienen toxinas; por lo tanto, la presente invención comprende todas las formulaciones que contienen la nueva cepa UNISS18 de *Brevibacillus laterosporus* en forma de células vegetativas y/o esporangios y/o esporas y/o toxinas extraídas de la misma y/o derivados tal como se han definido anteriormente, lo que produce un efecto insecticida en las larvas y/o adultos de *Musca domestica* en ambientes poblados con dicho insecto.

Por lo tanto, según un aspecto adicional, el método de la presente invención se refiere asimismo a la prevención de infestaciones por dípteros.

La cepa UNISS18 de *Brevibacillus laterosporus* n.º NCIMB 41419 y sus derivados se pueden almacenar en forma liofilizada o congelada en presencia de glicerol por lo menos a 20°C., o a temperatura ambiente en cultivo por picadura o en placa de agar. Los métodos de almacenamiento, mantenimiento y crecimiento bacteriano resultan conocidos en la técnica y se describen en: MacFaddin, J. F. 1985. *Media for isolation, cultivation, identification, maintenance of medical bacteria* ("Medios de aislamiento, cultivo, identificación, mantenimiento de bacterias de interés en medicina"), Williams & Wilkins, Baltimore, Md. O también en: Ted R. Johnson, Christine L. Case, James G. Cappuccino, Natalie Sherman, Virginia Schurman, Janet Savage, 1999. *Biology 201: Microbiology Laboratory Manual* ("Manual del laboratorio de microbiología"), edición de Addison-Wesley.

Algunas de las formas de realización de la presente invención, que se ilustran a continuación, representan únicamente ejemplos y, por lo tanto, no son exhaustivas ni limitan lo que se ha descrito anteriormente.

Parte experimental

Ejemplo 1

Aislamiento, cultivo y bioanálisis de laboratorio de la cepa UNISS18 de Brevibacillus Laterosporus

Se aisló la cepa UNISS18 de *Brevibacillus laterosporus* a partir de una muestra de suelo recogida en la Cerdeña central (Italia). Se resuspendió 1 g de suelo en 10 ml de disolución amortiguadora de fosfato 50 mM a un pH de 7,0 y se agitó energicamente durante 20 minutos utilizando un agitador mecánico. La suspensión obtenida de este modo se calentó hasta 70°C durante 30 minutos a fin de debilitar las formas bacterianas vegetativas. Se utilizó la suspensión para inocular placas de Petri que contenían agar nutritivo o agar CCY. Tras 2 días de incubación a 30°C, se analizaron

ES 2 343 217 T3

las colonias bacterianas simples mediante microscopía óptica y electrónica. Las colonias simples de la cepa UNISS18 de *Brevibacillus laterosporus* se trasladaron a unas nuevas placas de Petri que contenían agar CCY y se incubaron hasta alcanzar una esporulación completa (2-3 días). Se volvieron a suspender las colonias simples con actividad insecticida en 1 ml de caldo nutritivo y 15% de glicerol y se almacenaron a 80°C.

Se cultivó la cepa UNISS18 de *Brevibacillus laterosporus* en un medio basado en el caldo Luria-Bertani (LB) a 30°C con agitación a 200 rpm. Se recogió el cultivo por centrifugación (10.000 g) únicamente una vez se hubo completado la esporulación de la población entera, lo que se verificó mediante observación directa con microscopía óptica de contraste de fases. Tras 3 ciclos consecutivos de centrifugación-resuspensión (lavado) en agua destilada estéril, el sedimento se volvió a suspender en agua hasta una concentración de 2×10^9 esporas/g.

La suspensión obtenida de este modo se administró a moscas incorporándola en la alimentación hasta una concentración final de 1×10^9 (adultos) y $0,8 \times 10^9$ (larvas) esporas/g. En estas condiciones, se alcanzó un 100% de mortalidad en las 24 ó 48 horas posteriores, en el caso de las larvas y los adultos, respectivamente.

Se obtuvieron los mismos resultados utilizando suspensiones purificadas de esporas, esporangios o células vegetativas o mezclas de esporas y/o esporangios y/o células vegetativas de la cepa UNISS18 de *Brevibacillus laterosporus*.

Se pueden alcanzar las tres fases de crecimiento mencionadas anteriormente, tal como resulta muy conocido en la técnica, sincronizando el cultivo bacteriano en un medio de cultivo líquido y recogiendo posteriormente el cultivo bacteriano en el punto en que las bacterias se encuentran en la fase vegetativa o en forma de esporangios o esporas.

Se pueden obtener unos resultados similares con cultivos bacterianos no sincronizados que contengan mezclas de las diversas etapas del crecimiento: células vegetativas y/o esporangios y/o esporas.

Se pueden obtener unos resultados similares utilizando bacterias en etapas intermedias entre las etapas mencionadas anteriormente (esporas, esporangios, células vegetativas).

Ejemplo 2

Comparación entre la UNISS18 y otras cepas de Brevibacillus Laterosporus con respecto a la eficacia en adultos

Siguiendo el procedimiento y las concentraciones del ejemplo 1, se administraron a moscas adultas unas preparaciones de suspensiones de las cepas de *Brevibacillus laterosporus* ATCC 9141, ATCC 6456 y ATCC 64 proporcionadas por el *Bacillus Genetic Stock Center*, conocidas ya en parte por su toxicidad en otros dípteros (Rivers *et al.*, 1991), y con suspensiones de la cepa utilizada por Ruiu *et al.* (2006), para comparar con la cepa UNISS18 NCIMB 41419 según la presente invención. Los valores de mortalidad obtenidos tras 72 h fueron de un 20% para la cepa ATCC 9141, un 33% para la cepa ATCC 6456, un 13% para la cepa ATCC 64, un 50% para la cepa la cepa utilizada por Ruiu *et al.* (2006) y un 100% para la cepa UNISS18.

Ejemplo 3

Cebos para adultos que contenían la cepa UNISS18 de Brevibacillus Laterosporus

Se preparó en el laboratorio un cebo alimenticio basado en una fruta confitada que contenía sacarosa y la cepa UNISS18 de *Brevibacillus laterosporus*, a una concentración de 2×10^8 esporas/g, y se probó con adultos de *Musca domestica*, obteniéndose un 100% de mortalidad. Cuando se administró el mismo cebo en una compañía zootécnica, se consiguió contener satisfactoriamente la población de moscas hasta unos niveles comparables con los detectados en compañías similares que se sometían a tratamientos comunes con pesticidas químicos.

Ejemplo 4

Tratamientos de abonos con una formulación que contenía la cepa UNISS18 de Brevibacillus Laterosporus

Se incorporó una formulación fluida basada en un cultivo esporulado de la cepa UNISS18 de *Brevibacillus laterosporus* a una concentración de 1×10^8 esporas/g en muestras de abono que constituirían el sustrato para el desarrollo de fases jóvenes de *Musca domestica*. Dicho tratamiento provocó un aumento en la mortalidad de las fases jóvenes que alcanzó el 60%, en comparación con otras muestras utilizadas como control negativo.

Ejemplo 5

Utilización de una formulación que contenía la cepa UNISS18 de Brevibacillus Laterosporus en prados de compañías zootécnicas

Se realizaron en compañías zootécnicas unos tratamientos del abono similares a los descritos en el ejemplo 4. Al utilizar la formulación mencionada en el ejemplo 4, se alcanzó la supresión del desarrollo de las fases jóvenes mediante unos tratamientos con una dosis de 2 l/m² de prado, que es el área exterior a los establos en los que se desarrollan las etapas de las moscas previas a la de imago (este área se encuentra poblada por adultos de *Musca domestica* a fin de alimentarse de los animales o del abono y de poner huevos).

Bibliografía

1) **Favret E M & Yousten A A (1985)** Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 45: 195-203.

2) **Laubach A C (1916)** Studies on aerobic, sporebearing, non pathogenic bacteria. Spore bearing organism in water. *Journal of Bacteriology* 1: 505-512.

3) **McCray A H (1917)** Spore-forming bacteria in the apiary. *Journal of Agricultural Research* 8: 399-420.

4) **Oliveira E J, Rabinovitch L, Monnerat R G, Passos L K, & Zahner V (2004)** Molecular Characterization of *Brevibacillus laterosporus* and Its Potential Use in Biological Control. *Applied Environmental Microbiology* 70: 6657-6664.

5) **Orlova M V, Smirnova T A, Ganushkina L A, Yacubovich V Y & Azizbekyan R R (1998)** Insecticidal Activity of *Bacillus laterosporus*. *Applied Environmental Microbiology* 64: 2723-2725.

6) **Rivers D B, Vann C N, Zimmack H L, & Dean D H (1991)** Mosquitocidal Activity of *Bacillus laterosporus*. *Journal Invertebrate Pathology* 58: 444-447.

7) **Ruiu L, Delrio G, Ellar D J, Floris I, Paglietti B, Rubino S & Satta A (2006)** Lethal and sublethal effects of *Brevibacillus laterosporus* on the housefly (*Musca domestica*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 118: 137-144.

8) **Singer S (1996)** The Utility of Morphological Group II *Bacillus*. *Advance Applied Microbiology* 42: 219-261.

9) **Smirnova T A, Minenkova I B, Orlova M V, Lecadet M M & Azizbekyan R R (1996)** The crystal-forming strains of *Bacillus laterosporus*. *Research in Microbiology* 147: 343-350.

REIVINDICACIONES

1. Cepa bacteriana de *Brevibacillus laterosporus* depositada con el n.º NCIMB 41419 en NCIMB Ltd. Aberdeen, UK, para utilizar en el control biológico de insectos.
2. Cepa bacteriana de *Brevibacillus laterosporus* depositada con el n.º NCIMB 41419 según la reivindicación 1 transformada genéticamente y que conserva su actividad insecticida.
3. Composición insecticida que comprende como principio activo, el *Brevibacillus laterosporus* según la reivindicación 1 o su derivado transformado genéticamente según la reivindicación 2.
4. Composición según la reivindicación 3 que contiene una cantidad de bacilos/esporas de por lo menos 1×10^5 esporas y/o esporangios y/o células vegetativas/g.
5. Composición según la reivindicación 4 en la que dicha concentración se encuentra comprendida entre 1×10^6 y 1×10^{12} esporas/g (adultos) y entre 1×10^6 y 1×10^{12} esporas/g (larvas) y/o esporangios y/o células vegetativas/g.
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 en la que el principio activo se combina con uno o más principios activos adicionales y/o con excipientes, diluentes o un disolvente líquido, sólido o polvo.
7. Composición según la reivindicación 6 en pasta fluida.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 para utilizar en la preparación de composiciones alimenticias para utilización zootécnica.
9. Composición según la reivindicación 8, que comprende además una sustancia que atrae los insectos.
10. Composición según la reivindicación 9 en la que dicha sustancia que atrae los insectos se selecciona de entre el grupo de: azúcar, sustancias de naturaleza proteica, sustancias con nitrógeno y feromonas.
11. Cebo alimenticio que comprende como principio activo el *Brevibacillus laterosporus* según la reivindicación 1, el derivado transformado genéticamente según la reivindicación 2 o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10.
12. Proceso para la preparación de una suspensión concentrada de *Brevibacillus laterosporus* según la reivindicación 1 que comprende las etapas siguientes:
 - a) inocular el cultivo de *Brevibacillus laterosporus* n.º NCIMB 41419 en un medio enriquecido;
 - b) hacer crecer la bacteria en cultivo durante por lo menos 3 horas a una temperatura comprendida entre 20°C y 40°C;
 - c) lisis y/o fraccionamiento celular opcionales;
 - d) recoger la siembra de la fracción de células, esporas o esporangios o de la fracción subcelular, y lavados apropiados;
 - e) resuspensión en una disolución amortiguadora apropiada.
13. Proceso según la reivindicación 12 en el que la etapa b) se realiza durante por lo menos 20 horas a una temperatura comprendida entre 25°C y 35°C.
14. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13 que comprende además una etapa de formulación de la suspensión concentrada de *Brevibacillus laterosporus* en cebos alimenticios, composiciones insecticidas o con composiciones alimenticias.
15. Utilización del *Brevibacillus laterosporus* según la reivindicación 1 o de su derivado transformado genéticamente según la reivindicación 2 para la preparación de cebos y/o composiciones y/o composiciones alimenticias con actividad insecticida.
16. Procedimiento para el control biológico de insectos que pertenecen al orden de los dípteros, **caracterizado** porque se utiliza el microorganismo según la reivindicación 1, su derivado transformado genéticamente según la reivindicación 2, o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, o el cebo según la reivindicación 11.
17. Procedimiento según la reivindicación 16 en el que dichos dípteros son braquíceros o nematóceros.

ES 2 343 217 T3

18. Procedimiento según la reivindicación 16 en el que dichos dípteros son braquíceros, preferentemente *Musca domestica*.

5 19. Procedimiento según la reivindicación 17 en el que dichos dípteros son nematóceros y particularmente mosquitos: mosquito común (*Culex pipiens*), anófeles (*Anopheles maculipennis*), mosquito tigre (*Aedes albopictus*).

20. Procedimiento según la reivindicación 17 en el que dichos dípteros son tábanos (*Tabanus bovinus*) o quironómidos.

10 21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20 para el tratamiento de áreas zootécnicas.

22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20 para la prevención en el terreno de infestaciones por dípteros **caracterizado** porque se utiliza el microorganismo según la reivindicación 1, el derivado transformado genéticamente según la reivindicación 2, la composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, y/o el cebo según la reivindicación 11.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65