

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-526855

(P2021-526855A)

(43) 公表日 令和3年10月11日(2021.10.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 Z N A Z	2 G O 4 1
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/31	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/6813 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6813 Z	4 B O 6 5
C 1 2 Q 1/6844 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6844 Z	
C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6869 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 82 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2021-518036 (P2021-518036)
 (86) (22) 出願日 令和1年6月5日 (2019.6.5)
 (85) 翻訳文提出日 令和3年2月2日 (2021.2.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/035530
 (87) 国際公開番号 W02019/236672
 (87) 国際公開日 令和1年12月12日 (2019.12.12)
 (31) 優先権主張番号 62/681,469
 (32) 優先日 平成30年6月6日 (2018.6.6)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 520478840
 アムヴァク ホン コン リミテッド
 中華人民共和国 香港, スン ワン,
 クイーンズ ロード セントラル, ウィ
 ンベース センター, ユニット ビー,
 1 1 / エフ.
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

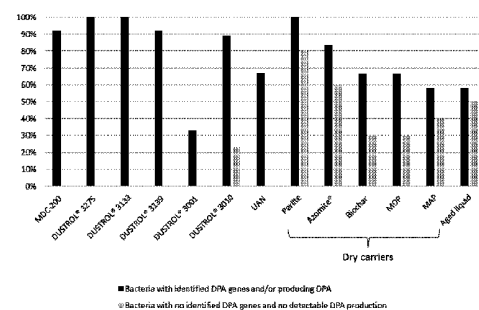
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ジピコリン酸を生成する微生物コンソーシアおよび担体との共製剤化のための微生物を選択するための方法

(57) 【要約】

担体との共製剤化のために微生物を選択するための方法が提供される。一部の例では、本方法は、1 つもしくは複数のジピコリン酸 (DPA) 合成酵素遺伝子を含む微生物、1 つもしくは複数の DPA 合成酵素タンパク質を発現する微生物、および / または DPA を生成する微生物を同定すること ; および担体との共製剤化のために微生物を選択することを含む。本方法は、必要に応じて、選択された微生物を担体と共製剤化することを含む。一部の例では、本方法は、微生物中の 1 つもしくは複数の DPA 合成酵素遺伝子または 1 つもしくは複数の D p a A および / もしくは D p a B タンパク質を検出することを含む。他の例では、本方法は、例えば、蛍光アッセイを使用して、微生物または微生物を含有する培地中で DPA を検出することを含む。

FIG. 4



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Bacillus amyloliquefaciens、*Bacillus firmus*、*Bacillus flexus*、*Bacillus licheniformis*、*Bacillus megaterium*、*Bacillus pumilus*、*Bacillus koreensis*、*Bacillus drementensis*、*Bacillus subtilis*、*Clostridium bifermentans*、*Clostridium beijerinckii*、*Clostridium pasteurianum*、*Lactobacillus paracasei*、*Fontibacillus* sp.(*panacisegetis*)、*Oceanobacillus oncorhynchi*、*Paenibacillus lautus*、*Paenibacillus azoreducens*、*Paenibacillus chibensis*、*Paenibacillus cookii*、*Paenibacillus* sp.(*chitinolyticus*)、*Paenibacillus* sp.(P1XP2)、*Pseudomonas* sp.および*Streptomyces griseus*のそれぞれを含むかまたはそれらからなる微生物種の細胞を含む組成物。

10

【請求項 2】

配列番号 3 ~ 25 のそれぞれと少なくとも 99% の配列同一性を有する 16S rDNA 核酸配列を有する微生物を含むかまたはそれらからなる微生物種の細胞を含む組成物。

【請求項 3】

配列番号 3 ~ 25 のそれぞれの 16S rDNA 核酸配列を有する微生物を含むかまたはそれらからなる微生物種の細胞を含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

アメリカンタイプカルチャーコレクションの寄託番号 PTA - 125924 を含む組成物。

【請求項 5】

キチン、キトサン、グルコサミン、アミノ酸、および液体肥料のうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 6】

土壌、植物、植物の部分、または種子を請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の組成物と接触させることを含む方法。

【請求項 7】

前記土壌、植物、植物の部分、または種子をキチン、キトサン、グルコサミン、およびアミノ酸のうちの 1 つまたは複数と接触させることをさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記土壌、植物、植物の部分、または種子を液体肥料と接触させることをさらに含む、請求項 6 または請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記土壌、植物、植物の部分、または種子を 1 つもしくは複数の農薬、1 つもしくは複数の殺真菌剤、1 つもしくは複数の除草剤、1 つもしくは複数の殺虫剤、1 つもしくは複数の植物ホルモン、1 つもしくは複数の植物誘導因子、またはそれらの 2 つもしくはそれより多くの組合せと接触させることをさらに含む、請求項 6 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記土壌、植物、植物の部分、または種子を前記組成物と接触させる前に、前記組成物中の前記微生物種を活性化させることをさらに含む、請求項 6 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 11】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の組成物および担体または種子を含む組成物。

【請求項 12】

前記担体が、尿素、カリ、リン酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、粘土、ピート、石炭、無機土壌、木炭、おがくず、コムギ/ダイズ/エンバクのふすま、堆肥、コココイヤ、パーライト、パーミキュライト、ベントナイト、Azomite (登録商標)、カオリン、シリケート、軽石、タルク、液体肥料または液体防塵化学物質を含む、請求項 11 に記載の組成物。

50

【請求項 1 3】

前記種子が、トウモロコシ種子、ヒマワリ種子、セイヨウアブラナ種子、コムギ種子、キュウリ種子、トマト種子、イネ種子、および／またはワタ種子を含む、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 4】

1 つまたは複数の殺虫剤および／または殺真菌剤をさらに含む、請求項 1 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 5】

担体または種子との共製剤化のために微生物を選択するための方法であって：

1 つまたは複数のジピコリン酸（D P A）合成酵素遺伝子を含む微生物、1 つまたは複数の D P A 合成酵素タンパク質を発現する微生物、および／または D P A を生成する微生物を同定すること；および

担体または種子との共製剤化のために前記微生物を選択することを含む、方法。

【請求項 1 6】

前記選択された微生物を前記担体または前記種子と共製剤化することをさらに含む、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記 1 つまたは複数の D P A 合成酵素遺伝子が、D P A 合成酵素サブユニット A（D p a A）遺伝子および／または D P A 合成酵素サブユニット B（D p a B）遺伝子を含む、請求項 1 5 または請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記 D p a A 遺伝子が、配列番号 2 6 ~ 4 1 のアミノ酸配列のいずれか 1 つに対して少なくとも 2 0 % の配列同一性を有する D p a A タンパク質をコードするか、または前記 D p a B 遺伝子が、配列番号 4 2 ~ 5 6 のアミノ酸配列のいずれか 1 つに対して少なくとも 2 0 % の配列同一性を有する D p a B タンパク質をコードする、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記 D p a A 遺伝子が、配列番号 2 6 ~ 4 1 のアミノ酸配列のいずれか 1 つに対して少なくとも 6 0 % の配列同一性を有する D p a A タンパク質をコードするか、または前記 D p a B 遺伝子が、配列番号 4 2 ~ 5 6 のアミノ酸配列のいずれか 1 つに対して少なくとも 6 0 % の配列同一性を有する D p a B タンパク質をコードする、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記 D p a A 遺伝子が、配列番号 2 6 ~ 4 1 のアミノ酸配列のいずれか 1 つを含むかもしくはそれらからなる D p a A タンパク質をコードするか、または前記 D p a B 遺伝子が、配列番号 4 2 ~ 5 6 のアミノ酸配列のいずれか 1 つを含むかもしくはそれらからなる D p a B タンパク質をコードする、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記 1 つまたは複数の D P A タンパク質が、D P A 合成酵素サブユニット A（D p a A）タンパク質および／または D P A 合成酵素サブユニット B（D p a B）タンパク質を含む、請求項 1 5 または請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記 D p a A タンパク質が、配列番号 2 6 ~ 4 1 のアミノ酸配列のいずれか 1 つに対して少なくとも 2 0 % の配列同一性を含むかまたは前記 D p a B タンパク質が、配列番号 4 2 ~ 5 6 のアミノ酸配列のいずれか 1 つに対して少なくとも 2 0 % の配列同一性を含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記 D p a A タンパク質が、配列番号 2 6 ~ 4 1 のアミノ酸配列のいずれか 1 つに対して少なくとも 6 0 % の配列同一性を含むかまたは前記 D p a B タンパク質が、配列番号 4

10

20

30

40

50

2～56のアミノ酸配列のいずれか1つに対して少なくとも60%の配列同一性を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記D p aタンパク質が、配列番号26～41のアミノ酸配列のいずれか1つを含むかもしくはそれらからなり、または前記D p aタンパク質が、配列番号42～56のアミノ酸配列のいずれか1つを含むかしくはそれらからなる、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

1つまたは複数のジピコリン酸(D P A)合成酵素遺伝子を含む微生物を同定することが、前記1つまたは複数のD P A合成酵素遺伝子をコードする核酸または核酸配列を検出することを含む、請求項15から24のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項26】

前記核酸が、D N A、m R N A、またはc D N Aである、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記核酸を検出することが、核酸配列決定、核酸増幅、核酸ハイブリダイゼーション、およびマイクロアレイ解析のうちの1つまたは複数を含む、請求項25または請求項26に記載の方法。

【請求項28】

前記1つまたは複数のD P A合成酵素タンパク質を発現する微生物を同定することが、イムノアッセイまたは質量分析を含む、請求項15から27のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項29】

前記イムノアッセイが、ウエスタンブロッティング、E L I S A、フローサイトメトリー、または免疫組織化学を含む、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

D P Aを生成する微生物を同定することが、前記微生物中または前記微生物を含有する培地中でD P Aを検出することを含む、請求項15または請求項16に記載の方法。

【請求項31】

D P Aを検出することが、蛍光アッセイを含む、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

前記蛍光アッセイが、テルビウム-D P A蛍光アッセイを含む、請求項31に記載の方法。

30

【請求項33】

D P Aを生成する微生物を同定することが、1つもしくは複数のE t f AもしくはI s f遺伝子を含むおよび/または1つもしくは複数のE t f AもしくはI s fタンパク質を発現する微生物を同定することを含む、請求項15または請求項15に記載の方法。

【請求項34】

前記I s fタンパク質が、配列番号57～66のアミノ酸配列のいずれか1つに対して少なくとも20%の配列同一性を含む、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

前記I s fタンパク質が、配列番号57～66のアミノ酸配列のいずれか1つに対して少なくとも60%の配列同一性を含む、請求項34に記載の方法。

40

【請求項36】

前記I s fタンパク質が、配列番号57～66のアミノ酸配列のいずれか1つを含むかまたはそれらからなる、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

前記選択された微生物が、担体または種子と共製剤化される場合に、1つもしくは複数のジピコリン酸(D P A)合成酵素遺伝子を含まない、1つもしくは複数のD P A合成酵素タンパク質を発現しない、および/またはD P Aを生成しない微生物と比較して、生存能力を増加させた、請求項15から36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項38】

50

前記選択された微生物を前記担体または種子と共製剤化することが、1種または複数種の選択された微生物を前記担体または種子と接触させることを含む、請求項16から37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項39】

前記1種または複数種の選択された微生物が、液体培地中にある、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

前記1種または複数種の選択された微生物が、固体または乾燥形態である、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

前記担体または種子を1つもしくは複数のDPA合成酵素遺伝子を含まない、1つもしくは複数のDPAタンパク質を発現しない、および/またはDPAを生成しない1種または複数種の微生物と接触させることをさらに含む、請求項38から40のいずれか一項に記載の方法。

【請求項42】

前記担体が、乾燥または固体担体を含む、請求項16から41のいずれか一項に記載の方法。

【請求項43】

前記乾燥または固体担体が、乾燥肥料、土壌由来物質、有機物質、不活性材料、またはこれらの2つまたはそれより多くの混合物を含む、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

前記乾燥肥料が、尿素、カリ、リン酸アンモニウム、および/もしくは硝酸アンモニウムを含み、前記土壌由来物質が、粘土、ピート、石炭、もしくは無機土壌を含み；前記有機物質が、木炭、おがくず、コムギノダイズノエンバクのふすま、堆肥、もしくはココイヤーを含み；または前記不活性材料が、パーライト、バーミキュライト、ベントナイト、Azomite（登録商標）、カオリン、シリケート、軽石、もしくはタルクを含む、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

前記液体担体が、液体肥料または液体防塵化学物質を含む、請求項42に記載の方法。

【請求項46】

前記種子が、トウモロコシ種子、ヒマワリ種子、セイヨウアブラナ種子、コムギ種子、キュウリ種子、トマト種子、イネ種子、および/またはワタ種子を含む、請求項16から41のいずれか一項に記載の方法。

【請求項47】

前記処理された種子が、1つもしくは複数の殺虫剤および/または殺真菌剤をさらに含む、請求項46に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、2018年6月6日に出願された米国仮出願第62/681,469号の利益を主張する。

【0002】

分野

本開示は、ジピコリン酸を生成する微生物および生存能力の向上した微生物を同定する方法、微生物を担体と共に共製剤化する方法、ならびに微生物および/または共製剤を含む組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

微生物を基礎とする植物バイオスティミュラントは、生体系の健康を保護する持続可能

10

20

30

40

50

な農業実践をもたらす。さらに、植物および土壌のマイクロビオームを有益な微生物で補充することは、植物の成長および植物の適応度を促進する、生産性を増加させる、土壌肥沃度を改善する、ならびに化学物質の投入を低減する潜在性を有し、より持続可能な農業実践をもたらす。現在の農業実践では、微生物バイオスティミュラントを、多数の湿潤または乾燥した担体と共施用および / または共製剤化することができる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

微生物接種剤は、使用される担体（複数可）の化学的性質に影響を受けやすい場合がある。さらに、施用前の保管状態および保管期間も微生物に影響を及ぼし得る。これらの因子は、それらの生存能力に負の影響を与え、最終的に本技術分野におけるそれらの有効性を限定し得る。微生物の生存の改善および / または微生物の担体もしくは種子との共製剤化の改善をもたらす組成物および方法が本明細書に開示される。一部の実施形態では、本方法は、単独および / または1つもしくは複数の担体もしくは種子との共製剤化のいずれかで、生存能力または生存時間が拡大された1種または複数種の微生物を選択することを含む。

10

【0005】

一部の実施形態では、ジピコリン酸（DPA）を生成する微生物およびこのような微生物を含む組成物が本明細書に開示される。一例では、組成物としては、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Bacillus firmus*、*Bacillus flexus*、*Bacillus licheniformis*、*Bacillus megaterium*、*Bacillus pumilus*、*Bacillus koreensis*、*Bacillus drentensis*、*Bacillus subtilis*、*Clostridium bifermentans*、*Clostridium beijerinckii*、*Clostridium pasteurianum*、*Lactobacillus paracasei*、*Fontibacillus sp.*(*panacisegetis*)、*Oceanobacillus oncorhynchi*、*Paenibacillus lautus*、*Paenibacillus azoreducens*、*Paenibacillus chibensis*、*Paenibacillus cookii*、*Paenibacillus sp.*(*chitinolyticus*)、*Paenibacillus sp.*(*P1XP2*)、*Pseudomonas sp.*および*Streptomyces griseus*が挙げられる（一部の例では、本明細書において「DFC」コンソーシアムと称される）。一実施形態では、本組成物は、2019年5月16日にアメリカンタイプカルチャーコレクション（*American Type Culture Collection*（ATCC、*Manassas, VA*））に寄託され、寄託番号PTA-125924が付与された微生物種の細胞を含む。他の実施形態では、開示される微生物コンソーシアまたは組成物は、配列番号3~25と少なくとも95%の同一性（例えば、少なくとも96%、97%、98%、99%の同一性、またはそれより高い割合の同一性）を有する16S rDNA配列を有する2種またはそれより多い（例えば、5種もしくはそれより多い、10種もしくはそれより多い、15種もしくはそれより多い、20種もしくはそれより多い、またはすべて）微生物を含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる。

20

30

【0006】

本開示の微生物またはコンソーシア（例えば、DFCコンソーシアム）および1つもしくは複数の担体（例えば、乾燥担体または液体担体）または1種もしくは複数種の種子を含む組成物も開示される。一部の例では、担体として、液体肥料もしくは乾燥肥料、土壌由来物質、有機物質、不活性材料、防塵化学物質、またはそれらの2つまたはそれより多くの混合物が挙げられる。

40

【0007】

一部の実施形態では、本方法は、1つもしくは複数のジピコリン酸（DPA）合成酵素遺伝子を含む微生物、1種もしくは複数種のDPA合成酵素タンパク質を発現する微生物、および / または検出可能な量のDPAを生成する微生物を同定することを含む、担体または種子との共製剤化のために微生物を選択すること；ならびに担体との共製剤化のために微生物を選択することを含む。一部の実施形態では、本方法は、選択された微生物を担体または種子と共に共製剤化することを含む。一部の例では、選択された微生物は、以下に限定されないが、表26に列挙されたもののすべてを含む、表25または26に含まれ

50

るものの1つまたは複数を含む。

【0008】

一部の例では、本方法は、微生物中の、1つもしくは複数のDPA合成酵素遺伝子（例えば、DPA合成酵素サブユニットA（DpaA）遺伝子および/またはDPA合成酵素サブユニットB（DpaB）遺伝子）または1つもしくは複数のDpaAおよび/もしくはDpaBタンパク質を検出することを含む。DpaA遺伝子は、図1のアミノ酸配列（例えば、配列番号26～41）のいずれか1つに対して少なくとも20%（例えば、少なくとも60%）の配列同一性を有するDpaAタンパク質をコードする核酸を含む。DpaB遺伝子は、図2のアミノ酸配列（例えば、配列番号42～56）のいずれか1つに対して少なくとも20%（例えば、少なくとも60%）の配列同一性を有するDpaBタンパク質をコードする核酸を含む。DpaAタンパク質は、図1のアミノ酸配列（例えば、配列番号26～41）のいずれか1つに対して少なくとも20%（例えば、少なくとも60%）の配列同一性を有するDpaAタンパク質を含む。DpaBタンパク質は、図2のアミノ酸配列（例えば、配列番号42～56）のいずれか1つに対して少なくとも20%（例えば、少なくとも60%）の配列同一性を有するDpaBタンパク質を含む。さらなる例では、本方法は、微生物中の1つまたは複数のIsf遺伝子またはタンパク質を検出することを含む。Isf遺伝子は、図3のアミノ酸配列（例えば、配列番号57～67）のいずれか1つに対して少なくとも20%（例えば、少なくとも60%）の配列同一性を有するIsfタンパク質をコードする核酸を含む。Isfタンパク質は、図3のアミノ酸配列（例えば、配列番号57～67）のいずれか1つに対して少なくとも20%（例えば、少なくとも60%）の配列同一性を有するIsfタンパク質を含む。他の例では、本方法は、例えば、蛍光アッセイを利用して、微生物または微生物を含有する媒体中でDPAを検出することを含む。

10

20

【0009】

一部の実施形態では、本方法は、液体形態または乾燥形態で選択された微生物（以下に限定されないが、本明細書に開示される微生物コンソーシアを含む）を1つまたは複数の液体担体または乾燥担体と接触させることによって、1種または複数種の選択された微生物を担体と共に共製剤化することを含む。一部の例では、担体として、液体肥料もしくは乾燥肥料、土壌由来物質、有機物質、不活性材料、防塵化学物質、またはそれらの2つもしくはそれより多くの混合物が挙げられる。他の例では、本方法は、種子を1種または複数種の選択された微生物（以下に限定されないが、本明細書に開示される微生物コンソーシアを含む）で処理することを含む。一部の例では、本方法は、1種または複数種の選択された微生物ならびに1つもしくは複数のDPA合成酵素遺伝子を含まない、1つもしくは複数のDPA合成酵素タンパク質を発現しない1種もしくは複数種の微生物、および/または検出可能な量のDPAを生成しない微生物を担体または種子と共に共製剤化することをさらに含む。

30

【0010】

本開示の前記および他の特徴は、以下の詳細な説明から、それに続く添付の図面を参照して、より明らかになる。

【図面の簡単な説明】

40

【0011】

【図1A】図1は、示された細菌由来のDpaAタンパク質配列のアライメントである。13株に由来する14個のDpaA配列（配列番号26～39）を、デフォルト設定を有するClustal Omega（clustal.org/omega）を使用して整列させた。次いで、60%の最小配列の同一性閾値を使用して、コンセンサス配列を作成した（「コンセンサス60」；配列番号40）。PRK08306（配列番号41）は、NCBI CDD Conserved Domain Familyデータベース（ncbi.nih.gov/structure/cdd/cddsrv.cgi）から取得したDpaAスーパーファミリーのコンセンサス配列である。

【図1B】図1は、示された細菌由来のDpaAタンパク質配列のアライメントである。

50

13株に由来する14個のDpaA配列(配列番号26~39)を、デフォルト設定を有するClustal Omega(clustal.org/omega)を使用して整列させた。次いで、60%の最小配列の同一性閾値を使用して、コンセンサス配列を作成した(「コンセンサス60」;配列番号40)。PRK08306(配列番号41)は、NCBI CDD Conserved Domain Familyデータベース(ncbi.nih.gov/structure/cdd/cddsrv.cgi)から取得したDpaAスーパーファミリーのコンセンサス配列である。

【0012】

【図2】図2は、示された細菌由来のDpaBタンパク質配列のアライメントである。13株に由来する13個のDpaB配列(配列番号42~54)を、デフォルト設定を有するClustal Omega(clustal.org/omega)を使用して整列させた。次いで、60%の最小配列の同一性閾値を使用して、コンセンサス配列を作成した(「コンセンサス60」;配列番号55)。PRK08305(配列番号56)は、NCBI CDD Conserved Domain Familyデータベース(ncbi.nih.gov/structure/cdd/cddsrv.cgi)から取得したDpaBスーパーファミリーのコンセンサス配列である。

10

【0013】

【図3】図3は、5種の細菌由来の10個のIsfタンパク質配列(配列番号57~66)およびコンセンサス配列(配列番号67)のアライメントを示す。

20

【0014】

【図4】図4は、示した担体と組み合わせた細菌の生存をまとめたグラフである。

【0015】

【図5】図5は、パーライトまたは微生物コンソーシアム(AMC1)を含浸したパーライトで処理した植物における32日目のキュウリのシュートの乾燥重量を示すグラフである。

【0016】

【図6】図6は、パーライト、DFC微生物コンソーシアムを含浸したパーライト、ベントナイト、およびDFC微生物コンソーシアムを含浸したベントナイトで処理した植物における32日目のキュウリのシュートの乾燥重量を示すグラフである。

30

【0017】

【図7】図7は、未処理の植物、液体DFCコンソーシアムで処理した植物、およびDFC微生物コンソーシアムを含浸したパーライトで処理した植物における32日目のキュウリのシュートの乾燥重量を示すグラフである。

【0018】

【図8】図8は、殺虫剤/殺真菌剤処理と共に、トウモロコシおよびダイズ種子と組み合わせたDFCコンソーシアム由来の細菌の生存を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0019】

配列表

本明細書または添付の配列表に列挙された任意の核酸およびアミノ酸配列は、37 C . F . R . § 1 . 8 2 2 に定義されているヌクレオチドおよびアミノ酸の標準的な文字の略記を使用して示されている。少なくとも一部の事例では、各核酸配列の一本鎖のみが示されているが、示された鎖のいずれかを参照して、相補鎖が含まれていると理解される。

40

【0020】

配列番号1は、*Streptomyces pratensis*由来の16S rDNAコンセンサス核酸配列である。

【0021】

配列番号2は、*Streptomyces venezuelae*由来の16S rDNAコンセンサス核酸配列である。

【0022】

50

配列番号 3 は、*Bacillus firmus* 由来の 16 S rDNA 核酸配列である。

【0023】

配列番号 4 は、*Paenibacillus azoreducens* 由来の 16 S rDNA コンセンサス核酸配列である。

【0024】

配列番号 5 は、*Bacillus amyloliquefaciens* 由来の 16 S rDNA 核酸配列である。

【0025】

配列番号 6 は、*Bacillus flexus* 由来の 16 S rDNA 核酸配列である。

10

【0026】

配列番号 7 は、*Bacillus licheniformis* 由来の 16 S rDNA 核酸配列である。

【0027】

配列番号 8 は、*Bacillus megaterium* 由来の 16 S rDNA 核酸配列である。

【0028】

配列番号 9 は、*Bacillus pumilus* 由来の 16 S rDNA 核酸配列である。

20

【0029】

配列番号 10 は、*Bacillus koreensis* 由来の 16 S rDNA 核酸配列である。

【0030】

配列番号 11 は、*Bacillus drentensis* 由来の 16 S rDNA 核酸配列である。

【0031】

配列番号 12 は、*Bacillus subtilis* 由来の 16 S rDNA 核酸配列である。

【0032】

30

配列番号 13 は、*Clostridium bifermentans* 由来の 16 S rDNA 核酸配列である。

【0033】

配列番号 14 は、*Clostridium beijerinckii* 由来の 16 S rDNA 核酸配列である。

【0034】

配列番号 15 は、*Clostridium pasteurianum* 由来の 16 S rDNA 核酸配列である。

【0035】

配列番号 16 は、*Lactobacillus paracasei* 由来の 16 S rDNA 核酸配列である。

40

【0036】

配列番号 17 は、*Fontibacillus sp. (panacisegetis)* 由来の部分的な 16 S rDNA 核酸配列である。

【0037】

配列番号 18 は、*Oceanobacillus oncorhynchi* 由来の 16 S rDNA 核酸配列である。

【0038】

配列番号 19 は、*Paenibacillus lautus* 由来の 16 S rDNA 核酸配列である。

50

【 0 0 3 9 】

配列番号 20 は、*Paenibacillus chibensis* 由来の 16 S r DNA 核酸配列である。

【 0 0 4 0 】

配列番号 21 は、*Paenibacillus cookii* 由来の 16 S r DNA 核酸配列である。

【 0 0 4 1 】

配列番号 22 は、*Paenibacillus* sp. (*chitinolyticus*) 由来の 16 S r DNA 核酸配列である。

【 0 0 4 2 】

配列番号 23 は、*Paenibacillus* sp. (P1XP2) 由来の部分的な 16 S r DNA 核酸配列である。

【 0 0 4 3 】

配列番号 24 は、*Pseudomonas* sp 由来の 16 S r DNA 核酸配列である。

【 0 0 4 4 】

配列番号 25 は、*Streptomyces griseus* 由来の 16 S r DNA 核酸配列である。

【 0 0 4 5 】

配列番号 26 ~ 39 は、DpaA アミノ酸配列である。

【 0 0 4 6 】

配列番号 40 ~ 41 は、DpaA コンセンサスアミノ酸配列である。

【 0 0 4 7 】

配列番号 42 ~ 54 は、DpaB アミノ酸配列である。

【 0 0 4 8 】

配列番号 55 ~ 56 は、DpaB コンセンサスアミノ酸配列である。

【 0 0 4 9 】

配列番号 57 ~ 66 は、Isf アミノ酸配列である。

【 0 0 5 0 】

配列番号 67 は、Isf コンセンサスアミノ酸配列である。

【 0 0 5 1 】

詳細な説明

胞子を形成しない微生物は、胞子を形成する微生物よりも、処理および圃場施用の間に生じる有害因子の影響をより受けやすいことが多い。多大な微生物の目録から、胞子を形成する微生物を同定するための選択プロセスは、冗長で時間を浪費する場合がある。これは、通常、生存可能性および最終製品の貯蔵寿命の延長についての保障が限定された、生存可能性（例えば、選択した担体との共製剤における）についてのウェットラボ試験を含む。

【 0 0 5 2 】

単体のバイオスティミュラント製剤としておよび／または湿潤した担体もしくは乾燥した担体もしくは種子との共製剤において、高い信頼度で貯蔵寿命が延長された微生物を選択し、よって、圃場試験において試験する新たな生産品のリードタイムを有意に加速させるための新たな戦略および方法が本明細書において開示される。本明細書に記載されているように、DPA 遺伝子もしくはタンパク質が同定されかつ／または DPA を生成する孢子形成細菌は、DPA 遺伝子が同定されずかつ DPA 生成が検出できない株よりも、経時的な担体との共製剤における生存可能性に関し、より性能が優れている。最後に、DPA 生成株を含む微生物のコンソーシアムについて記載される。

【 0 0 5 3 】

I. 用語

別段に言及されていなければ、技術用語は、従来の慣用法に従って使用される。分子生

10

20

30

40

50

物学における一般用語の定義は、Krebs et al., Lewin's Genes XI, published by Jones and Bartlett Learning, 2012 (ISBN 1449659853); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829); Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by Wiley, John & Sons, Inc., 2011 (ISBN 8126531789); および George P. Redei, Encyclopedic Dictionary of Genetics, Genomics, and Proteomics, 2nd Edition, 2003 (ISBN: 0-471-26821-6)に見い出すことができる。

【0054】

用語および方法についての以下の説明は、本開示をより十分に説明するためおよび本開示を
10 実践するよう当業者を導くために提供される。単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が別段に明示していなければ、1つまたは1つより多くを指す。例えば、「細胞を含むこと (comprising a cell)」という用語は、単一または複数の細胞を含み、「少なくとも1つの細胞を含むこと (comprising at least one cell)」という語句に等しいと見なされる。本明細書で使
20 用される場合、「含む (comprises)」は、「含む (includes)」を意味する。よって、「AまたはBを含むこと (comprising A or B)」は、追加の要素を除外することなく、「A、B、またはAおよびBを含むこと (including A, B, or A and B)」を意味する。本明細書において言及されるすべての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、参照によりすべての目的でその全
20 体が組み込まれる。矛盾する場合には、用語の説明を含む本明細書が支配する。

【0055】

本明細書に記載のものに対して類似するまたは均等な方法および材料を本開示の技術を実践または試験するために使用することができるが、好適な方法および材料が以下に記載される。材料、方法、および例は、例示のみを目的とし、限定されることを意図するものではない。

【0056】

この開示の様々な実施形態の再調査を容易にするために、特定の用語についての以下の説明が提供される：

【0057】

担体：微生物、例えば、本明細書に記載の微生物または微生物コンソーシアに対して送達ビヒクルとして（例えば、共製剤中または接種剤として）使用することができる物質（本明細書において、「農業担体 (agro-carrier)」とも称される）。担体は、液体または固体（乾燥）であってもよい。例示的な担体として、液体または乾燥肥料、土壌由来物質（例えば、木炭、粘土、泥炭）、有機物質（例えば、おがくず、コムギ/ダイズ/エンバクのふすま、堆肥）および不活性材料（例えば、パーライト、パーミキュライト、ベントナイト、Azomite（登録商標）、カオリン、シリケート、タルク）が挙げられる。一部の例では、種子も担体として言及され得る。

【0058】

接触させること：固体および/または液体形態のいずれかを含めて、直接的な物理的結合下に置くこと。例えば、接触させることは、1種または複数種の微生物（例えば、微生物コンソーシアムにおける微生物）と担体または種子とで生じ得る。接触させることはまた、1種もしくは複数種の微生物、微生物/担体共製剤、または微生物/種子共製剤と土壌、植物、および/もしくは植物の部分（例えば、葉、茎、苗、根、および/または種子）とで生じ得る。

【0059】

培養すること：炭素、窒素および無機塩の同化可能な供給源の存在下において、1つまたは複数の生物または細胞を意図的に成長させること。例では、このような成長は、固体もしくは半固体栄養培地中、または養分が溶解もしくは懸濁された液体培地中で起こり得る。さらなる例では、培養することは、表面でまたは沈水培養で起こり得る。栄養培地は

10

20

30

40

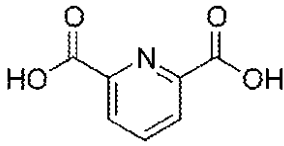
50

、複雑な養分から構成され得るかまたは化学的に定義され得る。

【0060】

ジピコリン酸（ピリジン - 2 , 6 - ジカルボン酸 ; D P A ）：以下の構造を有する化合物

【化1】



10

ほとんどの微生物では、酵素ジピコリン酸合成酵素によってジヒドロジピコリネートを D P A に変換することによって D P A が生成される。D P A 合成酵素は、2つのサブユニット、サブユニット A（D p a A または s p o V F A）およびサブユニット B（D p a B または s p o V F B）を有する。例示的な D p a A および D p a B のアミノ酸配列を本明細書に提供する（図1および2）。

【0061】

いくつかの細菌（例えば、いくつかの *C l o s t r i d i u m*）は、識別可能な D p a A 遺伝子および D p a B 遺伝子が欠如しているにもかかわらず、D P A を合成することができる。理論に拘束されないが、これらの細菌は、構造的に関連するタンパク質、すなわち、フラビンモノヌクレオチド（F M N）酸化還元酵素である電子伝達フラビントタンパク質（e t f A）を利用することが提唱される。E t f A は、ジヒドロジピコリネートをジピコリン酸に変換することによって生合成経路の最終工程を触媒すると考えられる（Orsburn et al., Mol. Microbiol. 75:178-186, 2010）。あるいは、いくつかの細菌は、D P A の生成において、鉄 - 硫黄フラビントタンパク質（I s f）を利用することができる。

20

【0062】

異種：異なる遺伝源または種に由来する。例えば、細胞に対して異種である核酸は、それが発現される細胞以外の生物または種に由来する。異種核酸を細菌細胞中に導入するための方法は、例えば、電気穿孔、リポフェクション、およびパーティクルガン法（particle gun acceleration）を含む、核酸に関する形質転換を含む。

30

【0063】

異種という用語の使用についての別の例では、異種プロモーターに作動可能に連結した核酸は、プロモーターが属する生物、種、または遺伝子以外の生物、種、または遺伝子に由来する。異種という用語の使用についての他の例では、ポリペプチドまたはその部分をコードする核酸は、例えば、天然に存在しない融合タンパク質を形成するために、第2のポリペプチドまたはその部分をコードする異種核酸に作動可能に連結している。

【0064】

単離された：「単離された」生物学的構成成分（例えば、核酸、タンパク質または生物）は、他の生物学的構成成分（例えば、他の細胞、細胞デブリ、または他のタンパク質もしくは核酸）から実質的に分離されるか精製されている。「単離された」生物学的構成成分としては、標準的な精製方法によって精製されたこれらの構成成分が挙げられる。この用語は、組換え核酸、タンパク質、または微生物、および化学合成された核酸またはペプチドも包含する。「単離された」（または「富化された」もしくは「精製された」という用語は、至純を必要とせず、少なくとも50%単離された、例えば、少なくとも75%、80%、90%、95%、98%、99%またはさらには100%単離された微生物または分子を含み得る。

40

【0065】

微生物：以下に限定されないが、細菌、古細菌、真菌、および藻類（例えば、微細藻類）を含む微生物。一部の例では、微生物は、単細胞生物（例えば、細菌、藍藻類、一部の真菌、または一部の藻類）である。他の例では、微生物という用語は、多細胞生物、例え

50

ば、特定の真菌または藻類（例えば、多細胞糸状菌または多細胞藻類）を含む。

【0066】

微生物組成物：少なくとも1つのタイプ（または種）の微生物の細胞（または少なくとも1つのタイプの微生物の細胞集団）を含む組成物（固体、液体、または少なくとも部分的にその両方であってもよい）。一部の例では、微生物組成物は、液体（例えば、保存、培養、もしくは発酵培地または液体肥料）中の1つまたは複数のタイプ（種）の微生物（または1つもしくは複数の微生物集団）の細胞を、例えば、液体中の懸濁物として含む。他の例では、微生物組成物は、固体またはゼラチン培地（以下に限定されないが、培養プレートを含む）またはスラリーもしくはペーストの表面にまたはそれに埋め込まれて、1つまたは複数のタイプ（種）の微生物（または1つもしくは複数の微生物集団）の細胞を含む。他の例では、微生物組成物は、乾燥材料または種子に関連する、例えば、乾燥材料または種子の表面にまたはそれに含浸させた1つまたは複数のタイプ（または種）の微生物（または1つもしくは複数の微生物集団）の細胞を含む。

10

【0067】

微生物コンソーシアム：一部の場合には、お互いに物理的に接触している2つまたはそれより多い微生物種の細胞の混合物、群集、または集合。コンソーシアム中の微生物は、直接的な物理的接触によってもしくは生化学的相互作用により、またはその両方で互いに影響を及ぼし得る。例えば、コンソーシアム中の微生物は、養分、代謝物、または気体をお互いに交換し得る。よって、一部の例では、コンソーシアム中の微生物の少なくとも一部は、代謝的に相互に依存する。このような相互に依存する相互作用は、時間と共におよび培養条件を変化させながら、特徴および程度が変化し得る。

20

【0068】

形質導入および形質転換した：ウイルスまたはベクターは、細胞中に核酸を移入する場合、細胞に「形質導入する」。細胞は、DNAが細胞によって複製される場合に、核酸を細胞中に形質導入することによって、細胞ゲノム中に核酸を組み込むことによって、またはエピソード複製によって「形質転換される」。本明細書で使用される場合、形質転換という用語は、細菌のコンジュゲーション、ウイルスベクターによるトランスフェクション、プラスミドベクターによる形質転換、ならびに電気穿孔、リポフェクション、およびパーティクルガン法による裸のDNAの導入を含む、核酸分子がこのような細胞中に導入され得るすべての技法を包含する。

30

【0069】

ベクター：宿主細胞中に導入され、それによって、形質転換または形質導入された宿主細胞を生成し得る核酸分子。組換えDNAベクターは、組換えDNAを含むベクターである。ベクターは、宿主細胞における複製を可能とする核酸配列、例えば、複製起点を含み得る。ベクターは、1つもしくは複数の選択可能なマーカー遺伝子、異種核酸の導入のためのクローニング部位、プロモーター（例えば、作動可能に連結した核酸の発現のための）、および/または当技術分野で公知の他の遺伝子エレメントも含み得る。ベクターは、グラム陰性および/またはグラム陽性細菌の細胞内での発現のためのプラスミドを含むプラスミドベクターを含む。例示的なベクターとしては、E. coliにおいて使用するためのものが挙げられる。

40

【0070】

生存能力：成長または繁殖のために適切な条件下で、成長または繁殖する細胞（例えば、微生物細胞）の能力。一部の例では、「生存」または「生存可能性」は、液体もしくは乾燥状態において、単独で、他の微生物細胞との混合物中で、および/または担体もしくは種子と共製剤化された場合に、一定期間の保管後の細胞（例えば、微生物細胞）の生存能力を指す。

【0071】

II. 共製剤中で生存能力を有する微生物を同定する方法

液体または固体担体と共製剤化した場合に、生存できるかまたは生存可能なままである微生物を同定する方法が本明細書に開示される。微生物は、個々に、担体もしくは種子と

50

共製剤化されてもよく（例えば、微生物の単一の株または種は担体または種子と共製剤化される）または担体もしくは種子と共製剤化されるコンソーシアムもしくは微生物の混合物（例えば、微生物の2つもしくはそれより多い株または種）の一部であってもよい。他の実施形態では、本方法は、コンソーシアム（単体のコンソーシアムとしてまたは担体もしくは種子と共製剤化した）において長期間、生存できるかまたは生存可能なままである微生物を同定することを含む。

【0072】

一部の例では、本明細書に開示される方法により同定した微生物、例えば、1つもしくは複数のDPA合成酵素遺伝子を含み、1つもしくは複数のDPAタンパク質を発現し、および/または検出可能な量のDPAを生成する微生物は、1つもしくは複数のDPA合成酵素遺伝子を含まない、1つもしくは複数のDPA合成タンパク質を発現しない、および/または検出可能な量のDPAを生成しない微生物よりも生存能力が改善された（単独でまたは共製剤中で）。一部の例では、本明細書に開示される方法により同定した微生物は、1つもしくは複数のDPA合成酵素遺伝子を含まない、1つもしくは複数のDPA合成タンパク質を発現しない、および/または検出可能な量のDPAを生成しない微生物と比較して、少なくとも10%増加した生存能力（例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも5倍、またはより多く増加した生存能力）を有する。増加した生存能力は、一定期間後のより多数の生存できる細胞および/またはより長期間の生存能力を含み得る。

10

20

【0073】

一部の実施形態では、本明細書に開示される方法は、そのゲノム中に、DPA合成酵素をコードする1つもしくは複数の遺伝子を含み、1つもしくは複数のDPA合成酵素タンパク質を発現し、および/または検出可能な量のDPAを生成する微生物を同定することを含む。このような微生物は、個々にまたは液体もしくは固体担体と共製剤化される場合に、生存できるかまたは生存可能なままであり得る微生物として同定される（例えば、DPA合成酵素をコードする遺伝子を含まない、1つもしくは複数のDPA合成酵素タンパク質を発現しない、および/または検出可能な量のDPAを生成しない1種または複数種の微生物と比較して）。同定された微生物を下流での使用のために、例えば、液体または固体担体または種子との共製剤化のためにさらに選択することができる。一部の例では、微生物は、少なくとも1日、少なくとも3日、少なくとも5日、少なくとも7日、少なくとも10日、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも5週間、少なくとも6週間、少なくとも7週間、少なくとも2カ月、少なくとも3カ月、少なくとも4カ月、少なくとも5カ月、少なくとも6カ月、少なくとも8カ月、少なくとも10カ月、少なくとも1年、少なくとも2年、またはそれより長い期間（例えば、少なくとも1~28日、少なくとも5~21日、少なくとも2~6週間、少なくとも4~8週間、少なくとも2~6カ月、少なくとも3~9カ月、少なくとも4~10カ月、少なくとも6カ月から1年、少なくとも1~2年、またはそれより長い期間）生存できるかまたは生存可能なままである（個々にまたは担体もしくは種子と共製剤化される場合に）。

30

【0074】

微生物の生存能力または生存を決定する方法は、培養中の微生物の成長を検出することを含む。一部の例では、微生物細胞を含有する調製物（液体もしくは乾燥状態で、または担体もしくは種子との共製剤中で）を液体培地中で接種し、微生物成長に好適な条件下でインキュベートし、定義された期間後の微生物の存在および/または量を測定する。他の例では、微生物細胞を含有する調製物（液体もしくは乾燥状態で、または担体もしくは種子との共製剤中で）を固体または半固体培地を含有するプレート上に画線し、微生物成長に好適な条件下でインキュベートし、微生物の存在および/または量（例えば、コロニーの存在、サイズ、および/または数）を測定する。一部の例では、微生物は、例えば、PCR法を使用して同定される。微生物細胞の生存能力および同一性を決定するための例示的な方法を実施例1に提供する。

40

50

【0075】

さらなる実施形態では、本方法は、1つもしくは複数のDPA合成酵素遺伝子を含む、1つもしくは複数のDPA合成酵素タンパク質を発現する、および/または検出可能な量のDPAを生成する1種または複数種の微生物を選択すること、および必要に応じて、1種または複数種の選択された微生物を1つまたは複数の担体または種子と共製剤化することを含む。一部の例では、本方法は、1種または複数種の選択された微生物の、1つまたは複数の担体または種子との共製剤を調製することを含む。本方法は、1種または複数種の微生物を1つまたは複数の担体または種子と、例えば、固体(乾燥)または液体形態で接触させることを含む。一部の例では、担体(複数可)または種子(複数可)を微生物の混合物と接触させる。混合物は、DPA合成酵素を発現するかまたはDPAを生成する微生物(例えば、以下に限定されないが、DFCを含む、本明細書に記載の方法を使用して選択または生成される微生物)を含み、DPA合成酵素を発現しないかまたはDPAを生成しない1種または複数種の微生物を含んでもよい。一部の例では、担体を1mL当たり約 $10^3 \sim 10^9$ 個またはそれより多くの細胞(例えば、1mL当たり約 1×10^3 個の細胞、1mL当たり約 5×10^3 個の細胞、1mL当たり約 1×10^4 個の細胞、1mL当たり約 5×10^4 個の細胞、1mL当たり約 1×10^5 個の細胞、1mL当たり約 5×10^5 個の細胞、1mL当たり約 1×10^6 個の細胞、1mL当たり約 5×10^6 個の細胞、1mL当たり約 1×10^7 個の細胞、1mL当たり約 5×10^7 個の細胞、1mL当たり約 1×10^8 個の細胞、1mL当たり約 5×10^8 個の細胞、1mL当たり約 1×10^9 個の細胞、1mL当たり約 5×10^9 個の細胞またはそれより多く)の各微生物を含む液体と接触させる。

10

20

【0076】

一部の実施形態では、選択された微生物の1種または複数種(および必要に応じて、1種または複数種の追加の微生物)を含む液体を1つまたは複数の乾燥担体または種子と接触させて配置する。一部の例では、微生物を含む液体は、新鮮なもしくは凍結した細菌培養液であるかまたは新鮮なもしくは凍結した細菌培養液の混合物である。他の例では、微生物を含む液体は、凍結乾燥した微生物が添加された液体である。1種または複数種の微生物を含む液体は、乾燥担体または種子中に浸される。一部の例では、1種または複数種の微生物を含む液体の量は、乾燥担体または種子が飽和されるように使用され、例えば、担体または種子全体に微生物の相対的に均一な分布がもたらされる。しかし、飽和しない量の液体が使用されてもよい。非限定的な例では、量は、約 $35 \mu\text{L/g}$ から 6 mL/g である。一部の例では、微生物を含浸した担体または種子を乾燥させ(例えば、室温でまたは約 $30 \sim 35$ で)、周囲温度で保管する(例えば、閉じたまたは密閉した容器内で)。

30

【0077】

他の実施形態では、選択した微生物の1種または複数種(および必要に応じて、1種または複数種の追加の微生物)を含む液体を1つまたは複数の液体担体と混合する。一部の例では、微生物を含む液体は、新鮮なもしくは凍結した細菌培養液であるかまたは新鮮なもしくは凍結した細菌培養液の混合物である。他の例では、微生物を含む液体は、凍結乾燥した微生物が添加された液体である。微生物を含む液体を、いずれかの選択された量、例えば、 $0.1\% \sim 90\%$ (v/v)、例えば、 $0.5 \sim 1\%$ 、 $1 \sim 5\%$ 、 $2 \sim 10\%$ 、 $3 \sim 6\%$ 、 $4 \sim 8\%$ 、 $5 \sim 15\%$ 、 $8 \sim 20\%$ 、 $10 \sim 25\%$ 、 $20 \sim 40\%$ 、 $30 \sim 50\%$ 、 $40 \sim 60\%$ 、 $50 \sim 75\%$ 、または $70 \sim 90\%$ (v/v)で液体担体と混合することができる。一部の例では、微生物を約 0.1% 、約 0.2% 、約 0.5% 、約 1% 、約 2% 、約 3% 、約 4% 、約 5% 、約 6% 、約 7% 、約 8% 、約 9% 、約 10% 、約 20% 、約 30% 、約 40% 、約 50% 、約 60% 、約 70% 、約 80% 、または約 90% (v/v)で液体担体と混合する。非限定的な一例では、微生物の混合物は、 0.5% (v/v)または $1:180$ の比で液体担体に添加される。別の非限定的な例では、微生物の混合物を 90% (v/v)で濃縮した液体担体(例えば、10倍に濃縮した液体担体)に添加し、液体担体の1倍の濃度をもたらす。混合物中の微生物細胞の量を調整して、使

40

50

用される希釈係数に応じて、所望の最終濃度の微生物細胞を達成することができる。微生物の混合物を周囲温度で保管する（例えば、閉じたまたは密閉した容器内で）。

【0078】

一部の実施形態では、微生物の乾燥調製物（例えば、凍結乾燥した微生物）を乾燥担体または種子との共製剤中で使用する。一部の例では、凍結乾燥した微生物を乾燥担体または種子と混合する（例えば、1 kg の担体または種子当たり約 40 mg の微生物から 1 kg の担体または種子当たり約 1 g の微生物）。この実施形態の一部の例では、凍結乾燥した微生物を液体に添加し、次いで、乾燥担体または種子と接触させる。他の例では、凍結乾燥した微生物を液体に添加し、次いで、上記の乾燥担体または種子と接触させる。

【0079】

A. DPA 合成酵素核酸の検出

一部の実施形態では、本方法は、微生物または微生物集団における 1 つまたは複数の DPA 合成酵素核酸分子（例えば、DNA、cDNA、または mRNA）の存在を特定することを含む。一部の例では、本方法は、微生物のゲノムにおいて 1 つまたは複数の DPA 合成酵素遺伝子（例えば、DpaA および / または DpaB）を検出することを含む。一部の例では、微生物は、DpaA 遺伝子と DpaB 遺伝子の両方を含む。例示的な DPA 合成酵素遺伝子としては、B. subtilis の DpaA（2018 年 6 月 3 日の GenBank に存在するものとして参照により本明細書に組み込まれる GenBank 受託番号 NC_000964.3、1744367 - 1745260）および DpaB（2018 年 6 月 3 日の GenBank に存在するものとして参照により本明細書に組み込まれる GenBank 受託番号 NC_000964.3、1745236 - 1745865）が挙げられる。一部の例では、DpaA 遺伝子は、図 1 に示されているタンパク質または図 1 に示されているタンパク質（例えば、配列番号 26 ~ 39）と少なくとも 20 % の配列同一性（例えば、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、またはそれより高い割合）を有するタンパク質をコードする。一部の例では、DpaB 遺伝子は、図 2 に示されているタンパク質または図 2 に示されているタンパク質（例えば、配列番号 42 ~ 54）と少なくとも 20 % の配列同一性（例えば、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、またはそれより高い割合）を有するタンパク質をコードする。一部の例では、DpaA または DpaB タンパク質は、それぞれ、図 1 および 2 において「コンセンサス 60」配列において特定される 1 つまたは複数の保存された領域を有する（それぞれ、配列番号 40 および 55）。

【0080】

他の実施形態では、本方法は、DPA 合成の代替経路に含まれる 1 つまたは複数の核酸（例えば、DNA、mRNA、または cDNA）の存在を特定することを含む。一部の例では、本方法は、電子伝達フラビンタンパク質（例えば、EtfA）または鉄 - 硫黄フラビンタンパク質（例えば、Isf）をコードする 1 つまたは複数の核酸の存在または発現を特定することを含む。電子伝達フラビンタンパク質は、アルファおよびベータサブユニットからなるヘテロダイマーであり、アデニンヌクレオチドアルファ加水分解酵素スーパーファミリーの一部である。例示的な細菌の EtfA 核酸配列としては、そのそれぞれが 2018 年 6 月 3 日の GenBank に存在するものとして参照により本明細書に組み込まれる GenBank 受託番号 CP000312.1（2508382 - 2509389）、NC_004578.1（2407768 - 2408697）、NC_009089.1（977905 - 978927）、NC_019382.1（1357738 - 1356809、補体）、NC_003030.1（2833696 - 2833268、補体

10

20

30

40

50

)、NC__002971.4(1062557-1061613、補体)、およびNC__003063.2(650447-651376)が挙げられる。例示的な細菌のEtfAアミノ酸配列としては、そのそれぞれが2018年6月3日のGenBankに存在するものとして参照により本明細書に組み込まれるABG86939、NP__792007.1、YP__001087282.1、YP__006967336.1、NP__349315.1、NP__820116.1、およびNP__357016.2が挙げられる。例示的なIsf核酸およびタンパク質配列としては、それぞれ、GenBank受託番号CP016318(3060700-3061308)およびARE63607(2018年6月3日のGenBankに存在するものとして参照により本明細書に組み込まれる)ならびに図3に示されたもの(例えば、配列番号57~66)が挙げられる。

10

【0081】

一部の例では、DPA合成酵素核酸(またはEtfAもしくはIsf核酸)は、微生物の配列解析(例えば、ゲノムシーケンシングおよび/またはDPA合成酵素に特異的なオリゴヌクレオチドを使用するシーケンシング)によって同定され得る。一部の例では、配列解析は、GenBank(ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/)、ENSEMBL(ensembl.org/index.html)、IMG(img.jgi.doe.gov)、MicrobesOnline(microbesonline.org)、SEED(theseed.org)、またはGOLD(gold.jgi-psf.gov)を含む1つまたは複数のデータベースに存在する配列を使用して実施される。DPA合成酵素遺伝子を同定する例示的な方法は、以下の実施例1において提供される。同様の方法を使用して、EtfAまたはIsf遺伝子を同定することができる。

20

【0082】

一部の例では、微生物または微生物集団由来の核酸を検出前に単離するか、増幅させるか、またはその両方を行う。一部の例では、増幅および発現の検出は、同時にまたはほぼ同時に行う。一部の例では、核酸の発現は、PCR(例えば、PCR、リアルタイムPCR、RT-PCRまたは定量的RT-PCR)によって検出することができる。例えば、市販のキットを用いることによって、核酸を単離および増幅させることができる。ある例では、DpaAおよび/またはDpaB(またはEtfAもしくはIsf)核酸の増幅を、このような産物の増幅を可能にするのに十分な条件下で、可能にするプライマーと共に、核酸をインキュベートすることができる。得られるアンプリコンを検出することができる。

30

【0083】

別の例では、微生物または微生物集団由来の核酸を、非常に厳密な条件下で、DpaAおよび/またはDpaB(またはEtfAもしくはIsf)核酸分子(例えば、cDNA、ゲノムDNA、またはRNA(例えば、mRNA))に結合することができるプローブと共にインキュベートする。次いで、得られるハイブリダイゼーションを検出することができる。他の例では、微生物または微生物集団は、微生物(複数可)から得られる単離された核酸分子をアレイに適応することによってスクリーニングされる。一例では、このアレイは、DpaAおよび/またはDpaB(またはEtfAもしくはIsf)核酸に相補的なオリゴヌクレオチドを含む。一例では、微生物核酸分子を、単離された核酸分子とオリゴヌクレオチドプローブの間でのハイブリダイゼーションを可能にするのに十分な時間、DpaAおよび/またはDpaB(またはEtfAもしくはIsf)に対して相補的なオリゴヌクレオチドを含むアレイと共にインキュベートし、それによって、単離された核酸分子：オリゴヌクレオチド複合体を形成する。次いで、単離された核酸分子：オリゴヌクレオチド複合体を解析して、核酸が試料中に存在するかどうかを決定する。

40

【0084】

B. DPA合成酵素タンパク質の検出

DPA合成酵素核酸を検出する代替として、またはそれに加えて、イムノアッセイ(例えば、ウェスタンブロット、免疫組織化学、フローサイトメトリー、またはELISA)

50

または質量分析などの方法を使用して、タンパク質を検出することができる。一部の例では、D p a A タンパク質は、図 1 に示されているタンパク質（例えば、配列番号 2 6 ~ 3 9）と少なくとも 2 0 % の配列同一性（例えば、少なくとも 2 5 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 3 5 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 4 5 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 5 5 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、またはそれより高い割合）を有するタンパク質を含む。一部の例では、D p a B タンパク質は、図 2 に示されているタンパク質（例えば、配列番号 4 2 ~ 5 4）と少なくとも 2 0 % の配列同一性（例えば、少なくとも 2 5 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 3 5 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 4 5 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 5 5 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、またはそれより高い割合）を有するタンパク質を含む。一部の例では、D p a A または D p a B タンパク質は、それぞれ、図 1 および 2 の「コンセンサス 6 0」配列（それぞれ、配列番号 4 0 および 5 5）において特定される 1 つまたは複数の保存された領域を有する。他の例では、I s f タンパク質は、図 3 に示されているタンパク質（例えば、配列番号 5 7 ~ 6 6）と少なくとも 2 0 % の配列同一性（例えば、少なくとも 2 5 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 3 5 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 4 5 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 5 5 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、またはそれより高い割合）を有するタンパク質を含む。

10

20

30

40

50

【0085】

一部の例では、タンパク質は、検出前に精製される。一例では、D p a A および / または D p a B（または I s f）タンパク質は、微生物試料を D p a A および / または D p a B（または I s f）と特異的に結合する抗体と共にインキュベートすることによって検出され得る。抗体（「一次抗体」）は、検出可能な標識を含み得る。例えば、一次抗体は、直接標識されてもよく、または次に、試料を標識される（例えば、蛍光標識で）二次抗体と共にインキュベートしてもよい。次いで、標識を、例えば、顕微鏡法、E L I S A、フローサイトメトリー、または分光光度法によって検出することができる。別の例では、試料を、D p a A および / または D p a B タンパク質の発現を検出するためのウエスタンブロットによって解析する。D p a A、D p a B、または I s f に対する抗体を、例えば、図 1 ~ 3 のアミノ酸配列を使用して、当業者は作製することができる。

【0086】

抗体または二次抗体に対する好適な標識としては、種々の酵素、接合団、蛍光材料、発光材料、磁気剤および放射性材料が挙げられる。好適な酵素の非限定的な例としては、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ - ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる。好適な接合団複合体の非限定的な例としては、ストレプトアビジン / ビオチンおよびアビジン / ビオチンが挙げられる。好適な蛍光材料の非限定的な例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、イソチオシアン酸フルオレセイン、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、またはフィコエリトリンが挙げられる。非限定的な例示的発光材料は、ルミノールであり；非限定的な例示的磁気剤はガドリニウムであり、および非限定的な例示的放射性標識としては、¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S または ³H が挙げられる。

【0087】

C . D P A の検出

一部の実施形態では、本方法は、D P A（例えば、検出可能なレベルの D P A）を生成する微生物または微生物集団を同定することを含む。一部の例では、本方法は、少なくとも 1 n M の D P A（例えば、少なくとも 2 n M、少なくとも 5 n M、少なくとも 1 0 n M、少なくとも 2 5 n M、少なくとも 5 0 n M、少なくとも 1 0 0 n M、少なくとも 2 0 0 n M、少なくとも 5 0 0 n M の D P A、またはそれより多く）を検出することを含む。一

例では、本方法は、テルビウム - D P A 蛍光アッセイを使用して D P A を検出することを含む（例えば、Rosen, Anal. Chem. 69:1082-1085, 1997 ; Pellegrino et al., Anal. Chem. 70:1755-1760, 1998 ; Ammann et al., Int. J. Microbiol. 2011:435281, 2011を参照されたい）。簡潔には、D P A をテルビウム（I I I）と接触させることにより、テルビウム（I I I）と比較して蛍光光度が増加した複合体が形成され、試料中の D P A の検出および / または定量が可能となる。例示的なテルビウム - D P A アッセイは、実施例 1 に記載されている。

【 0 0 8 8 】

I I I . 微生物および共製剤

そのゲノム内に 1 つもしくは複数の D P A 合成酵素遺伝子を含み、1 つもしくは複数の D P A 合成酵素タンパク質を発現し、および / または D P A を生成する微生物が本明細書に開示される。一部の例では、微生物は、そのゲノム内に 1 つもしくは複数の D P A 合成酵素遺伝子を含み、1 つもしくは複数の D P A 合成酵素タンパク質を発現し、および / または D P A を生成するように改変される。微生物の 1 つまたは複数の担体または種子との共製剤も開示される。

10

【 0 0 8 9 】

A . 微生物

1 つもしくは複数の D P A 合成酵素遺伝子を有する、1 つもしくは複数の D P A 合成酵素タンパク質を発現する、および / または D P A を生成する微生物としては、以下に限定されないが、*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus flexus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. (*B. kochii*, *B. p*ocheonensis および *Bacillus* sp. (R-27341 株) に密接に関連している)、*Clostridium beijerinckii*, *Oceanobacillus oncorhynchi*, *Paenibacillus chibensis*, *Paenibacillus cookii*, *Paenibacillus lautus*, *Virgibacillus halophilus*, *Paenibacillus azoreducens* および *Bacillus firmus* が挙げられる。一部の例では、これらの細菌は、P C T 公開番号第 W O 2 0 1 8 / 0 4 5 0 0 4 号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されているものを含む。追加の微生物としては、表 2 5 および 2 6 に列挙されたものが挙げられる。一部の例では、これらの微生物は、孢子形成能力も有するが、しかし、孢子形成能力および識別可能な D P A 合成酵素遺伝子の存在または D P A 生成は完全には一致しない（例えば、表 6 を参照されたい）。

20

30

【 0 0 9 0 】

追加の実施形態では、1 つもしくは複数の D P A 合成酵素遺伝子を有する、1 つもしくは複数の D P A 合成酵素タンパク質を発現する、および / または D P A を生成する微生物を含む組成物、例えば乾燥製剤コンソーシアム（Dry Formulation Consortium ; D F C）と本明細書で言及されるものなどが開示される。D F C における微生物としては、以下に限定されないが、*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus firmus*, *Bacillus flexus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus koreensis*, *Bacillus drentensis*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium pasteurianum*, *Lactobacillus paracasei*, *Fontibacillus* sp. (panacisegetis), *Oceanobacillus oncorhynchi*, *Paenibacillus lautus*, *Paenibacillus azoreducens*, *Paenibacillus chibensis*, *Paenibacillus cookii*, *Paenibacillus* sp. (chitinolyticus), *Paenibacillus* sp. (P1XP2), *Pseudomonas* sp. および *Streptomyces griseus* が挙げられる。一実施形態では、本組成物は、2 0 1 9 年 5 月 1 6 日にアメリカンタイプカルチャーコレクション（American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)）に寄託され、寄託番号 P T A - 1 2 5 9 2 4 が付与された微生物種の細胞を含む。

40

【 0 0 9 1 】

当業者であれば、特に種または株レベルでの微生物の同定が常に可能でないことを認識する。一部の例では、本明細書に記載の組成物中の微生物は、1 6 S r D N A シーケン

50

シングおよび全ゲノムシーケンシング、それに続く、公共データベースにおける配列の比較によって解析された。しかし、配列データベースにおける情報が限定されていることによって（一部の種もしくは株についての情報が少ないかもしれないことおよび／または経時的に命名法が変化することを含む）、最終的に種または株を同定することが困難な場合がある。よって、一部の実施形態では、本開示の組成物中に含まれる微生物種は、本明細書において提供される 16S rDNA 配列（配列番号 3 ~ 25）に対する配列同一性によって同定される。一部の例では、本開示の微生物コンソーシアまたは組成物は、配列番号 3 ~ 25 に対して少なくとも 95% の同一性（例えば、少なくとも 96%、97%、98%、99%、またはそれより高い割合の）を有する 16S rDNA 配列を有する微生物のうちの 2 種またはそれより多く（例えば、5 種もしくはそれより多く、10 種もしくはそれより多く、15 種もしくはそれより多く、20 種もしくはそれより多く、またはすべて）を含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる。

10

【0092】

1 つもしくは複数の DPA 合成酵素遺伝子を有する、1 つもしくは複数の DPA 合成酵素タンパク質を発現する、および／または検出可能な量の DPA を生成する微生物は、1 つもしくは複数の DPA 合成酵素遺伝子を天然に有さない、1 つもしくは複数の DPA 合成酵素タンパク質を発現しない、および／または DPA を生成しないが、そうであるように改変される微生物も含む。一部の例では、1 つもしくは複数の DPA 合成酵素遺伝子を天然に有さない、1 つもしくは複数の DPA 合成酵素タンパク質を発現しない、および／または DPA を生成しない微生物は、1 つもしくは複数の異種 DPA 合成酵素遺伝子、例えば、DpaA および／または DpaB または 1 つもしくは複数の Isf 遺伝子が発現するように改変される。例示的な DpaA および DpaB 遺伝子およびタンパク質ならびに Isf 遺伝子およびタンパク質は、セクション II および図 1 ~ 3 に記載されている（配列番号 26 ~ 67 を含む）。

20

【0093】

1 つもしくは複数の異種 DPA 合成酵素遺伝子が発現するよう改変することができる細菌としては、以下に限定されないが、*Azotobacter* (例えば *Azotobacter vinelandii*)、*Clostridium* (例えば *Clostridium pasteurianum*)、*Streptomyces* (例えば *Streptomyces griseus*、*Streptomyces venezuelae*、*Streptomyces pratensis*)、*Sporolactobacillus* spp. (例えば *Sporolactobacillus dextrus*)、*Sporosarcina* spp. (例えば *Sporosarcina halophila*)、*Desulfotomaculum* spp. (例えば *Desulfotomaculum guttoideum*)、*Nocardiosis* Spp. (例えば *Nocardiosis sinuspersici*)、*Promicromonospora* spp. (例えば *Promicromonospora enterophila*、*Promicromonospora soli*)、*Brevibacillus* spp. (例えば *Brevibacillus centrosporus*)、*Rummeliibacillus* spp. (例えば *Rummeliibacillus pycnus*)、*Lysinibacillus* spp.、*Terribacillus* spp. (例えば *Terribacillus shanxiensis*)、*Micromonospora* spp. (例えば *Micromonospora fulva*、*Micromonospora palomenea*)、*Saccharopolyspora* spp. (例えば *Saccharopolyspora spinose*、*Saccharopolyspora indica*) および *Fontibacillus* spp. (例えば *Fontibacillus panacisegetis*) が挙げられる。一部の例では、これらの細菌は、PCT 公開番号第 WO 2018/045004 号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されているものを含む。

30

40

【0094】

一部の例では、異種 DpaA および／または DpaB 遺伝子は、プロモーターの制御下に置かれる。一部の例では、プロモーターは構成的プロモーターであるが、他の例では、プロモーターは誘導性である（例えば、誘導性 T7 プロモーター）。追加の例では、プロモーターは、アラビノース誘導性プロモーター（例えば、pBAD システム）、lac プロモーター（IPTG / ラクトース直接誘導）、trc プロモーター（IPTG / ラクトース直接誘導）、テトラサイクリン誘導性プロモーター、または pho プロモーター（リン酸欠乏誘導性）である。異種 DpaA および／または DpaB 遺伝子は、例えば、プロモーターに作動可能に連結したベクター中に含まれ得る。同様の方法を EtfA または I

50

s f 遺伝子について使用することができる。

【0095】

複数の遺伝子（例えば、2つまたはそれより多いDPA合成酵素および/またはIsf遺伝子）が細菌中で同時に発現され得る。単一経路に由来する複数の酵素の適切かつ同等な産生を保証するために、異種遺伝子をコードする各核酸を必要に応じて、誘導性T7プロモーターなどの単一の種類のプロモーターの制御下に置く。一例は、Duet（商標）ベクター（Novozymes）であり、これは、単一細胞において4つのプラスミドの有効な増殖および維持のために適合性レプリコンおよび薬物耐性遺伝子に関して設計されている。これにより、最大8つの異なるタンパク質の共発現が可能となる。他の例では、ベクターは、pETベクター、例えば、pET21またはpET28ベクターである。pETおよびpETを基礎とするベクターは、例えば、Novagen（San Diego, CA）、またはClontech（Mountain View, CA）から市販されている。

10

【0096】

一例では、ベクターは、pET21aまたはpET28aである。一部の例では、pETベクターは、耐性マーカー（例えば、アンピシリンまたはカナマイシン耐性）およびT7プロモーターを含む。複数のクローニング部位は、1つより多い遺伝子（例えば、2、3、4、またはそれより多い）が単一のベクターから発現され得るように操作されている。一部の例では、遺伝子は、単一のmRNAおよび生成された複数のポリペプチドを含むマルチシストロン性生成物（例えば、バイシストロン性、トリシストロン性などの生成物）として発現される。他の例では、遺伝子は、個々のmRNAおよび各遺伝子に対して生成されたポリペプチドを含む複数のモノシストロン性生成物として発現される。適切なベクターは、発現される遺伝子（複数可）および形質転換される宿主細胞に応じて選択することができる。

20

【0097】

一部の例では、プラスミドは染色体外に導入され、宿主微生物内で複製される。他の例では、プラスミドの導入後、二重相同組換え事象が起こり、1つまたは複数の遺伝子がゲノム中に挿入される。

【0098】

組換えDNAによる細菌細胞の形質転換が行われてもよい。宿主が細菌である場合、DNA取り込みの可能なコンピテント細胞は、指数成長期後に回収された細胞から調製され、次に、当技術分野で周知の手順を使用してCaCl₂法によって処理することができる。あるいは、MgCl₂またはRbClが使用されてもよい。細菌は、電気穿孔、コンジュゲーション、または形質導入によっても形質転換することができる。

30

【0099】

B．担体および種子の処理

1種または複数種の微生物を1つまたは複数の担体と共製剤化するための方法および、1種または複数種の微生物および1つまたは複数の担体を含む組成物が本明細書において開示される。担体は、液体または固体（乾燥）であってもよい。担体としては、液体または乾燥肥料（例えば、尿素、カリ、リン酸アンモニウム、および/または硝酸アンモニウムを含む肥料）、土壌由来物質（例えば、粘土、ピート、石炭、無機土壌）、有機物質（例えば、木炭、おがくず、コムギ/ダイズ/エンパクのふすま、堆肥、コココイヤー（coco coir））、および/または不活性材料（例えば、パーライト、バーミキュライト、ペントナイト、Azomite（登録商標）、カオリン、シリケート、軽石、タルク）が挙げられる。例示的な担体としては、Azomite（登録商標）、パーライト、バイオ炭、乾燥肥料（例えば、尿素、MOP、またはMAP）、液体肥料（例えば、UAN）、および防塵化学物質（例えば、Arrmaz、FL、USAから入手可能なもの）が挙げられる。追加の例示的な担体としては、モンモリロナイト、アタパルジャイト、含水アルミノシリケート（Agisorb Products Group, IL, USA）、赤玉土（akadama）（Eastern Leaf Inc, CA, USA）、Seramis

40

50

Clay 顆粒 (Greens hydroponics、UK)、Aquasmart (商標) Pro (Aquasmart、TX、USA)、Pyro-Gro (Green Air products、OR、USA)、砕いた溶岩、クレイペブルスが挙げられる。

【0100】

一部の実施形態では、担体との共製剤は、WO2018/045004に記載された2種の微生物のコンソーシアム(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる;本明細書においてAMC1と称される)および本明細書に記載の担体のうちの1つまたは複数を含む。他の実施形態では、担体との共製剤は、本明細書に開示される23種の微生物のコンソーシアム(例えば、表26またはATCC寄託PTA-125924に列挙された微生物)および1つまたは複数の担体を含む。共製剤はまた、1種または複数種の(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、またはそれより多くの種の)微生物および本明細書に記載の担体のうちの1つまたは複数を含む。一部の例では、共製剤は、1つもしくは複数のDPA合成酵素および/またはIsf遺伝子(複数可)を含むかまたは発現する(またはDPAを生成する)少なくとも1種の微生物および担体を含む。他の例では、共製剤は、DPA合成酵素遺伝子(複数可)を含むかもしくは発現するまたはDPAを生成する少なくとも1種の微生物およびDPA合成酵素遺伝子(複数可)を含まないし発現もしないまたはDPAを生成しない少なくとも1種の微生物を担体と共に含む。担体および1種または複数種の微生物を共製剤化する方法は、1つまたは複数の担体を1種または複数種の微生物と接触させることを含む。一部の例では、1種または複数種の微生物は、液体形態であるか(例えば、液体培地中にあるか)または固体もしくは乾燥形態である。

10

20

【0101】

1種または複数種の微生物で種子を処理する(例えば、1種または複数種の微生物を1種または複数種の種子と共製剤化する)ための方法および1種または複数種の微生物および1種または複数種の種子を含む組成物も本明細書に開示される。このような実施形態では、種子は、微生物にとっての「担体」である。一部の実施形態では、種子処理は、WO2018/045004(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されている22種の微生物のコンソーシアムおよび1種または複数種の種子を含む。他の実施形態では、種子処理は、本明細書に開示される23種の微生物のコンソーシアム(例えば、表26またはATCC寄託PTA-125924に列挙された微生物)および1種または複数種の種子を含む。他の例では、共製剤は、1つもしくは複数のDPA合成酵素および/またはIsf遺伝子(複数可)を含むかまたは発現する(またはDPAを生成する)少なくとも1種の微生物および種子を含む。他の例では、共製剤は、DPA合成酵素遺伝子(複数可)を含むかもしくは発現するまたはDPAを生成する少なくとも1種の微生物およびDPA合成酵素遺伝子(複数可)を含まないし発現もしないまたはDPAを生成しない少なくとも1種の微生物ならびに種子を含む。1種または複数種の微生物で処理することができる例示的な種子としては、以下に限定されないが、トウモロコシ種子、ヒマワリ種子、セイヨウアブラナ種子、コムギ種子、キュウリ種子、トマト種子、イネ種子、およびワタ種子が挙げられる。

30

40

【0102】

一部の例では、微生物で処理した種子は、微生物を種子に直接施用すること(例えば、種子を1種または複数種の微生物と接触させること)によって調製される。他の例では、微生物で処理した種子は、オーバーコートとしての微生物を殺虫剤および/または殺真菌剤で前もって処理した種子に施用すること(例えば、殺虫剤および/または殺真菌剤で処理した種子を1種または複数種の微生物と接触させること)によって調製される。またさらなる例では、微生物で処理した種子は、微生物を殺虫剤および/または殺真菌剤(例えば、殺虫剤/殺真菌剤スラリー)と混合することならびに混合物を種子に施用すること(例えば、種子と殺虫剤および/または殺真菌剤の混合物および1種または複数種の微生物

50

を接触させること)によって調製される。微生物と組み合わせて使用することができる例示的な殺虫剤および殺真菌剤としては、以下に限定されないが、メタラキシル、トリフロキシストロビン、イピコナゾール、クロチアニジン、チアメトキサム、フルジオキシニル、メフェノキサム、アゾキシストロビン、チアベンダゾール、ピラクロストロビン、イミダクロプリド、フルキサピロキサド、および/またはセデキササンが挙げられる。一部の例では、種子に施用された1種または複数種の微生物は液体形態であるか(例えば、液体培地中にあるか)または固体もしくは乾燥形態である。処理した種子を調製する方法としては、以下に限定されないが、Seed Treatment: Oregon Pesticide Applicator Training Manual(Paulsrud et al., Urbana, Illinois, 2001)および実施例13に記載されているものが挙げられる。

10

【0103】

IV. 使用方法

本開示の微生物組成物は、単独でまたは1つもしくは複数の液体もしくは乾燥担体との共製剤中で使用して、土壌、植物、または植物の部分(例えば、根、茎、葉、種子、または苗)を処理することができる。他の例では、本開示の微生物組成物を、処理した種子の形態で使用する事ができる。

【0104】

一部の例では、本開示の組成物および/または本開示の組成物で処理した担体もしくは種子による処理によって、植物の成長が改善され、ストレス耐性が改善され、および/または作物収量が増加する。一部の実施形態では、本方法は、土壌、植物(例えば、植物の葉、茎、根、苗、または他の植物の部分)、または種子を本明細書に開示される微生物組成物または共製剤と接触させることを含む。他の実施形態では、本方法は、本開示の組成物で処理した種子を播種することを含む。本方法は、処理した植物、植物の部分、もしくは種子を成長させることおよび/または処理した土壌中で植物、植物の部分、もしくは種子を栽培することも含み得る。

20

【0105】

一部の例では、組成物(複数可)の量は、単独でまたは1種もしくは複数種の微生物および施用される(例えば、エーカーまたはヘクタール当たり)担体もしくは種子の共製剤として算出され、組成物は、処理される面積に噴霧または灌漑する(組成物が液体である場合)のに十分な量まで水(または一部の例では、液体肥料)中で希釈される。組成物は、播種の際に、1エーカー当たり0.5~2リットル(例えば、1エーカー当たり0.5L、1エーカー当たり1L、1エーカー当たり1.5L、または1エーカー当たり2L)の比率で施用することができる。組成物はまた、成長中に1回またはそれより多い回数で、同じかまたは異なる量で、土壌(例えば、植物の根付近)または植物に施用することができる。他の例では、組成物は、希釈した除草剤、殺虫剤、農薬、または植物成長調節化学物質と混合されてもよい。施用される組成物が固体(例えば、乾燥製剤)である場合、固体は、土壌、植物、もしくは植物の部分に直接施用されてもよく、または使用前に水(または他の液体)中に懸濁もしくは溶解されてもよい。

30

【0106】

一部の例では、土壌、種子、植物、または植物の部分の本開示の組成物による処理によって、植物の成長(例えば、全体的な植物のサイズ、葉の量、根の数、根の直径、根の長さ、分げつの生成、果実の生成、花粉の生成、および/または種子の生成)を少なくとも約5%(例えば、少なくとも約10%、少なくとも約30%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約100%、少なくとも約2倍、少なくとも約3倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、またはそれより多く)が増加する。他の例では、本開示の方法は、作物の生産を、未処理の作物と比較して、約10~75%(例えば、約20~60%または約30~50%)増加させる。作物の性能についての他の尺度としては、果実の品質、収量、デンプンまたは固体の含有量、糖の含有量またはブリークス、果実または収穫可能な生産物の貯蔵寿命、販売可能な収量または標的サイズの生産、果実または生産物の品質、草の分げつおよび芝の徒歩での往来に対する耐性、受粉および実止まり、

40

50

開花、花の数、花の寿命、開花の品質、発根および根量、倒伏に対する作物の耐性、熱、干ばつ、寒さに対する非生物的ストレスへの耐性ならびにストレス後の回復、痩せた土壌への適応性、光合成および緑化のレベル、ならびに植物の健康が挙げられる。生産効率を決定するために、対照は、並行して実施される、微生物を添加しない同じ農耕法を含む。

【0107】

本開示の方法および組成物および/または共製剤をいずれかの作物と併せて使用することができる(例えば、直接的な作物処理または播種前後の土壌処理)。例示的な作物としては、以下に限定されないが、アルファルファ、アーモンド、バナナ、オオムギ、ブロッコリ、キャベツ、アサ、セイヨウアブラナ、ニンジン、柑橘類および果樹木の作物、トウモロコシ、ワタ、キュウリ、花および観賞植物、ニンニク、ブドウ、ホップ、園芸植物、リーキ、メロン、アブラヤシ、タマネギ、ピーナッツおよびマメ科植物(legume)、パイナップル、ポプラ、マツおよび台木(wood-bearing tree)、ジャガイモ、ラズベリー、イネ、ゴマ、モロコシ、ダイズ、カボチャ、イチゴ、サトウキビ、ヒマワリ、トマト、芝および牧草、スイカ、コムギ、およびユーカリが挙げられる。

【実施例】

【0108】

以下の例は、ある特定の特徴および/または実施形態を例証するために提供される。これらの例は、本開示に記載された特定の特徴または実施形態に限定するものと解釈されるべきではない。

【0109】

(実施例1)

材料および方法

微生物の単離および同定:すべての微生物は、Agrinos微生物コレクション(AMC)に由来し、本明細書に記載の4つの追加の微生物以外は、以前にWO2018/045004に記載されたものである。これらの追加の微生物を以下に記載した通りに単離した。

【0110】

細菌 *Streptomyces pratensis* および *Streptomyces venezuelae* をバルク土壌(N38° 38' 49.402"、W121° 40' 5.775")から単離した。簡潔には、土壌試料を連続希釈する前に、滅菌リン酸緩衝食塩水-TWEEN(登録商標)80溶液中に懸濁させ、いくつかの種類の半固体培地上にプレーティングした。30℃で最長3日間インキュベートした後に、*S. pratensis* および *S. venezuelae* をマニトール(HIMEDIA 番号M372)プレートを含む *Azotobacter* 寒天培地から単離した。これらの株を同質遺伝子型になるまで半固体MP培地(以下を参照されたい)上に繰り返し画線した。

【0111】

Bacillus firmus を肥料(UAN32)と1:180の比で前もって混合したHYT(登録商標)A(Agrinos AS)の試料から単離した。室温で3週間インキュベートした後、混合物のアリコートを実験のいくつかの種類の半固体培地上にプレーティングし、30℃で最長3日間インキュベートした。*B. firmus* のコロニーを *Pikovskaya* の寒天培地プレート(HIMEDIA 番号M520)から採取した。この株を同質遺伝子型になるまで半固体MP培地(以下を参照されたい)上に繰り返し画線した。

【0112】

Paenibacillus azoreducens をHYT(登録商標)A(Agrinos AS)の試料から単離した。*P. azoreducens* を1~10mMの硫酸アンモニウム寒天培地(HEPES緩衝液(pH7.5)中0.585g/LのNaCl、0.075g/LのKCl、0.147g/LのCaCl₂、0.049g/LのMgSO₄、1.32~0.132g/Lの(NH₄)₂SO₄、0.054g/LのK

10

20

30

40

50

H₂PO₄) 上で成長するコロニーとして単離した。この株を同質遺伝子型になるまで半固体MP培地(以下を参照されたい)上に繰り返し画線した。

【0113】

新たに記載した微生物の分類学上の分類: 4つの新たに記載した株のすべてについて、生物学的に純粋な分離株の全ゲノムシーケンシングを以下に記載した通り実施した。Hierarchical Genome Assembly Process (HGAP、Pacific Biosciences、Menlo Park、CA USA)により、de novoゲノムアセンブリーを実施した。

【0114】

16SリボソームRNA(rRNA)配列を使用して、最初は分類学的同定を行った。RNAmmer(cbs.dtu.dk/services/RNAmmer/)を使用して、de novoゲノムアセンブリー内で、16S rRNA配列を最初に同定した。次いで、NCBI BLASTn、Ribosomal Database Project(RDP) Naive Bayesian Classifier(Wang et al. Appl. Environ. Microbiol. 73:5261-5267, 2007)、およびGreengenesのde novo系統樹の構築およびランクマッピング(DeSantis et al. Appl. Environ. Microbiol. 72:5069-5072, 2006)によるペアワイズアラインメントを使用して、16S配列を分類した。次いで、3つの方法のコンセンサスを使用して、種を割り当てた。

10

【0115】

20

上記に基づいて、以下のように微生物を同定した:

- *Streptomyces pratensis*。16S配列を使用して、全ゲノムの分類学的分類も実施した。タンパク質コード配列をProdigal(Hyatt et al. BMC Bioinformatics, 11:119, 2010)を使用して同定した。分類には、特定のゲノムにマッチングする対応する配列のセットを見い出すために、49個の保存されたClusters of Orthologous Groups(COG)ファミリー(Tatusov et al. Science 278:631-637, 1997)のセットを利用した。次いで、選択したゲノムに由来する配列を参照アラインメント中に挿入し、最も近隣のものを抽出および濃縮し、FastTree2(近似最大尤度法; Price et al. PLoS One 5:e9490, 2010)を使用して、それらから樹を与えた。この厳密な分類方法によって、最も適切な参照種として、*Streptomyces pratensis*が選択された。*Streptomyces pratensis* ATCC 33331に対する参照ゲノムをNCBI RefSeqからダウンロードし、MUMmer(mummer.sourceforge.net/)を使用して、得られた全ゲノム配列に対してアラインした。アラインメントにより、広範囲の全体的な一致が明らかになり、2つの配列が、ゲノムワイドスケールで非常に密接に関連していることを確認した。コンセンサス16S配列が配列番号1として提供される。

30

【0116】

- *Streptomyces venezuelae*。すべての解析の結果が、この分離株を*S. venezuelae*として同定することを強く支持した。コンセンサス16S配列が配列番号2として提供される。

40

【0117】

- *Bacillus firmus*。すべての解析の結果が、この分離株を*B. firmus*として同定することを強く支持した。コンセンサス16S配列が、配列番号3として提供される。

【0118】

- *Paenibacillus azoreducens*。すべての解析の結果が、この分離株を*P. azoreducens*として同定することを強く支持した。コンセンサス16S配列が、配列番号4として提供される。

【0119】

50

微生物の代謝活性の同定：すべての潜在的な微生物代謝活性を、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、W O 2 0 1 8 / 0 4 5 0 0 4 に記載されている通りの実験室アッセイを使用して評価した。微生物が、代謝プロセスの間に硫黄含有化合物を硫化物に還元するかどうかを決定するために、bioMerieuxのAPI（登録商標）識別製品を、製造業者（bioMerieux, Inc., Durham, NC USA）の推奨に従って使用した。新たに同定した微生物をプロファイリングする重要な代謝活性の結果を表1に示す。

【0120】

【表1】

表1: 新たな微生物単離株の代謝活性

微生物	N代謝	塩耐性	ミネラル可溶性	セルロース分解性/ キチン分解性	他の植物に有益な活性	硫黄代謝	鉄代謝/ シデロフォア
<i>Streptomyces venezuelae</i>	N, D	≥2.5%		キチン+ セルロース	M + IAA		シデロフォアの生合成および輸送
<i>Streptomyces pratensis</i>	N	≥2.5%		キチン+ セルロース	M + IAA		シデロフォアの生合成および輸送
<i>Bacillus firmus</i>	N	<5%		セルロース	M + IAA		シデロフォア輸送
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	N	<2.5%	P, Ca		IAA	H ₂ S生成	シデロフォア輸送

D:脱窒、N:窒素固定、P:ホスフェート、Ca:カルシウム、IAA:インドール-3-酢酸生成、M:リンゴ酸同化、H₂S:硫化水素の生成

【0121】

細菌におけるジピコリン酸（DPA）生成の評価：目的の細菌株におけるDPA生成の評価を、基本的には、Rosen (Anal. Chem. 69:1082-1085, 1997) ; Pellegrino et al. (Anal. Chem. 70:1755-1760, 1998) ; および Ammann et al. (Int. J. Microbiol. 2011:435281, 2011) に記載されているように、テルビウム - DPA 蛍光アッセイにより実施した。簡潔には、各同質遺伝子株を好氣的または嫌氣的のいずれかで寒天培地（表2を参照されたい）上で成長させた。好気性株を30℃で最長3日間成長させ、一方、嫌気性株をPack - Anaeroの嫌気性ガス発生サシェ（三菱ガス化学株式会社、東京、日本）を有するBD Gas Pak EZコンテナシステム（Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ USA）中で、35℃にて最長3日間成長させた。DPAアッセイのために、およそ5 μLの細菌をプレート上で成長しているコロニーから採取し、10 mLの酢酸ナトリウム緩衝液（0.2 M、pH 5）中に再懸濁させた。懸濁液を121℃、15 psigで15分間オートクレーブし、室温で約30分間冷却した。次に、等体積のオートクレーブした懸濁液および30 μMのテルビウム（III）クロリド六水和物（Sigma - Aldrich, Saint Louis, MO USA）溶液を混合した。次いで、Cytation 5 Imaging Reader（BioTek, Winooski, VT USA）を使用して蛍光度を測定した（272 nmの励起、545 nmの発光）。

【0122】

10

20

30

40

50

半固体培地上でこの研究において使用される細菌の培養：マスター細胞バンクとして - 80 で保管した同質遺伝子細菌株を個々のコロニーの形成が観察されるまで寒天培地（表2）上で成長させた。簡潔には、好気性株を30 で最長3日間成長させ、一方、嫌気性株をPack-Anaeroの嫌気性ガス発生サシェ（三菱ガス化学株式会社、東京、日本）を有するBD Gas Pak EZコンテナシステム（Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ USA）中で、35 にて最長3日間成長させた。

【0123】

【表2】

表2. 微生物を培養するために使用される寒天培地

属	寒天ベースの培地 *
<i>Bacillus spp.</i>	MP, NA (amyloliquefaciens; flexus; licheniformis; subtilis), BHI (subtilis; licheniformis; flexus), RCM (firmus; sp.(pocheonensis)), YPD (megaterium; amyloliquefaciens), RhX (amyloliquefaciens)
<i>Lactobacillus spp.</i>	RCM, MP, MRS
<i>Virgibacillus spp.</i>	YPD, MP
<i>Paenibacillus spp.</i>	BHI, MP, NA (cookii, lautus), RCM (azoreducens), R2A (chibensis)
<i>Clostridium spp.</i>	RCM (pasteurianum; beijerinckii), AMAS (pasteurianum), NA (beijerinckii), MP (pasteurianum; beijerinckii), MP
<i>Oceanobacillus spp.</i>	BHI, RhX, NA, MP
<i>Acetobacter spp.</i>	RCM, YPD, MP
<i>Pseudomonas spp.</i>	MP, YPD, BHI (putida), RCM (sp. (fluorescens))
<i>Streptomyces spp.</i>	MP, BHI, NA (pratensis), YPD (griseus)
<i>Azotobacter spp.</i>	MP, AMAS, RhX

* NA:栄養寒天(BD番号213000); YPD:酵母ペプトンデキストロース(BD番号242720); BHI:脳-心臓浸出物寒天(Teknova, CA, USA); RhX: 111 Rhizobium X培地(ATCC); AMAS: azotobacter寒天培地(HIMEDIA番号M372); RCM:強化クロストリジウム培地(BD番号218081); MRS: Lactobacilli MRS (BD番号288210); R2A: R2A寒天(HIMEDIA番号SMEB962); MP:モラセス寒天培地(2%w/vのモラセス、0.15g/LのMgSO₄、0.1g/LのCaCl₂、0.12g/LのFeSO₄、1g/LのK₂SO₄、5g/Lの酵母抽出物、10g/Lのペプトン、5g/LのNaCl、0.1g/LのNaMoO₄、0.01g/LのMnCl₂、0.03g/LのKH₂PO₄、0.03g/LのNa₂HPO₄および15g/Lの寒天)

【0124】

液体培地中でこの研究において使用される個々の細菌株の培養：寒天成長株から選択したコロニーを適切な滅菌液体培地（表3）中に接種し、最長3日間インキュベートした。好気性株を30 で振盪（125～175rpm）させながら培養し、一方、嫌気性株を35 で攪拌せずに密封した血清ボトルまたはHungateチューブ中N₂ガス下で培養した。必要な場合は、等体積の個別に成長させた株を混合することによって微生物コンソシアを生産した。株毎の1mL当たりの細胞数を示す典型的な結果（以下を参照され

たい)を表4にまとめる。WO2018/045004に記載されているように、Supermix For Probes (Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA)を使用するDroplet Digital PCR (ddPCR)によって、微生物含量を決定した。

【0125】

【表3】

表3: 微生物を培養するために使用される液体培地

属	液体培地*
<i>Bacillus spp.</i>	BHI (flexus; licheniformis; sp.(pocheonensis); subtilis), YPDS (megaterium; amyloliquefaciens), NB (firmus)
<i>Lactobacillus spp.</i>	RCM
<i>Virgibacillus spp.</i>	BHIS
<i>Paenibacillus spp.</i>	BHI (chibensis; cookii; lautus), NB (azoreducens)
<i>Clostridium spp.</i>	RCM
<i>Oceanobacillus spp.</i>	BHIS
<i>Acetobacter spp.</i>	YPD
<i>Pseudomonas spp.</i>	YPDS 0.5%
<i>Streptomyces spp.</i>	YEME
<i>Azotobacter spp.</i>	MP

* YPD:酵母ペプトンデキストロース(BD番号242720); YPDS: 0.5g/LのNaClを補充した酵母ペプトンデキストロース(BD番号242720); BHI:脳心臓浸出物(Teknova、CA、USA); RCM:強化クロストリジウム培地(BD番号218081); BHIS: 45g/LのNaClを補充した脳心臓浸出物(Teknova、CA、USA); RCM:強化クロストリジウム培地 (BD番号218081); MP:モラセス培地(2%w/vのモラセス、0.15g/LのMgSO₄、0.1g/LのCaCl₂、0.12g/LのFeSO₄、1g/LのK₂SO₄、5g/Lの酵母抽出物、10g/Lのペプトン、5g/LのNaCl、0.1g/LのNaMoO₄、0.01g/LのMnCl₂、0.03g/LのKH₂PO₄および0.03g/LのNa₂HPO₄); YEME:酵母抽出物-麦芽抽出物培地(3g/Lの酵母抽出物、5g/Lのバクトペプトン; 3g/Lの麦芽抽出物; 10g/Lのグルコース; 340g/Lのショ糖 5mMのMgCl₂); NB:栄養ブロス(BD番号234000)

【0126】

【表 4】

表4: 個々に培養した株を混合することによる最終液体製剤1mL
当たりの細菌細胞の典型的な数。

微生物	最終液体製剤(個々の混合物) 1mL当たりの細菌細胞数
<i>Bacillus megaterium</i>	2.53E+07
<i>Lactobacillus paracasei/casei</i>	7.66E+07
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1.97E+07
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	4.58E+07
<i>Lactobacillus buchneri</i>	1.77E+07
<i>Bacillus subtilis</i>	5.26E+07
<i>Paenibacillus cookii</i>	9.14E+07
<i>Lactobacillus vini</i>	9.06E+07
<i>Bacillus licheniformis</i>	5.00E+08
<i>Paenibacillus lautus</i>	5.16E+07
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	2.12E+07
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	8.30E+07
<i>Bacillus sp.</i>	1.26E+08
<i>Pseudomonas putida</i>	1.02E+08
<i>Pseudomonas sp.</i>	1.96E+08
<i>Streptomyces griseus</i>	3.76E+07
<i>Paenibacillus chibensis</i>	9.34E+07
<i>Bacillus flexus</i>	5.88E+07
<i>Clostridium pasteurianum</i>	3.29E+07
<i>Azotobacter vinelandii</i>	6.02E+07
<i>Virgibacillus halophilus</i>	1.95E+07
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	3.36E+07

10

20

30

【0127】

発酵によって共培養した微生物コンソーシアの生成：好気性および／または嫌気性細菌の両方を、ホスフェート、ナトリウム、カリウムおよび塩化物（市販のリン酸緩衝食塩水の形態で）などの必須元素ならびに食品グレードのホエイ粉末（0.1% w/v）および酵素によって生成した非GMOダイズ抽出物（0.25% w/v；Ferti-Nitro Plus Plant N；Ferti-Organic、Brownsville、TX USA）の形態のアミノ酸、窒素およびペプチド/タンパク質を補充した2%のモラセスを含有する培地中で培養した。塩化ナトリウムの濃度は、0~4% w/vの範囲であった。上記表4からの株（本明細書においてAMC1と称される）を、各株に対するOD₆₀₀が6.67E-05から6.67E-04の間の範囲である最終接種量で、1.5リットルの作業容積を有する2LのDASGIPバイオリアクター（Eppendorf North America Hauppauge、NY）中に接種した。水酸化

40

50

アンモニウムおよびリン酸をそれぞれ塩基および酸溶液として使用し、pHをpH5.5から6.9の間に維持した。温度は、28から35の間に制御した。嫌氣的発酵をN₂ガスで継続的にスパージして、嫌氣的環境を維持し、一方、スパージした空気を発酵期間中（典型的には最長3日間）微生物に対する酸素供給源として好氣的発酵において使用した。一部の実験では、発酵後に、様々な株を含有するバッチをプールして、1つの完全な22種の株の細菌混合物を生成した。株毎の1mL当たりの細胞数を示す典型的な結果（以下を参照されたい）を表5にまとめる。発酵液における微生物含量をWO2018/045004に記載されているように（as described describes）、Supermix For Probes（Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA）を使用するDroplet Digital PCR（ddPCR）によって決定した。

10

【0128】

【表5】

表5. 共培養による最終液体製剤1mL当たりの細菌細胞の典型的な数

微生物	最終液体製剤(共培養) 1mL当たりの細菌細胞数
<i>Bacillus megaterium</i>	1.40E+04
<i>Lactobacillus paracasei/casei</i>	9.60E+05
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1.60E+07
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	1.20E+07
<i>Lactobacillus buchneri</i>	1.00E+05
<i>Bacillus subtilis</i>	1.30E+06
<i>Paenibacillus cookii</i>	6.60E+03
<i>Lactobacillus vini</i>	8.20E+04
<i>Bacillus licheniformis</i>	9.30E+05
<i>Paenibacillus lautus</i>	2.00E+09
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	2.00E+09
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	6.00E+05
<i>Bacillus sp.</i>	3.20E+05
<i>Pseudomonas putida</i>	2.30E+07
<i>Pseudomonas sp.</i>	1.20E+07
<i>Streptomyces griseus</i>	7.50E+06
<i>Paenibacillus chibensis</i>	5.80E+03
<i>Bacillus flexus</i>	6.00E+06
<i>Clostridium pasteurianum</i>	4.80E+06
<i>Azotobacter vinelandii</i>	1.30E+07
<i>Virgibacillus halophilus</i>	6.10E+06
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	2.00E+06

20

30

40

【0129】

50

凍結乾燥した微生物コンソーシアムの生成：一部の実験では、生成した微生物コンソーシアムを農業担体との共製剤における実験の前に凍結乾燥した。等体積の個々に培養した細菌をプールするかまたは共培養した発酵液を使用するかのいずれかによって、コンソーシアを生成した（上記）。凍結乾燥は、基本的には、WO 2018/045004に記載されているように実施した。簡潔には、製造業者の推奨の通りに、液体微生物コンソーシアをマンニトール/凍結防止剤溶液（OPS Diagnostics Lebanon、NJ、USA）と混合し、微生物懸濁液を凍結乾燥バイアル（OPS Diagnostics、Lebanon、NJ、USA）中にアリコートすることによって、凍結乾燥した微生物製剤を生成した。-80 で60分後に、混合物をFree Zone 6凍結乾燥システム（Labconco、Kansas City、MO）中に配置し、真空にして、試料中の水分を昇華させた。必要になるまで、試料を4 で保管した。一部の実験では、最終濃度を0.75 g/LのTryptic Soy Broth（Becton, Dickinson and Company、USA）、10 g/Lのショ糖（Sigma Aldrich、USA）および5 g/Lのスkimミルク（Carnation、Nestle S.A、CH）とするために、上記の化学物質を微生物培養液に添加することによって、凍結保護溶液を調製した。

【0130】

農業担体との微生物の共製剤：上記のように生成した液体微生物コンソーシア（共培養または個々に成長させてから生成し、次いで、プールした）または個々の細菌株をパーライト、Azomite（登録商標）（Azomite、UT、USA）、軽石、第一リン酸アンモニウム肥料（MAP；Mosaic、MN、USA）、塩化カリウム肥料（Muriate of potash fertilizer）（MOP；Mosaic、MN、USA）、およびパイオ炭（Cool Terra（登録商標）；Cool Planet Energy system、CO、USA）などの農業担体上に含浸させた。担体の水分保持の特性に応じて、様々な体積の微生物コンソーシアを使用して、1グラム当たり35 μL程度から最大1グラム当たり6 mLで担体を飽和させた。次いで、さらなる貯蔵寿命についての微生物の生存可能性研究および植物アッセイのために、気密容器中に保管する前に、微生物/農業担体混合物を30 ~ 35 で一晚乾燥させた。

【0131】

水中の尿素および硝酸アンモニウム（UAN₃₂；TGI、CA、USA）などの液体農薬または肥料防塵剤（DUSTROL；Arrmaz FL、USA）との共製剤の場合には、保管および微生物生存可能性解析（microbial survivability analysis）の前に、上記において詳述したように生成した液体微生物コンソーシアを様々な比（以下の実施例において記載した）で混合した。すべての作業は、夾雑を最小限にするために衛生条件下で実施した。

【0132】

一部の場合には、担体の化学的性質への培養プロセスの影響を最小限にするために、凍結乾燥した細菌コンソーシアを使用した。詳細は、適宜実施例において記載する。

【0133】

DPA合成酵素生成に関する細菌ゲノムの分析

微生物ゲノムDNA抽出：様々な種の細菌細胞を成長させ、最適化した液体プロセスおよび培養条件から回収した。Power Soil DNA単離キット（MO BIO Laboratories, Inc、Carlsbad、CA USA）を小規模ゲノムDNA抽出のために使用した。大規模ゲノムDNA抽出のために、GenElute Bacterial Genomic DNAキット（Sigma-Aldrich、St. Louis、MO USA）またはQiagen Genomic DNA Buffer SetおよびGenomic-tip 500/G（Qiagen、Hilden、Germany）を製造業者に推奨される方法に従って使用した。次に、得られるゲノムDNAを等体積のイソプロパノールで沈殿させ、70%のエタノールで洗浄し、空気乾燥させ、TE緩衝液中に再懸濁させた。

【0134】

全ゲノムシーケンシング (WGS) : 生物学的に純粋な分離株の全ゲノムシーケンシングを、シーケンスライブラリー調製およびシーケンシングのために製造業者の推奨する方法に従って、PacBio RSIIシステム (Pacific Biosciences、Menlo Park、CA USA) を使用して実施した。微生物分離株から、平均して24 kb長の平均73,000個のリードを作成し、続いて、Hierarchical Genome Assembly Process (HGAP、Pacific Biosciences、Menlo Park、CA USA) によるde novoゲノムアセンブリーを作成した。

【0135】

選択した細菌株におけるDPA合成酵素コード配列の同定：初期のバイオインフォマティクス解析には、綱Bacilliの選択したメンバーを含んだ；Bacillus (Bacillus megaterium、Bacillus subtilis、Bacillus licheniformis、Bacillus amyloliquefaciens、Bacillus sp.、およびBacillus flexus)、およびLactobacillus (Lactobacillus delbrueckii)。第1に、以前に獲得した全ゲノム配列を使用して、BPGA-Version-1.3 (iicb.res.in/bpga/index.html) を使用して細菌汎ゲノム解析を実施し、ゲノムの多様性を評価し、コア (保存)、アクセサリー (必ずしも必要でない)、およびユニーク (株特異的) 遺伝子プールを決定した。次いで、アクセサリー遺伝子セットにおいて、任意のジピコリン酸合成酵素サブユニットA (DpaA) に対して検索を実施した。これに続いて、カスタムBashスクリプト (Free Software Foundation、2007) を使用する、DpaAおよびDpaBに関する表1の株についての全検索を実施した。

【0136】

簡潔には、タンパク質コード遺伝子を2段階でアノテートした。Prodigal (PROkaryotic DYNAMIC programming Gene-finding ALgorithm (Hyatt et al., BMC Bioinformatics 11:119, 2010)) を使用して、候補遺伝子の座標を特定したが、推定遺伝子産物については記載されていない。次いで、これらの候補遺伝子を、より小さい信頼できるデータベースから出発し、中間サイズであるがドメイン特異的なデータベース、および最終的にタンパク質ファミリーの精選モデルに移行する階層的な方法で大規模データベースと比較した。デフォルトによって、 10^{-6} のe値の閾値を以下の一連のデータベースで使用した：

【0137】

1. 実際のタンパク質または転写物のエビデンスを有し、断片ではないUniProtにおけるすべての細菌タンパク質。BLAST+を検索に使用する。

【0138】

2. 特定の属についてRefSeqで解読した細菌ゲノムからのすべてのタンパク質。BLAST+を検索に使用する。

【0139】

3. Pfam (Punta et al., 2012) およびTIGRFAMs (Haft et al., 2013) を含む一連の隠れマルコフモデルプロファイルデータベース。これは、HMMER 3.1パッケージ (Eddy, 2011) からのhmmscanを使用して実施する。

【0140】

4. 一致 (match) を見い出すことができない場合、「仮想タンパク質」と表示する。

【0141】

次いで、これらのデータを、DPA合成酵素と生存能との間の相関を確立するために、孢子形成能力および乾燥剤の生存可能性と共に作表した (表6を参照されたい)。次いで、DpaAおよびDpaB遺伝子のアラインメントをClustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) およびアミノ酸

10

20

30

40

50

組成および S e a v i e w 4 (Gouy et al. Mol. Biol. Evol. 27:221-224, 2010) を使用して計算した頻度統計を使用して実施した。次いで、D p a A および D p a B アミノ酸アラインメントを使用して、パッケージ B i o s t r i n g s a n d s e q i n r (Pages et al., 2016; Charif and Lobry, Structural Approaches to Sequence Evolution, pp. 207-232, 2007; R Core Team, 2016) を使用して、コンセンサス配列および R の確率マトリックスを計算した。

【 0 1 4 2 】

【表 6】

表6. 孢子形成しDPAを生成することが可能な株のまとめ

細菌株	孢子形成能	DPA合成酵素 遺伝子の存在	DPA 生成
<i>A. pasteurianus</i>	N	NF	ND
<i>A. vinelandii</i>	Y	NF	ND
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Y	Y	Y
<i>B. flexus</i>	Y	Y	Y
<i>B. licheniformis</i>	Y	Y	Y
<i>B. megaterium</i>	Y	Y	Y
<i>B. subtilis</i>	Y	Y	Y
<i>Bacillus sp.</i>	Y	Y	Y
<i>C. beijerinckii</i>	Y	NF	Y
<i>C. pasteurianum</i>	Y	NF	ND
<i>L. buchneri</i>	N	NF	ND
<i>L. casei/paracasei</i>	N	NF	ND
<i>L. delbrueckii</i>	N	NF	ND
<i>L. vini</i>	N	NF	ND
<i>O. oncorhynchi</i>	Y	Y	ND
<i>P. chibensis</i>	Y	Y	Y
<i>P. cookii</i>	Y	Y	Y
<i>P. lautus</i>	Y	Y	Y
<i>P. putida</i>	N	NF	ND
<i>Pseudomonas sp.</i>	N	NF	ND
<i>S. griseus</i>	Y	NF	ND
<i>V. halophilus</i>	Y	Y	ND
<i>S. venezuelae</i>	Y	NF	ND
<i>S. pratensis</i>	Y	NF	ND
<i>P. azoreducens</i>	Y	Y	Y
<i>B. firmus</i>	Y	Y	Y

Y:有; N:無; NF:見られず; ND:検出されず

10

20

30

40

50

【0143】

コンソーシア生存可能性アッセイにおける細菌

液体共製剤試料の調製：各貯蔵寿命時点について、1 mLの共製剤（農薬／細菌コンソーシアム）を滅菌ペプトン水中で 10^{-1} から 10^{-5} に連続希釈した。

【0144】

乾燥製剤試料の調製：各貯蔵寿命の時点では、0.03～1 gの乾燥製剤（農業担体／細菌コンソーシアム）を最大3 mLのペプトン水などの培養ブロスまたは他の適切な培地中に懸濁させ、室温で最長1時間インキュベートした。一部の場合には、穏やかな超音波処理（35 kHz）を使用し、水浴超音波処理機（VWR超音波洗浄機）を使用して乾燥マトリックスから細菌を放出させた。次に、懸濁液を滅菌ペプトン水または他の種類の培養ブロス中で 10^{-1} から 10^{-5} に連続希釈した。他の事例では、乾燥材料を成長のための液体培地に直接添加した。

10

【0145】

生存可能性アッセイ：処理（複数可）を受ける細菌株に増殖する機会を与えた。コンソーシアムにおける各株の成長潜在性を最大にするために、chA（半乾燥キチン、5 g/L； K_2HPO_4 、0.7 g/L； KH_2PO_4 、0.3 g/L； $MgSO_4 \cdot 5H_2O$ 、0.5 g/L； $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.01 g/L； $ZnSO_4$ 、0.001 g/L； $MnCl_2$ 、0.001 g/Lおよび寒天、15 g/L）、RCM、NA、MP、YPD、RhX、AMAS、および／またはBHISなどのいくつかの異なる寒天培地を使用した。一部の例では、上記で生成した各連続希釈液を、二連で、1つまたは複数の寒天培地上にプレーティングして広げた。他の事例では、上記で生成した乾燥材料を、六連で、1つまたは複数の液体培地中に懸濁させた。プレート培養では、プレートを静止インキュベーター中でインキュベートし、一方を30 で好気条件に、他方を35 で嫌気条件に3日間設定した。液体培養では、チューブを30 で好氣的に振盪しながら、または35 で嫌氣的に静的に7日間インキュベートした。その処理（複数可）を受けて生き延びた細菌は、コロニーを形成するかまたは液体培地中で増殖することによって成長し、次いで、この成長についてサンプリングし、ドロップレットデジタルPCR（ddPCR）を使用して同定した。

20

【0146】

DNeasy PowerLyzer PowerSoilキット（Qiagen, Inc., Germantown, MD USA）を製造業者の推奨に従って使用して、回収した細胞からゲノムDNAを抽出した。次いで、Quantas FluorometerおよびQuantifluor dsDNA（Promega Corporation, Madison, WI USA）を使用して、DNAを定量し、株に特異的なプローブをddPCRと併せて使用して、同定および定量のために処理した（Dreo et al., Anal. Bioanal. Chem. 406:6513-6528, 2014；Yin, et al., Journal of Microbiological Methods 65:21-31, 2006）。簡潔には、DNA試料、プライマー、およびプローブ（16S遺伝子からの特有の配列および／または参照により本明細書に組み込まれる、WO2018/045004において以前に記載されたように、WGSゲノムアセンブリから同定した特有のコード遺伝子配列を使用して設計した）を、製造業者の推奨に従ってBio-Rad's ddPCR Supermix for Probesと組み合わせて、ddPCR反応物を調製した。次いで、製造業者の推奨に従って、QX200（商標）ドロップレットジェネレーターまたはAutoDG（商標）Instrumentのいずれかを使用して、ドロップレットを作成した。Bio-Rad's ddPCR Supermix for Probesから推奨される温度サイクル条件を使用するEppendorf Mastercycler（登録商標）nexus勾配を使用して、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行った。PCRプロトコルの後に、QX200ドロップレットリーダーを使用して反応物を読み出した。最後に、濃縮物をQuantaSoft（商標）ソフトウェアにより解析した。

30

40

【0147】

50

液体または乾燥農業担体との共製剤化の後に、単一株の生存可能性を特定する事例では、表 2 に記載した所与の株に最も適合する寒天培地を使用して、単回のプレーティングを実施した。

【 0 1 4 8 】

(実施例 2)

選択した細菌株における D P A 合成酵素コード配列の同定

ジピコリン酸合成酵素サブユニット A (D p a A) : 細菌株からの D p a A のアミノ酸アラインメントによって、保存されたアミノ酸は 2 8 . 4 % に過ぎず、アミノ酸アラインメントが多様であることが明らかになった。結果を表 7 ~ 9 および図 1 にまとめる。O c e a n o b a c i l l u s o n c o r h y n c h i は、ほとんどの他の株よりも多様であることが明らかになった。アラインされた位置として定義された分母を用いてパーセント同一性を計算することによって、O . o n c o r h y n c h i は、B L O S U M 6 2 を使用して、コンセンサス配列との 5 8 % のパーセント同一性を有した。さらに、これらのアミノ酸変化は、解析された株のほとんどについて保存された領域にあるようであった。D p a A のアミノ酸アラインメントによって、V i r g i b a c i l l u s h a l o p h i l u s が、遺伝子の 2 つのコピー (遺伝子の複製による可能性が高い) を有することも明らかになった。第 1 のコピーは高度に多様であり (コンセンサス配列との 5 1 % の同一性、上記と同じ方法) 、第 2 のコピーは、著しいアミノ酸変化に加えて、2 9 個のアミノ酸で切断されたようであった。さらに、D p a A のすべての他の例は、オペロンの一部として D p a B に連続して位置したが、V . h a l o p h i l u s では 2 つの遺伝子は、5 3 9 個の他の遺伝子によって分離されている。

【 0 1 4 9 】

【 表 7 】

表 7. DpaA 遺伝子コピーの数

DPA 遺伝子を有する株	DpaA 遺伝子 コピーの数
<i>Bacillus megaterium</i>	1
<i>Bacillus subtilis</i>	1
<i>Paenibacillus cookii</i>	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1
<i>Paenibacillus lautus</i>	1
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1
<i>Bacillus sp.</i>	1
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1
<i>Bacillus flexus</i>	1
<i>Bacillus firmus</i>	1
<i>Virgibacillus halophilus</i>	2
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1

【 0 1 5 0 】

【表 8】

表8. DpaA遺伝子の配列多様性

選択された部位:	303	100.0%
完全(ギャップなし、Xなし):	262	86.5%
可変:	208	68.6%
情報提示:	176	58.1%
ギャップまたはX:	41	13.5%
同一:	54	17.8%
保存、非同一:	32	10.6%
保存全体:	86	28.4%

10

【 0 1 5 1 】

【表 9】

表9. DpaA遺伝子のアミノ酸組成

アミノ酸組成(全部位)	
群 1:	30.50%
E:	5.7
D:	6
Q:	3.4
N:	3.1
H:	2.3
R:	4.3
K:	5.6
群 2:	29.90%
I:	9.3
L:	10.2
M:	2.8
V:	7.6
群 3:	33.50%
A:	9
P:	3.7
S:	5.8
G:	8.3
T:	6.7
群 4:	4.90%
F:	3.2
Y:	1.6
群 5:	1.30%
W:	0.1
C:	1.2

10

20

30

40

【0152】

ジピコリン酸合成酵素サブユニットB (DpaB) : 細菌株からのDpaBのアミノ酸アラインメントによって、保存されたアミノ酸は45.5%であり、アミノ酸アラインメントがDpaAより保存されている (more conserved than DpaA) ことが明らかになった。結果を表10～12および図2にまとめる。複製も主要な切断も検出されなかった。上述したように、DpaBのすべてのコピーは、DpaBがDpaAから539遺伝子上流にあるV. halophilusを除き、オペロンの一部としてDpaAと連続して位置した。

【0153】

【表 1 0】

表10. DpaB遺伝子コピーの数

DPA遺伝子を有する株	DpaB遺伝子 コピーの数
<i>Bacillus megaterium</i>	1
<i>Bacillus subtilis</i>	1
<i>Paenibacillus cookii</i>	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1
<i>Paenibacillus lautus</i>	1
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1
<i>Bacillus sp.</i>	1
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1
<i>Bacillus flexus</i>	1
<i>Bacillus firmus</i>	1
<i>Virgibacillus halophilus</i>	1
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1

10

20

【0 1 5 4】

【表 1 1】

表11. DpaBの配列多様性

選択された部位:	202	100.0%
完全(ギャップなし、Xなし):	196	97.0%
可変:	133	65.8%
情報提示:	104	51.5%
ギャップまたはX:	6	3.0%
同一:	63	31.2%
保存、非同一:	29	14.4%
保存全体:	92	45.5%

30

40

【0 1 5 5】

【表 1 2】

表12. DpaB遺伝子のアミノ酸組成

アミノ酸組成 (全部位)	
群 1:	30.30%
E:	4.8
D:	4.7
Q:	3.8
N:	6.2
H:	1.4
R:	3.2
K:	6.3
群 2:	29.00%
I:	6.5
L:	9.8
M:	4.3
V:	8.4
群 3:	34.30%
A:	8.3
P:	6.6
S:	5.2
G:	7
T:	7.1
群 4:	4.70%
F:	3
Y:	1.7
群 5:	1.70%
W:	0.6
C:	1.1

10

20

30

40

【0 1 5 6】

DPAの生成(上記アッセイにおける)とDPA遺伝子の存在との間の相関:表6に記載されているように、テルビウム-DPA蛍光アッセイによってDPA生成株として*Clostridium beijerinckii*を検出したが、DpaAとDpaBはいずれもそのゲノムにおいて識別可能ではなかった。本発明者らは、*C. beijerinckii*が、先にDPA生成に関係するEtfAと構造的に関連する鉄-硫黄フラビンタンパク質(IsoF)を有することを見い出した(Orsburn et al., Mol. Microbiol. 75:178-186, 2010)。鉄-硫黄フラビンタンパク質の6つのコピーを*C. beijerinckii*のゲノム内で検出した。次いで、これらの配列を、4つの異なる細菌:*Archaeoglobus fulgidus*、*Methanocaldococcus*

50

jannaschii、Methanosarcina thermophila、およびPeptoclostridium difficileからのIsf配列と共にアラインした(図3)。このIsfタンパク質は、Clostridium pasteurianumには存在せず、DPAの生成は、C.pasteurianumにおいて検出されなかった。DPA生成におけるIsfの役割に関するさらなる支持は、実施例12に提供される。

【0157】

(実施例3)

担体上の選択された単一株の生存

個々の株を含浸させたAzomite(登録商標)における細菌の生存可能性の評価を実施した。4つの株は、labアッセイにおけるおよび/またはDPA遺伝子同定の結果に関するそれらのDPAを生成する能力に基づいて選択した。細菌の生存可能性を評価する前に、含浸された材料を乾燥して5日間保管した。結果は、表13に示した通りである。DPA生成が検出できる株の100%(2/2)が、5日間生存可能なままであった。DPA生成が検出不能である株については、50%(1/2の株)が、5日間生存可能なままであった。

10

【0158】

【表13】

表13. DPA生成に対する乾燥Azomite(登録商標)との共製剤化における個々の細菌の生存

20

微生物	DPA 生成	5日間の 生存能力
<i>Streptomyces venezuelae</i>	0	1
<i>Streptomyces pratensis</i>	0	0
<i>Bacillus firmus</i>	1	1
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1	1

1=検出されたおよび0=検出されずまたは検出限界未満。DPA生成の列は、テルビウム-DPA蛍光アッセイによってDPA生成が陽性であるかを試験した株を表す。

30

【0159】

第2の実験では、株の数を拡大した。含浸後のAzomite(登録商標)における細菌の生存可能性の評価を1カ月の期間にわたって実施した。簡潔には、Azomite(登録商標)に個々の同質遺伝子株を含浸させ、乾燥させ、細菌の生存能解析のために試料を3、7、14、21、および28日目に採取した。結果は、表14に示した通りであり、DPA遺伝子が同定され、DPAを生成する細菌の100%(4/4)が1カ月間生存可能なままであったことを示す。DPA遺伝子が同定されず、DPA生成が検出不能である株については、40%(2/5の株)が1カ月間生存可能なままであった。

【0160】

40

【表 1 4】

表14. DPA遺伝子の同定およびDPA生成に対する乾燥
Azomite(登録商標)との共製剤化における個々の細菌の生存

微生物	DPA 遺伝子	DPA 生成	3 日間	7 日間	14 日間	21 日間	28 日間
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>Paenibacillus putida</i>	0	0	1	0	0	0	0
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	1	1	1	1	1
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	1	1	1	1	1
<i>Streptomyces venezuelae</i>	0	0	1	0	0	0	0
<i>Streptomyces pratensis</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus firmus</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1	1	1	1	1	1	1

1=検出されたおよび0=検出されずまたは検出限界未満。DPA遺伝子の列は、DpaAおよびDpaB遺伝子の両方を有する株を表す。DPA生成の列は、テルビウム-DPA蛍光アッセイによってDPA生成が陽性であるかを試験した株を表す。

【0 1 6 1】

次いで、第2の農業担体（パーライト）を試験した。Azomite（登録商標）に関して以前に記載したように、微生物の生存可能性評価を1カ月間にわたって実施した。結果は、表15に示した通りであり、同定したDPA遺伝子を有し、DPAを生成する細菌の100%（4/4）は1カ月間生存可能なままであったことを示す。検出されるDPA遺伝子を有さず、DPA生成が検出不能である株については、60%（3/5の株）が1カ月間生存可能なままであった。

【0 1 6 2】

10

20

30

【表 15】

表15. DPA遺伝子の同定およびDPA生成に対する乾燥
パーライトとの共製剤化における個々の細菌の生存

微生物	DPA 遺伝子	DPA 生成	3 日間	7 日間	14 日間	21 日間	28 日間
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>Paenibacillus putida</i>	0	0	1	1	1	1	0
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	1	1	1	1	0
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	1	1	1	1	0
<i>Streptomyces venezuelae</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptomyces pratensis</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus firmus</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1	1	1	1	1	1	1

1=検出されたおよび0=検出されずまたは検出限界未満。DPA遺伝子の列は、DpaAおよびDpaB遺伝子の両方を有する株を表す。DPA生成の列は、テルビウム-DPA蛍光アッセイによってDPA生成が陽性であるかを試験した株を表す。

【0163】

(実施例4)

担体上の微生物コンソーシアの生存

以下の実験では、22種の細菌を個々に成長させ、次に、混合して、上記のようにコンソーシアムを生成した。ペレット化形態の乾燥Azomite（登録商標）に0.23~0.4mLのコンソーシアムを含浸させ（ペレットの完全性を保存するため）、乾燥させ、2週間保管した後、コンソーシアムからの微生物の生存能をアッセイするためのアッセイを使用して、どの細菌が生存したかを解析した（実施例1）。2回の独立した試験を行い、結果を表16にまとめる。本発明者らは、DPA遺伝子が同定されかつ/またはDPAを生成する細菌株の83%および92%が、Azomite（登録商標）に関する含浸の2週間後に生存可能なままであったことを観察した。2つの試験で一致した生存能を示していないようであった株は、*O. oncorhynchi*であった。上述したように、*O. oncorhynchi*のDPA合成酵素サブユニットAは、BLOSUM62を使用して、コンセンサス配列との58%のパーセント同一性を有し、ほとんどの他の調査した株より多様であるようである。DPA遺伝子が同定されず、DPA生成が検出できない株については、結果では、同じ期間内に生存可能なままである細菌が60%から70%の間で変動した。2つの試験の間での再現性は低く、含浸の時点でこのセットの微生物の様々な代謝状態に起因し得る。

【0164】

【表 1 6 - 1】

表16. 乾燥Azomite(登録商標)との共製剤化における個々の細菌の生存

細菌の属/種	DPA 遺伝子	DPA 生成	試験 1	試験 2	
			2 週間	2 週間	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1	1	DPA遺伝子が同定されかつ/またはDPAを生成する細菌
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	1	1	
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1	1	
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1	1	
<i>Bacillus sp.</i>	1	1	1	1	
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	1	
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	1	1	
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	1	1	
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1	0	1	0	
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	0	1	1	
<i>Virgibacillus halophilus</i>	1	0	0	0	
<i>Clostridium beijerinckii</i>	0	1	1	1	

【表 1 6 - 2】

<i>Acetobacter pasteurianus</i>	0	0	0	1	DPA遺伝子が同定されておらずかつ検出可能なDPA生成がない細菌
<i>Azotobacter vinelandii</i>	0	0	1	1	
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0	0	1	1	
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0	0	1	1	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	0	0	0	
<i>Lactobacillus paracasei/casei</i>	0	0	1	0	
<i>Lactobacillus vini</i>	0	0	0	0	
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	1	0	
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	1	1	
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	1	1	

1=検出されたおよび0=検出されずまたは検出限界未満。DPA遺伝子の列は、DpaAおよびDpaB遺伝子の両方を有する株を表す。DPA生成の列は、テルビウム-DPA蛍光アッセイによってDPA生成が陽性であるかを試験する株を表す。

【 0 1 6 5】

上記 Azomite (登録商標) に関する実験と同様に、22種の細菌を個々に成長させ、次に、混合してコンソーシアムを生成した。パーライトに2～6mLのコンソーシア

ムを含浸させ、乾燥させ、2週間保管した後、コンソーシアムからの微生物の生存能をアッセイするためのアッセイを使用して、どの細菌が生存したかを解析した（実施例1）。2回の独立した試験を行い、結果を表17にまとめる。本発明者らは、DPA遺伝子が同定されかつ/またはDPAを生成する細菌株の58%および100%が、パーライトに関する含浸の2週間後に生存可能なままであったことを観察した。DPA遺伝子が同定されず、DPA生成が検出できない株については、結果では、同じ期間内に生存可能なままである細菌が60%から80%の間で変動した。Azomite（登録商標）実験と比較して、DPA遺伝子が同定されかつ/またはDPAを生成する細菌は、異なる含浸基質を使用した場合でさえ、良好な再現性を示した。これらは、また本発明者らのアッセイにおいて、DPA遺伝子が同定されないかまたはDPA生成が検出できないものよりも性能が優れていた。

10

【0166】

【表 17】

表17. パーライトとの共製剤化におけるコンソーシアム由来の個々の細菌の生存

細菌の属/種	DPA 遺伝子	DPA 生成	試験 1	試験 2	
			2週間	2週間	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1	1	DPA遺伝子が 同定されかつ/ またはDPAを 生成する細菌
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	0	1	
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1	1	
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1	1	
<i>Bacillus sp.</i>	1	1	1	1	
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	1	
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	1	1	
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	1	1	
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1	0	0	1	
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	0	1	1	
<i>Virgibacillus halophilus</i>	1	0	0	1	
<i>Clostridium beijerinckii</i>	0	1	1	1	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	0	0	1	0	DPA遺伝子が 同定されてお らずかつ検出 可能なDPA生 成がない細菌
<i>Azotobacter vinelandii</i>	0	0	0	0	
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0	0	1	1	
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0	0	1	1	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	0	0	0	
<i>Lactobacillus paracasei/casei</i>	0	0	1	1	
<i>Lactobacillus vini</i>	0	0	1	0	
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	1	1	
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	1	1	
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	1	1	

1=検出されたおよび0=検出されずまたは検出限界未満。DPA遺伝子の列は、DpaAおよびDpaB遺伝子の両方を有する株を表す。DPA生成の列は、テルビウム-DPA蛍光アッセイによってDPA生成が陽性であるかを試験する株を表す。

【0167】

(実施例4)

液体防塵剤と共製剤化した微生物コンソーシアの生存：以下の実験では、目的の細菌株

10

20

30

40

50

を上記の培地を使用する半固体寒天プレート上で成長させた（表2を参照されたい）。防塵化学物質／細菌共製剤は、寒天プレートから削り取った1μLのループフル（loop full）を200μLの滅菌ペプトン水中に懸濁させ、次いで、5%v/vの比率で防塵化学物質と混合することによって作製した。次いで、共製剤における各株の生存可能性を、細菌／農薬混合物を新鮮な培地（表3）に接種し、成長の徴候をスコア化することによって決定した。

【0168】

MDC-200と共製剤化した細菌の生存可能性：防塵剤MDC-200（Arrmaz、FL、USA）との共製剤化後の細菌の生存能の評価を1カ月の期間にわたって実施した。結果は、表18に示した通りである。本発明者らは、DPA遺伝子が同定されかつ／またはDPAを生成する細菌の92%（11/12）が1カ月間生存可能なままであったことを観察した。DPA遺伝子が同定されず、DPA生成が検出不能である株については、0%（0/10の株）が1カ月間生存可能なままであった。

10

【0169】

DUSTROL（登録商標）3275と共製剤化した細菌の生存可能性：DUSTROL（登録商標）3275（Arrmaz、FL、USA）との共製剤化後の細菌の生存能の評価を1カ月間の期間にわたって実施した。結果は、表18に示した通りである。本発明者らは、DPA遺伝子が同定されかつ／またはDPAを生成する細菌の100%（12/12）が1カ月間生存可能なままであったことを観察した。DPA遺伝子が同定されず、DPA生成が検出不能である株については、0%（0/10の株）が1カ月間生存可能なままであった。

20

【0170】

DUSTROL（登録商標）3133と共製剤化した細菌の生存可能性：DUSTROL（登録商標）3133（Arrmaz、FL、USA）との共製剤化後の細菌の生存能の評価を1カ月間の期間にわたって実施した。結果は、表18に示した通りである。本発明者らは、DPA遺伝子が同定されかつ／またはDPAを生成する細菌の100%（12/12）が1カ月間生存可能なままであったことを観察した。DPA遺伝子が同定されず、DPA生成が検出不能である株については、0%（0/10の株）が1カ月間生存可能なままであった。

30

【0171】

DUSTROL（登録商標）3139と共製剤化した細菌の生存可能性：DUSTROL（登録商標）3139（Arrmaz、FL、USA）との共製剤化後の細菌の生存能の評価を1カ月間の期間にわたって実施した。結果は、表18に示した通りである。本発明者らは、DPA遺伝子が同定されかつ／またはDPAを生成する細菌の92%（11/12）が1カ月間生存可能なままであったことを観察した。DPA遺伝子が同定されず、DPA生成が検出不能である株については、0%（0/10の株）が1カ月間生存可能なままであった。

40

【0172】

DUSTROL（登録商標）3001と共製剤化した細菌の生存可能性：DUSTROL（登録商標）3001（Arrmaz、FL、USA）との共製剤化後の細菌の生存能の評価を1カ月間の期間にわたって実施した。結果は、表18に示した通りである。本発明者らは、DPA遺伝子が同定されかつ／またはDPAを生成する細菌の33%（4/12）が1カ月間生存可能なままであったことを観察した。DPA遺伝子が同定されず、DPA生成が検出不能である株は、0%（0/10の株）が1カ月間生存可能なままであった。この実験において低下した生存は、DUSTROL（登録商標）3001の1つまたは複数の構成成分との微生物（DPAを生成するか否かにかかわらず）の不適合に起因し得る。

【0173】

DUSTROL（登録商標）3010と共製剤化した細菌の生存可能性：DUSTROL（登録商標）3010（Arrmaz、FL、USA）との共製剤化後の細菌の生存能

50

の評価を 1 カ月間の期間にわたって実施した。結果は、表 18 に示した通りである。本発明者らは、DPA 遺伝子が同定されかつ / または DPA を生成する細菌の 75 % (9 / 12) が 1 カ月間生存可能なままであったことを観察した。DPA 遺伝子が同定されず、DPA 生成が検出不能である株については、20 % (2 / 10 の株) が 1 カ月間生存可能なままであった。

【 0 1 7 4 】

【表 18 - 1】

表18. 液体防塵化学物質との共製剤化におけるコンソーシアム由来の個々の細菌の1カ月の生存

細菌の属/種	DPA 遺伝子	DPA 生成	MDC-200	DUSTROL (登録商標) 3275	DUSTROL (登録商標) 3133	DUSTROL (登録商標) 3139	DUSTROL (登録商標) 3001	DUSTROL (登録商標) 3010	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	DPA遺伝子が同定されかつ/ またはDPAを生成する細菌
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	1	1	1	1	0	1	
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1	1	1	1	0	1	
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1	1	1	1	0	1	
<i>Bacillus sp.</i>	1	1	1	1	1	1	0	1	
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	1	1	1	1	0	0	
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1	0	1	1	1	1	0	1	
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	0	1	1	1	1	1	0	
<i>Virgibacillus halophilus</i>	1	0	0	1	1	0	0	0	
<i>Clostridium beijerinckii</i>	0	1	1	1	1	1	0	1	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	DPA遺伝子が同定されておらずかつ検出可能なDPA生成がない細菌
<i>Azotobacter vinelandii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	

10

20

30

40

【表 18 - 2】

細菌の属/種	DPA 遺伝子	DPA 生成	MDC-200	DUSTROL (登録商標) 3275	DUSTROL (登録商標) 3133	DUSTROL (登録商標) 3139	DUSTROL (登録商標) 3001	DUSTROL (登録商標) 3010
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus casei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus vini</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	0	0	0	0	0	1

1=検出されたおよび0=検出されずまたは検出限界未満。DPA遺伝子の列は、DpaAおよびDpaB遺伝子の両方を有する株を表す。DPA生成の列は、テルビウム-DPA蛍光アッセイによってDPA生成が陽性であるかを試験する株を表す。次の6つの列(MDC-200、DUSTROL(登録商標)3275、3133、3139、3001、および3010)は各共製剤における1カ月の生存能力を表す。最後の列は、A)公知のDPA遺伝子を有するか、DPA、またはその両方を生成するおよびB)公知のDPA遺伝子を有さず、DPAも有さない株の群の生存可能性をまとめる。

【0175】

(実施例5)

液体UAN肥料と共製剤化した微生物コンソーシアの生存

液体UAN肥料と共製剤化した後の細菌の生存能の評価を、1カ月の期間にわたり様々な時点で実施した。簡潔には、各同質遺伝子株を、好氣的または嫌氣的のいずれかで液体培地(上記の通り)中で成長させた。次いで、培養物を等比率で混合し、次いで、混合物を1:180(微生物:UAN)の比でUAN32と組み合わせた。微生物の生存可能性を0、7、14、および28日目に評価し、表19にまとめる。0日目の時点で(共製剤化の約1時間後)、DPA遺伝子が同定されかつ/またはDPAを生成する細菌株の83%(10/12)が生存可能なままであった。DPA生成が検出できない細菌については、20%(2/10の株)のみが、0日目の時点で生存可能なままであった。7日目の時点では、DPA遺伝子が同定されかつ/またはDPAを生成する細菌株の67%(8/12)が生存可能なままであった(remained viable remained viable)。7日目の後には、このセットの株について、生存能に変化はなかった。DPA生成が検出できない細菌については、10%(1/10の株)のみが、7日目の時点で生存可能なままであった。

【0176】

【表 19 - 1】

表19. UAN肥料との同時製剤化における1カ月の期間にわたる細菌の生存可能性

属/種	DPA 遺伝子	DPA 生成	UAN- 0日目	UAN- 7日目	UAN- 14日目	UAN- 30日目	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1	0	0	0	DPA遺伝子 が同定され かつ/または DPAを生成 する細菌
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	1	1	1	1	
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1	1	1	1	
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1	1	1	1	
<i>Bacillus sp.</i>	1	1	1	1	1	1	
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	1	1	1	
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	1	1	1	1	
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	1	1	1	1	
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1	0	0	0	0	0	
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	0	1	1	1	1	
<i>Virgibacillus halophilus</i>	1	0	0	0	0	0	
<i>Clostridium beijerinckii</i>	0	1	1	0	0	0	DPA遺伝子 が同定されて おらずかつ検 出可能なDPA 生成がない 細菌
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	0	0*	0*	0*	0*	1	
<i>Azotobacter vinelandii</i>	0	0	0	0	0	0	
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0	0	1	1	1	1	
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0	0	0	0	0	0	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	0	0	0	0	0	
<i>Lactobacillus casei</i>	0	0	0	0	0	0	
<i>Lactobacillus vini</i>	0	0	0	0	0	0	
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	0	0	0	0	

10

20

30

40

【表 19 - 2】

属/種	DPA 遺伝子	DPA 生成	UAN- 0日目	UAN- 7日目	UAN- 14日目	UAN- 30日目	
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	0	0	0	0	
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	1	0	0	0	

10

1=検出されたおよび0=検出されずまたは検出限界未満。DPA遺伝子の列は、DpaAおよびDpaB遺伝子の両方を有する株を表す。DPA生成の列は、テルビウム-DPA蛍光アッセイによってDPA生成が陽性であるかを試験する株を表す。次の4つの列は、上記アッセイを使用して共製剤を生存能について試験した時点を表す。

*30日目に、初めて、*Acetobacter pasteurianus* (DPAを生成することができない株)を生存可能として検出し、これは、0、7、および14日目の時点では擬陰性であることを示した。

【0177】

(実施例6)

20

バイオ炭と共製剤化した微生物コンソーシアの生存

この実験では、表4に示した22種の細菌を個々に成長させ、次に、混合して、上述したように、コンソーシアムを生成した。1グラムのバイオ炭(Cool Terra(登録商標); Cool Planet Energy system, CO, USA)に約0.5mLのコンソーシアムを含浸させ、乾燥させ、7日間保管した後、以前に記載した生存可能性アッセイを使用して、どの細菌が生存したかを解析した。結果を表20にまとめる。DPA遺伝子が同定されかつ/またはDPAを生成する細菌の66.7%(7/12の株)がバイオ炭に関する含浸の7日後も生存可能なままであった。DPA遺伝子が同定されず、DPA生成が検出できない株については、30%(3/10の株)が同一の時間枠内で生存可能なままであった。

30

【0178】

【表 2 0】

表20. 7日後のバイオ炭におけるコンソーシアム由来の細菌の生存

細菌の属/種	DPA 遺伝子	DPA 生成	7日間	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1	DPA遺伝子が同定されかつ/またはDPAを生成する細菌
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	1	
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1	
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1	
<i>Bacillus sp.</i>	1	1	1	
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	0	
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	0	
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1	0	0	
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	0	1	
<i>Virgibacillus halophilus</i>	1	0	0	
<i>Clostridium beijerinckii</i>	0	1	1	DPA遺伝子が同定されておらずかつ検出可能なDPA生成がない細菌
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	0	0	0	
<i>Azotobacter vinelandii</i>	0	0	0	
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0	0	1	
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0	0	1	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	0	0	
<i>Lactobacillus paracasei/casei</i>	0	0	1	
<i>Lactobacillus vini</i>	0	0	0	
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	0	
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	0	
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	0	

1=検出されたおよび0=検出されずまたは検出限界未満。DPA遺伝子の列は、DpaAおよびDpaB遺伝子の両方を有する株を表す。DPA生成の列は、テルビウム-DPA蛍光アッセイによってDPA生成が陽性であるかを試験する株を表す。

【 0 1 7 9】

(実施例 7)

乾燥肥料顆粒と共製剤化した微生物コンソーシアムの生存

この実験では、表 4 に示した 22 種の細菌を個々に成長させ、次に、混合して、上述し

10

20

30

40

50

たように、コンソーシアムを生成し、 $35 \mu\text{L} / \text{g}$ の比率でMOP (0 - 0 - 60) 乾燥肥料に含浸させた。次いで、肥料を室温で保管し、周期的にサンプリングして、以前に記載したように微生物の生存可能性を評価した。結果を表21にまとめる。DPA遺伝子が同定されかつ/またはDPAを生成する細菌の66.7% (8 / 12の株) が、最長7日間生存可能なままであった。DPA遺伝子が同定されず、DPA生成が検出できない株については、30% (3 / 10の株) が同一の時間枠内で生存可能なままであった。

【0180】

【表21 - 1】

表21. 7日後のMOPにおけるコンソーシアム由来の細胞の生存

細菌の属/種	DPA 遺伝子	DPA 生成	7日目 の生存	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1	DPA遺伝子が 同定されかつ/ またはDPAを 生成する細菌
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	1	
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1	
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1	
<i>Bacillus sp.</i>	1	1	0	
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	0	
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	1	
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1	0	1	
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	0	1	
<i>Virgibacillus halophilus</i>	1	0	0	
<i>Clostridium beijerinckii</i>	0	1	0	DPA遺伝子が 同定されておら ずかつ検出可 能なDPA生成 がない細菌
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	0	0	1	
<i>Azotobacter vinelandii</i>	0	0	0	
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0	0	1	
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0	0	0	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	0	0	
<i>Lactobacillus paracasei/casei</i>	0	0	0	
<i>Lactobacillus vini</i>	0	0	0	
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	0	

10

20

30

40

【表 2 1 - 2】

細菌の属/種	DPA 遺伝子	DPA 生成	7日目 の生存
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	1
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	1

1=検出されたおよび0=検出されずまたは検出限界未満。DPA遺伝子の列は、DpaAおよびDpaB遺伝子の両方を有する株を表す。DPA生成の列は、テルビウム-DPA蛍光アッセイによってDPA生成が陽性であるかを試験する株を表す。

10

【0 1 8 1】

表 4 に示した 2 2 種の細菌もまた個々に成長させ、次に、混合して、上述したように、コンソーシアムを生成し、35 μ L / g の比率で MAP (1 1 - 5 2 - 0) に含浸させた。次いで、肥料を室温で保管し、周期的にサンプリングして、以前に記載したように微生物の生存可能性を評価した。結果を表 2 2 にまとめる。この事例では、DPA 遺伝子が同定されかつ / または DPA を生成する細菌の 5 8 . 3 % (7 / 1 2 の株) が、最長 7 日間生存可能なままであった。DPA 遺伝子が同定されず、DPA 生成が検出できない株については、4 0 % (4 / 1 0 の株) が同一の時間枠内で生存可能なままであった。

【0 1 8 2】

20

【表 2 2】

表22. 7日後のMAPにおけるコンソーシアム由来の細菌の生存

細菌の属/種	DPA 遺伝子	DPA 生成	7日目 の生存	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1	DPA遺伝子が 同定されかつ/ またはDPAを 生成する細菌
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	0	
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1	
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1	
<i>Bacillus sp.</i>	1	1	0	
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	0	
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	0	
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	1	
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1	0	1	
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	0	1	
<i>Virgibacillus halophilus</i>	1	0	0	DPA遺伝子が 同定されておら ずかつ検出可 能なDPA生成 がない細菌
<i>Clostridium beijerinckii</i>	0	1	1	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	0	0	1	
<i>Azotobacter vinelandii</i>	0	0	0	
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0	0	1	
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0	0	0	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	0	0	
<i>Lactobacillus paracasei/casei</i>	0	0	0	
<i>Lactobacillus vini</i>	0	0	0	
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	1	
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	1	
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	0	

1=検出されたおよび0=検出されずまたは検出限界未満。DPA遺伝子の列は、DpaAおよびDpaB遺伝子の両方を有する株を表す。DPA生成の列は、テルビウム-DPA蛍光アッセイによってDPA生成が陽性であるかを試験する株を表す。

【0 1 8 3】

(実施例 9)

DPA発現/生成と比較したコンソーシアム由来の細菌の生存

この実験では、表 4 に示した 22 種の細菌を個々に成長させ、次に、混合して、上述したように、コンソーシアムを生成した。次いで、コンソーシアムを室温で保管し、周期的にサンプリングして、前述したように、微生物の生存可能性を評価した。結果を表 2 3 に

まとめる。

【 0 1 8 4 】

2週目に、DPA遺伝子が同定されかつ/またはDPAを生成する細菌の83% (10/12の株) が生存可能なままであった。DPA遺伝子が同定されず、DPA生成が検出できない株については、60% (6/10の株) が同一の時間枠内で生存可能なままであった。7.5週後に、DPA遺伝子が同定されかつ/またはDPAを生成する細菌の58% (7/12の株) が生存可能なままであった。DPA遺伝子が検出されず、DPA生成が検出できない株については、50% (5/10の株) がこの期間内で生存可能なままであった。

【 0 1 8 5 】

10

【表 2 3 - 1】

表23. 使用済みの培地中のコンソーシアム由来の細菌の生存

細菌の属/種	DPA 遺伝子	DPA 生成	2週間	7.5週間	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1	1	DPA遺伝子が 同定されかつ/ またはDPAを生 成する細菌
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	1	0	
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1	1	
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1	1	
<i>Bacillus sp.</i>	1	1	1	1	
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	1	
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	1	1	
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	1	0	
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1	0	0	0	
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	0	1	0	
<i>Virgibacillus halophilus</i>	1	0	0	0	
<i>Clostridium beijerinckii</i>	0	1	1	1	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	0	0	1	1	DPA遺伝子が 同定されてお らずかつ検出 可能なDPA生 成がない細菌
<i>Azotobacter vinelandii</i>	0	0	0	0	
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0	0	1	1	

20

30

40

50

【表 2 3 - 2】

細菌の属/種	DPA 遺伝子	DPA 生成	2週間	7.5週間
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0	0	1	1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	0	1	0
<i>Lactobacillus paracasei/casei</i>	0	0	1	1
<i>Lactobacillus vini</i>	0	0	1	1
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	0	0
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	0	0
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	0	0

10

20

1=検出されたおよび0=検出されずまたは検出限界未満。DPA遺伝子の列は、DpaAおよびDpaB遺伝子の両方を有する株を表す。DPA生成の列は、テルビウム-DPA蛍光アッセイによってDPA生成が陽性であるかを試験する株を表す。

【 0 1 8 6 】

(実施例 1 0)

微生物の生存のまとめ

試験したすべての例では、DPA遺伝子が同定されかつ/またはDPAを生成する孢子形成細菌は、液体または乾燥製剤としてのいずれかで、農業担体との共製剤における経時的な生存可能性について、DPA遺伝子が同定されず、DPA生成が検出できない株より優れた性能を有した(表24および図4)。したがって、農業担体(湿潤したおよび/または乾燥した)との共製剤化のためのまたは種子処理として、選択された植物/土壌の有益な形質を伴う微生物コンソーシアの合理的設計では、孢子を形成し、かつDPAを生成する微生物の選択は、所望の微生物の機能(例えば、以下に限定されないが、窒素代謝、硫黄代謝、塩耐性、鉱物塩可溶性、セルロース分解、キチン分解、植物ホルモン産生、鉄代謝、有機物質の脱リン酸化)が生存している微生物において保持されることをもたらす助けとなり得る。一部の例では、このことにより、標的作物、土壌、および施用実施の必要性ならびに地理的課題および規制上の課題に応じるために、合理的に設計したコンソーシアムに存在する微生物の機能において十分な冗長性を保障することができる。

30

【 0 1 8 7 】

40

【表 2 4】

表 24. 農薬/担体との共製剤における微生物株の生存

担体(試験した貯蔵寿命)	DPA遺伝子が同定されかつ/または DPA を生成する細菌	DPA遺伝子が同定されておらずかつ検出可能なDPA生成がない細菌
MDC-200 (1 カ月)	92%	0%
DUSTROL(登録商標)3275 (1 カ月)	100%	0%
DUSTROL(登録商標)3133 (1 カ月)	100%	0%
DUSTROL(登録商標)3139 (1 カ月)	92%	0%
DUSTROL(登録商標)3001 (1 カ月)	33%	0%
DUSTROL(登録商標)3010 (1 カ月)	75%	20%
UAN (1 カ月)	67%	0%
パーライト(2 週間)	75-100%	60-80%
Azomite(登録商標)(2 週間)	83.3%	60%
バイオ炭(1 週間)	66.7%	30%
MOP (1 週間)	66.7%	30%
MAP (1 週間)	58.3%	40%
熟成液/使用済みの培地 (7.5 週間)	58%	50%

10

20

30

【0188】

(実施例 11)

植物の成長を促進する活性の評価

Seed Kingdom (Lubbock, TX) から購入したキュウリの種子を液体肥料の希釈混合物 (水中 25 ppm の NPK) を含浸させたロール発芽紙 (rolled germination paper) (Anchor Paper, Saint Paul, MN) において、22 ~ 24 で4日間、予め発芽させた。ポッティング培地 (Sunshine Mix) を Hoagland 溶液 (Hoagland, Calif. Agric. Exp. Stn. Bull. 347: 36-39, 1938) で前処理し、P、30.97 ppm; K、39.1 ppm; Ca、40.0 ppm; Mg、14.59 ppm; S、20.143 ppm; Fe、1.010 ppm; Cu、0.019 ppm; Co、0.012 ppm; B、2.44 ppm; Mn、0.494 ppm; Mo、0.001 ppm および Zn、0.056 ppm を含有するように改変した。1 ポンド当たり 1 L の比率のポッティング培地を使用した。各ポットに、10

40

50

% w / v 尿素溶液 1 m L を加えてから、同様の長さを有する予め発芽させたキュウリの苗を移植した。各処理について（対照を含む）、17～18個の植物を定義した成長条件で、平地で無作為化し、温度（16～24）および12時間の明期を制御した。対照のポットは、未処理のパーライト 2 g を含有した。実験ポットを表 4 に示した 22 種の細菌 2 m L を含浸させたパーライトで処理した。含浸させたパーライトをこのアッセイで使用する前に、2 週間乾燥させて保管した。平地に、改変した H o a g l a n d 溶液で週に 3 回、水まきした。28 から 32 日後に、シュートを乾燥させ、各植物について重量を記録した。一元 A N O V A（分散分析）でデータを解析し、事後チューキー検定を用いて、実験内で試料を比較した。シュートの乾燥重量は、微生物を含浸させたパーライトで処理した植物において増加したが、統計的な有意性には達しなかった（図 5）。主に実施例 4（表 17）において記載したように、D P A 遺伝子が同定されかつ / または D P A 生成が検出できる微生物は、出発コンソーシアムのサブセットである含浸させたパーライト上で生存した。

10

【0189】

（実施例 12）

D P A 生成コンソーシアム

追加の D P A 生成コンソーシアムを設計する際に使用するのに好適な株を同定するために、組織内の微生物コレクションをスクリーニングした。胞子を形成することが公知である属に由来する株を細菌のグリセロールストックから適切な培地上に復活させ、最長 3 日間成長させた。次いで、単一のコロニーを選択し、少なくとも 3 回継代し、純度を評価した。実施例 1 に記載したように、テルビウム - D P A 蛍光アッセイを使用して、D P A 生成について株を試験した。D P A を生成することが示された株を全ゲノムシーケンシングのために選択した。生物学的に純粋な分離株の全ゲノムシーケンシングを、I l l u m i n a N o v a S e q 6000 シーケンシングシステム（I l l u m i n a , I n c . , S a n D i e g o , C A U S A）を、シーケンスライブラリーの調製およびシーケンシングについての製造業者の推奨した方法に従って使用して、実施した。平均して長さ 87 b p の平均 5 , 133 , 928 リードを微生物分離株から作成した。d e n o v o ゲノムアセンブリを、S P A d e s 3 . 12 . 0 を使用して実施した（Nurk et al., J. Comput. Biol. 20:714-737, 2013）。次いで、アッセンブルしたコンティグを P R O K K A でアノテートした（Seemann, Bioinformatics 30(14):2068-2069, 2014）。次いで、アノテートしたゲノムをジピコリン酸合成酵素サブユニット A（D p a A）およびジピコリン酸合成酵素サブユニット B（D p a B）および鉄 - 硫黄フラビンタンパク質（I s f、表 25）の存在について評価した。ほとんどの事例では、D P A を生成した株は、D p a A と D p a B 遺伝子の両方を有し、I s f 遺伝子を欠いていた。D P A を生成し、D p a A および D p a B を欠いていたすべての株は、1 つまたは複数の I s f 遺伝子のコピーを有した。3 つの事例では、株は、3 つすべて（D p a A、D p a B、および I s f）の遺伝子を有した。したがって、テルビウム - D P A 蛍光アッセイによる D P A 生成の検出は、D p a A、D p a B、および / または I s f 遺伝子の存在と完全に相関した。

20

30

40

【0190】

【表 2 5 - 1】

表25. 全ゲノムの分類学的分類、DPA生成、ならびにDpaA、DpaB、およびIsfに関する遺伝子コピー数

全ゲノム ID	DPA- 生成	遺伝子コピー数		
		<i>DpaA</i>	<i>DpaB</i>	<i>Isf</i>
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus koreensis</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus clausii</i>	1	1	1	0
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1	0	0	6

【表 2 5 - 2】

全ゲノム ID	DPA- 生成	遺伝子コピー数		
		<i>DpaA</i>	<i>DpaB</i>	<i>Isf</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	0
<i>Clostridium sp. (carboxidivorans)</i>	1	0	0	1
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	1	0
<i>Clostridium sp. (scatologenes)</i>	1	0	0	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1	0
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	1	1	0
<i>Brevibacillus sp. (choshinensis)</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus sp. (pocheonensis)</i>	1	1	1	0
<i>Lysinibacillus sp. (fusiformis)</i>	1	1	1	0
<i>Lysinibacillus sp. (chungkukjangi)</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus pumilus</i>	1	1	1	0
<i>Rummeliibacillus sp. (pycnus)</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus cereus</i>	1	1	1	1
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	1	0
<i>Brevibacillus parabrevis</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus aryabhattai</i>	1	1	1	0
<i>Paenibacillus sp. (amylolyticus)</i>	1	1	1	0
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1	0	0	11
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	0
<i>Paenibacillus sp. (chitinolyticus)</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus sp. (wudalianchiensis)</i>	1	1	1	0
<i>Paenibacillus larvae</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	3	3	0
<i>Paenibacillus sp. (agaridevorans)</i>	1	1	1	0
<i>Clostridium sp. (tyrobutyricum)</i>	1	0	0	1
<i>Paenibacillus sp. (alvei)</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus sp. (selenatarsenatis)</i>	1	1	1	0
<i>Paenibacillus sp. (P1XP2)</i>	1	1	1	0
<i>Fontibacillus sp. (panacisegetis)</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus firmus</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	0
<i>Lysinibacillus sp. (chungkukjangi)</i>	1	1	1	0

10

20

30

40

【表 2 5 - 3】

全ゲノム ID	DPA- 生成	遺伝子コピー数		
		<i>DpaA</i>	<i>DpaB</i>	<i>Isf</i>
<i>Paenibacillus sp. (ehimensis)</i>	1	1	1	0
<i>Paenibacillus lactis</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus farraginis</i>	1	1	1	0
<i>Paenibacillus sp. (P1XP2)</i>	1	1	1	0
<i>Brevibacillus massiliensis</i>	1	1	1	0
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus litoralis</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus endophyticus</i>	1	1	1	0
<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus frigoritolerans</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus velezensis</i>	1	1	1	0
<i>Clostridium aerotolerans</i>	1	1	1	1
<i>Sphingomonas koreensis</i>	1	0	0	2
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1	0	0	10
<i>Clostridium aerotolerans</i>	1	1	1	2
<i>Brevibacillus sp. (brevis)</i>	1	2	2	0
<i>Bacillus sp. (cereus)</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus badius</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus aryabhattai</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus anthracis</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus drentensis</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus sp. (cuccumis)</i>	1	1	1	0
<i>Paenibacillus peoriae</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus sp. (cereus)</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus aryabhattai</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus sp. (solani)</i>	1	1	1	0
<i>Terribacillus sp. (aidingensis)</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus sp. (circulans)</i>	1	1	1	0
<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	1	1	1	0

DPA生成の列は、テルビウム-DPA蛍光アッセイによってDPA生成が陽性であるかを試験する株を表し、1=検出されたおよび0=検出されずまたは検出限界未満。

【 0 1 9 1 】

D P A 生成が陽性であるかを試験した株については、潜在的な微生物代謝活性（例えば、以下に限定されないが、窒素代謝、硫黄代謝、塩耐性、鉍物塩可溶性、セルロース分解、キチン分解、植物ホルモン産生、鉄代謝、有機物質の脱リン酸化）を、W O 2 0 1 8 /

10

20

30

40

50

045004 および実施例1に記載されたように、実験室アッセイを使用して評価した。最大数の代謝活性を有する株を、DPA生成を欠く5種の株と共に、微生物コンソーシアにおける共発酵 (co-fermentation) について選択し、それらを代謝活性について選択した (実施例1を参照されたい)。本明細書において乾燥製剤コンソーシアム (DFC) とも称される、コンソーシアム (表26を参照されたい) における共発酵に適していることが証明されたこれらの株を、ベントナイト、パーライトおよび/または尿素などの担体との共製剤化のために選択した。

【0192】

この実施例に含まれるすべてのコンソーシアは、以下のように発酵させた。好気性と嫌気性の両方の細菌株を2~10%の糖供給源を含有する培地で培養した。アミノ酸、窒素およびペプチドは、以下のうちの1つまたは複数の形態で与えた：食品グレードのホエイ粉末 (0.1~0.5% w/v)、酵母抽出物 (0.1~0.5% w/v)、酵素によって生成した非GMOダイズ抽出物 (0.1~0.5% w/v; Ferti-Nitro Plus Plant N; Ferti-Organic, Brownsville, TX USA)、スピルリナ (0.1~0.5% w/v)、および/またはペプトン (0.1~0.5% w/v)。必要な場合には、追加のビタミン類および微量栄養素をケルプ抽出物 (0.1~0.5% w/v)、精製ビタミンB (Sigma)、および/またはWolfの微量金属溶液によって与えた。必要な場合には、追加の塩類をリン酸緩衝食塩水および/または塩化ナトリウム添加 (0~4% w/v) として添加した。AMC1 (上記した) からの株を1.5リットルの作業容積を有する2LのDASGIPバイオリアクター (Eppendorf North America Hauppauge, NY) 中に接種した。発酵中のpHを5.0から7.0の間で維持した。発酵中の通気条件は、目標の酸素移動速度 ($k_L a$ を使用して推定した) を得るために、攪拌、ガス組成 (空気および/または窒素ガス) およびガス流量を変化させることによって制御し、 $k_L a$ (時間あたり) を0から110の範囲にした。温度は、28 から35 の間で制御した。

【0193】

【表26-1】

表26. 担体とのまたは種子処理としての共製剤のために設計した共培養コンソーシアム(「DFC」)

分類学	DPA 生成
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1
<i>Bacillus firmus</i>	1
<i>Bacillus flexus</i>	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1
<i>Bacillus megaterium</i>	1
<i>Bacillus pumilus</i>	1
<i>Bacillus koreensis</i>	1
<i>Bacillus drentensis</i>	1
<i>Bacillus subtilis</i>	1
<i>Clostridium bifermentans</i>	1
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0

【表 2 6 - 2】

分類学	DPA 生成
<i>Lactobacillus paracasei</i>	0
<i>Fontibacillus sp. (panacisegetis)</i>	1
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	0
<i>Paenibacillus lautus</i>	1
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1
<i>Paenibacillus cookii</i>	1
<i>Paenibacillus sp. (chitinolyticus)</i>	1
<i>Paenibacillus sp. (P1XP2)</i>	1
<i>Pseudomonas sp.</i>	0
<i>Streptomyces griseus</i>	0

10

DPA生成の列は、テルビウム-DPA蛍光アッセイによってDPA生成が陽性であるかを試験する株を表し、1=検出されたおよび0=検出されずまたは検出限界未満。

20

【0194】

共製剤を生成するために、DFC発酵液をベントナイトまたはパーライトに適用し、次いで、およそ24時間乾燥させた。一部の事例では、適用前に、遠心分離によって発酵液を濃縮した。次いで、生存能について共製剤を試験した。さらに、特定の共製剤を植物成長室試験で試験し、植物の有益な特徴を評価した。

【0195】

担体とのDFCおよびAMC1の生存能：DFC液、AMC1液、DFCを含浸させたパーライト、AMC1を含浸させたパーライト、DFCを含浸させたベントナイト、およびAMC1を含浸させたベントナイトを含んだ圃場試験のための調製物では、DFCおよびAMC1はそれぞれ共発酵し、パーライトまたはベントナイト担体に、それぞれ、2 mL / gまたは1 mL / gを含浸させた。含浸させたパーライトおよびベントナイトを1から3週間乾燥させて保管し、その時点で生存能アッセイを実施して、施用時点で生存可能である株の数を決定した。さらに、液体を1週間保管し、その時点で生存能アッセイを実施して、施用時点で生存可能である株の数を決定した。液体中では、23種のDFC株のうちの16種は、22種のAMC1株のうちの14種に対して、1週間後に生存可能であった(表27)。

30

【0196】

【表 2 7 - 1】

表27. エイジング後の液体中のDFCおよびAMC1コンソーシアムの生存能力

	DFC 液体	AMC1 液体
	T0 - 施用時	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1
<i>Bacillus flexus</i>	0	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1

【表 2 7 - 2】

	DFC 液体	AMC1 液体
	T0 - 施用時	
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	0	1
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	1
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1	1
<i>Clostridium pasteurianum</i>	1	1
<i>Lactobacillus paracasei</i>	1	1
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0
<i>Streptomyces griseus</i>	1	0
<i>Bacillus koreensis</i>	0	
<i>Bacillus pumilus</i>	1	
<i>Paenibacillus sp.</i> (chitinolyticus)	1	
<i>Paenibacillus sp. (P1XP2)</i>	1	
<i>Fontibacillus sp.</i> (panacisegetis)	1	
<i>Bacillus firmus</i>	0	
<i>Clostridium bifermentans</i>	1	
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1	
<i>Bacillus drentensis</i>	0	
<i>Bacillus sp.</i>		0
<i>Virgibacillus halophilus</i>		0
<i>Acetobacter pasteurianus</i>		1
<i>Azotobacter vinelandii</i>		0
<i>Lactobacillus buchneri</i>		1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>		0
<i>Lactobacillus vini</i>		1
<i>Pseudomonas putida</i>		0
生存可能な総数:	16	14

1=検出されたおよび0=検出されずまたは検出限界未満

【0 1 9 7】

含浸させたパーライトでは、22種のAMC1株のうちの14種に対する、23種のDFC株のうちの17種が最長3週間後も生存可能であった(表28)。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 8 】

【 表 2 8 - 1 】

表28. エイジング後にパーライトに含浸させたDFCおよびAMC1コンソーシアムの生存能力

	DFC パーライト	AMC1 パーライト
	T0 - 施用時	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1
<i>Bacillus flexus</i>	1	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	0	0
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	1
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1	1
<i>Clostridium pasteurianum</i>	1	1
<i>Lactobacillus paracasei</i>	0	1
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0
<i>Bacillus koreensis</i>	1	
<i>Bacillus pumilus</i>	1	
<i>Paenibacillus sp.</i> (<i>chitinolyticus</i>)	1	
<i>Paenibacillus sp. (P1XP2)</i>	1	
<i>Fontibacillus sp.</i> (<i>panacisegetis</i>)	1	
<i>Bacillus firmus</i>	1	
<i>Clostridium bifermentans</i>	0	
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1	
<i>Bacillus drentensis</i>	0	
<i>Bacillus sp.</i>		1
<i>Virgibacillus halophilus</i>		0
<i>Acetobacter pasteurianus</i>		1
<i>Azotobacter vinelandii</i>		0
<i>Lactobacillus buchneri</i>		1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>		0
<i>Lactobacillus vini</i>		0

10

20

30

40

50

【表 2 8 - 2】

	DFC パーライト	AMC1 パーライト
	T0 - 施用時	
<i>Pseudomonas putida</i>		0
生存可能な総数:	17	14

1=検出されたおよび0=検出されずまたは検出限界未満。

【 0 1 9 9 】

10

含浸させたベントナイトでは、22種のAMC1株のうちの14種に対する、23種のDFC株のうちの17種は、最長3週間後に生存可能であった(表29)。このことは、液体中で保存された場合、およびパーライトまたはベントナイトなどの担体上で乾燥された場合に、どのようなDPA生成株が改善された生存能を維持するかを示している。

【 0 2 0 0 】

【表 29 - 1】

表29. エイジング後にベントナイトに含浸させたDFCおよびAMC1コンソーシアムの生存能力

	DFC ベントナイト	AMC1 ベントナイト
	T0 - 施用時	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1
<i>Bacillus flexus</i>	1	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	0	0
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	1
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1	1
<i>Clostridium pasteurianum</i>	1	1
<i>Lactobacillus paracasei</i>	1	1
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0
<i>Bacillus koreensis</i>	0	
<i>Bacillus pumilus</i>	1	
<i>Paenibacillus sp.</i> (chitinolyticus)	1	
<i>Paenibacillus sp. (P1XP2)</i>	1	
<i>Fontibacillus sp.</i> (panacisegetis)	1	
<i>Bacillus firmus</i>	1	

10

20

30

【表 2 9 - 2】

	DFC ベントナイト	AMC1 ベントナイト
	T0 - 施用時	
<i>Clostridium bifermentans</i>	0	
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1	
<i>Bacillus drentensis</i>	0	
<i>Bacillus sp.</i>		1
<i>Virgibacillus halophilus</i>		0
<i>Acetobacter pasteurianus</i>		0
<i>Azotobacter vinelandii</i>		0
<i>Lactobacillus buchneri</i>		1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>		0
<i>Lactobacillus vini</i>		1
<i>Pseudomonas putida</i>		0
生存可能な総数:	17	14

10

20

1=検出されたおよび0=検出されずまたは検出限界未満

【 0 2 0 1】

3カ月のエイジング後に、DFCを含浸させたパーライトでは、15株が生存可能と示され、AMC1を含浸させたパーライトでは、11株のみが生存可能と示され、そのうちの1株のみがDPAを生成しなかった(表30および31)。

【 0 2 0 2】

【表 3 0 - 1】

表30. 経時的にパーライトおよびベントナイトに含浸させたAMC1の生存能力

	DPA	パーライト- 3カ月間	ベントナイト- 3カ月間
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1
<i>Bacillus sp.</i>	1	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	1
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	1
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1	1	1
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	1	1
<i>Virgibacillus halophilus</i>	0	0	0
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1	1	1
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	0	0	0
<i>Azotobacter vinelandii</i>	0	0	0

10

20

【表 3 0 - 2】

<i>Clostridium pasteurianum</i>	0	1	1
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0	0	1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	0	0
<i>Lactobacillus paracasei</i>	0	0	1
<i>Lactobacillus vini</i>	0	0	0
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	0
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	0
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	0
生存可能な総数:		11	13

30

DPAの列は、テルビウム-DPA蛍光アッセイによってDPA生成が陽性であるかを試験する株を表す。1=検出されたおよび0=検出されずまたは検出限界未満。

40

【0 2 0 3】

同じ3カ月のエイジング後に、DFCを含浸させたベントナイトでは、19株が生存可能と示され、一方、AMC1を含浸させたパーライトでは、13株について生存可能と示され、そのうちの3株のみがDPAを生成しなかった(表30および31)。

【0 2 0 4】

【表 3 1 - 1】

表31. 経時的にパーライトおよびベントナイトに含浸させたDFCの生存能力

	DPA	パーライト- 3カ月間	ベントナイト- 3カ月間
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1
<i>Bacillus flexus</i>	1	0	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	1
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	1
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1	1	1
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	1	1
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1	1	1
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0	1	1
<i>Lactobacillus paracasei</i>	0	0	1
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	0
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	0
<i>Bacillus koreensis</i>	1	0	1
<i>Bacillus pumilus</i>	1	1	1
<i>Paenibacillus sp. (chitinolyticus)</i>	1	1	1
<i>Paenibacillus sp. (P1XP2)</i>	1	1	1

【表 3 1 - 2】

<i>Fontibacillus sp. (panacisegetis)</i>	1	1	1
<i>Bacillus firmus</i>	1	0	1
<i>Clostridium bifermentans</i>	1	0	0
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1	1	1
<i>Bacillus drentensis</i>	1	0	0
生存可能な総数:		15	19

DPAの列は、テルビウム-DPA蛍光アッセイによってDPA生成が陽性であるかを試験する株を表す。1=検出されたおよび0=検出されずまたは検出限界未満。

【0 2 0 5】

DFC植物の有益な活性の評価: Seed Kingdom (Lubbock, TX) から購入したキュウリの種子を液体肥料の希釈混合物 (水中 25 ppm の NPK) を含浸させたロール発芽紙 (Anchor Paper, Saint Paul, MN) において、22 で4日間、予め発芽させた。種子の準備時に、ポットティング培地 (Sunshine Mix) を、1ヘクタール当たり 67.60 kg のリン酸三カルシウム (TCP) および改変した Hoagland 溶液 (Hoagland, Calif. Agric. Exp. Stn. Bul

l. 347:36-39, 1938) の前処理で調製した。この H o a g l a n d 溶液、N K + は、N、56.03 ppm; P、0 ppm; K、39.1 ppm; Ca、40.0 ppm; Mg、14.59 ppm; S、20.143 ppm; Fe、1.010 ppm; Cu、0.019 ppm; Co、0.012 ppm; B、2.44 ppm; Mn、0.494 ppm; Mo、0.001 ppm および Zn、0.056 ppm を含有するように改変し、1 ポンド当たり 1 L の比率のポッティング培地を適用した。対照の処理は、ポッティング培地 1 ポンド当たり 10 g の未処理パーライトまたは 20 g の未処理ベントナイトも含有した。比較すると、実験ポットは、対照ポットと同じ量のパーライトまたはベントナイトを有したが、これらの担体には、それぞれ、2 mL / g の D F C または 1 mL / g の D F C を含浸させた。含浸させたパーライトとベントナイトは、このアッセイで使用する前に 2 週間、乾燥して保管し、その時点で生存能アッセイを実施して、施用時点で生存可能である D F C からの株の数を決定した。大多数の株 (23 種の生存可能な株のうちの 15 ~ 18 種) が共製剤化およびエイジングプロセスで生存した。

10

【0206】

キュウリ種子の前発芽に続き、同様の長さの苗を選択し、1つを各ポットに移植した。各処理について (対照を含む)、18 個の植物を定義した成長条件で、平地で無作為化し、温度 (16 ~ 24) および 12 時間の明期を制御した。平地に、改変した H o a g l a n d 溶液 (N、0 ppm; P、14.49 ppm; K、19.55 ppm; Ca、20.0 ppm; Mg、14.59 ppm; S、20.143 ppm; Fe、1.010 ppm; Cu、0.019 ppm; Co、0.012 ppm; B、2.44 ppm; Mn、0.494 ppm; Mo、0.001 ppm および Zn、0.056 ppm を含有する P K +) で移植の 3 日後にはじめて水まきした。次いで、平地に、N K + H o a g l a n d 溶液で 1 週間に 3 回水まきした。32 日後に、シュートを回収し、各植物について乾燥重量を記録した。一元 A N O V A (分散分析) でデータを解析し、事後チューキー検定を用いて、実験内で試料を比較した。これらの試験は、2 つの別々の状況で 2 回実施した。

20

【0207】

最初の試験の結果は、D F C を含浸させたパーライトと D F C を含浸させたベントナイトの両方で、対照と比較した場合のシュート重量の有意な増加を示した (図 6)。2 回目の試験の結果は、D F C 液処理と D F C を含浸させたパーライトの両方でシュート重量の有意な増加も示し、D F C を含浸させたパーライトは、D F C 液処理よりも良好な (b e t t e r t h a t) 性能を示したが、これらに有意差はなかった (図 7)。よって、担体との共製剤は、新たな液体製品と比較した際に有効性に影響を及ぼさなかった。

30

【0208】

(実施例 13)

微生物による種子処理

微生物による種子処理をパッチ処理機 S G S (S G S N o r t h A m e r i c a 、 B r o o k i n g s 、 S D U S A) を使用して、トウモロコシおよびダイズ種子に施用した。各処理について 1 k g の種子を処理した。別々の種子処理では、微生物を未処理の種子に直接施用するか、殺虫剤 / 殺真菌剤パッケージで予め処理した種子にオーバーコートとして施用するか、または種子に施用する前に殺虫剤 / 殺真菌剤スラリーと混合した。トウモロコシでは、殺虫剤 / 殺真菌剤処理は、メタラキシル、トリフロキシストロビン、イピコナゾール、およびクロチアニジンを含む A c c e l e r o n ミックス、または C r u i s e r (チアメトキサム)、フルジオキシソニル、メフェノキサム、アゾキシストロビン、およびチアベンダゾールを含む C r u i s e r M a x x ミックスのいずれかからなった。ダイズでは、殺虫剤 / 殺真菌剤処理は、メタラキシル、ピラクロストロビン、イミダクロプリド、およびフルキサピロキサドを含む A c c e l e r o n ミックス、または C r u i s e r (チアメトキサム)、メフェノキサム、フルジオキシソニル、およびセデキサンを含有する C r u s i e r M a x x ミックスのいずれかからなった。

40

【0209】

種子処理後、48 時間以内およびその後 3 週間以内に生存能を試験した (実施例 1 に

50

けるように)。圧倒的大多数の株(23種の生存可能な株のうちの19~20種)が最初の共製剤化プロセスで生存した。3週間後、わずかな生存能の低下のみが観察された(23種の生存可能な株のうちの17~18種;図8)。このことは、DPA生成株を選択することが、ペントナイトおよびパーライトなどの乾燥肥料に対して有効だけでなく、種子処理にも有効であることも示した。さらに、発芽について種子を試験して、発芽能に関する種子処理の影響を決定した。100個の種子についての4つの複製を発芽について試験する低温成長力試験(cold vigor test)を実施した。100個の種子の複製それぞれを湿らせたクレープセルローズ紙上に播種し、10で一晩冷やした。次いで、種子を1インチの滅菌されていない、70%の水分保持能まで湿らせた砂で覆い、光を与えずに7日間10に戻した。次いで、種子を4日間25に変化させた。砂から発芽した苗を評価した。結果は、AOSAルールに従って正常であると分類された苗の数を表すパーセンテージとして報告した。82%またはそれより高いスコアは、Iowa State Seed LabおよびSGSに従ってトウモロコシ種子ロットを市販するために許容される最小値であると考えられる。すべての処理は、少なくとも83.8%またはそれより高い発芽パーセンテージを有した(表32)。このことは、種子処理の形態での性能が良好であることに加え、DPA生成株が前記種子の発芽に負の影響を与えなかったことを示す。

10

【0210】

【表32】

表32. 低温活力発芽試験を使用したDFCで処理したトウモロコシおよびダイズの種子の平均発芽率

20

	トウモロコシ		大豆	
	未処理	DFC	未処理	DFC
殺真菌剤による処置なし	90.30%	87.50%	87.50%	83.80%
Acceleron 処理済	89.30%	87.90%	86.00%	84.90%
CruiserMaxx 処理済	88.00%	86.00%	85.00%	88.65%

30

【0211】

本開示の原理を適用することができる多くの可能な実施形態を鑑みて、示した実施形態は例に過ぎず、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではないことが認識されるべきである。むしろ、本発明の範囲は、以下の特許請求の範囲によって定義される。したがって、本発明者らは、これらの請求項の範囲および趣旨に合致するすべてを本発明者の発明として主張する。

【図 1 A】

FIG. 1A

Bacillus megaterium	1
Bacillus subtilis	1
Paenibacillus cooki	1
Bacillus licheniformis	1
Paenibacillus lautus	1
Oceanobacillus oncorhynch	1
Bacillus amyloliquefaciens	1
Bacillus sp.	1
Paenibacillus chibensis	1
Bacillus flexus	1
Bacillus firmus	1
Virgibacillus halophilus のコ	1
Virgibacillus halophilus のコ	1
Virgibacillus azoreducens	1
Consensus60	1
PKR08386	1
61	
Bacillus megaterium	61
Bacillus subtilis	61
Paenibacillus cooki	61
Bacillus licheniformis	61
Paenibacillus lautus	61
Oceanobacillus oncorhynch	61
Bacillus amyloliquefaciens	61
Bacillus sp.	61
Paenibacillus chibensis	61
Bacillus flexus	61
Bacillus firmus	61
Virgibacillus halophilus のコ	61
Virgibacillus halophilus のコ	61
Virgibacillus azoreducens	61
Consensus60	61
PKR08386	61
121	
Bacillus megaterium	121
Bacillus subtilis	121
Paenibacillus cooki	121
Bacillus licheniformis	121
Paenibacillus lautus	121
Oceanobacillus oncorhynch	121
Bacillus amyloliquefaciens	121
Bacillus sp.	121
Paenibacillus chibensis	121
Bacillus flexus	121
Bacillus firmus	121
Virgibacillus halophilus copy 1	121
Virgibacillus halophilus copy 2	121
Virgibacillus azoreducens	121
Consensus60	121
PKR08386	121

【図 2】

FIG. 2

Bacillus megaterium	1
Bacillus subtilis	1
Paenibacillus cooki	1
Bacillus licheniformis	1
Paenibacillus lautus	1
Oceanobacillus oncorhynch	1
Bacillus amyloliquefaciens	1
Bacillus sp.	1
Paenibacillus chibensis	1
Bacillus flexus	1
Bacillus firmus	1
Virgibacillus halophilus	1
Virgibacillus azoreducens	1
Consensus60	1
PKR08386	1
71	
Bacillus megaterium	71
Bacillus subtilis	71
Paenibacillus cooki	71
Bacillus licheniformis	71
Paenibacillus lautus	71
Oceanobacillus oncorhynch	71
Bacillus amyloliquefaciens	71
Bacillus sp.	71
Paenibacillus chibensis	71
Bacillus flexus	71
Virgibacillus halophilus	71
Virgibacillus azoreducens	71
Consensus60	71
PKR08386	71
141	
Bacillus megaterium	141
Bacillus subtilis	141
Paenibacillus cooki	141
Bacillus licheniformis	141
Paenibacillus lautus	141
Oceanobacillus oncorhynch	141
Bacillus amyloliquefaciens	141
Bacillus sp.	141
Paenibacillus chibensis	141
Bacillus flexus	141
Bacillus firmus	141
Virgibacillus halophilus	141
Virgibacillus azoreducens	141
Consensus60	141
PKR08386	141

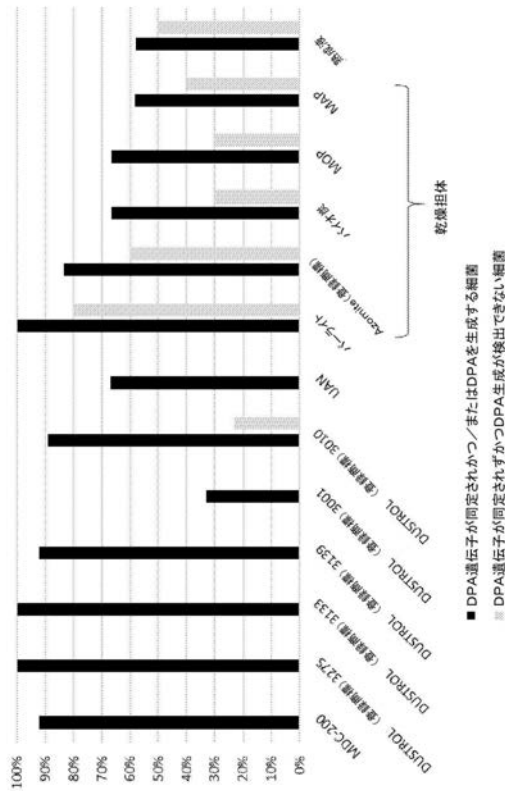
【図 1 B】

FIG. 1B

Bacillus megaterium	181
Bacillus subtilis	181
Paenibacillus cooki	181
Bacillus licheniformis	181
Paenibacillus lautus	181
Oceanobacillus oncorhynch	181
Bacillus amyloliquefaciens	181
Bacillus sp.	181
Paenibacillus chibensis	181
Bacillus flexus	181
Bacillus firmus	181
Virgibacillus halophilus のコ	181
Virgibacillus halophilus のコ	181
Virgibacillus azoreducens	181
Consensus60	181
PKR08386	181
241	
Bacillus megaterium	241
Bacillus subtilis	241
Paenibacillus cooki	241
Bacillus licheniformis	241
Paenibacillus lautus	241
Oceanobacillus oncorhynch	241
Bacillus amyloliquefaciens	241
Bacillus sp.	241
Paenibacillus chibensis	241
Bacillus flexus	241
Bacillus firmus	241
Virgibacillus halophilus copy 1	241
Virgibacillus halophilus copy 2	241
Virgibacillus azoreducens	241
Consensus60	241
PKR08386	241
301	
Bacillus megaterium	301
Bacillus subtilis	301
Paenibacillus cooki	301
Bacillus licheniformis	301
Paenibacillus lautus	301
Oceanobacillus oncorhynch	301
Bacillus amyloliquefaciens	301
Bacillus sp.	301
Paenibacillus chibensis	301
Bacillus flexus	301
Bacillus firmus	301
Virgibacillus halophilus のコ	301
Virgibacillus halophilus のコ	301
Virgibacillus azoreducens	301
Consensus60	301
PKR08386	301
61	
Bacillus megaterium	61
Bacillus subtilis	61
Paenibacillus cooki	61
Bacillus licheniformis	61
Paenibacillus lautus	61
Oceanobacillus oncorhynch	61
Bacillus amyloliquefaciens	61
Bacillus sp.	61
Paenibacillus chibensis	61
Bacillus flexus	61
Bacillus firmus	61
Virgibacillus halophilus copy 1	61
Virgibacillus halophilus copy 2	61
Virgibacillus azoreducens	61
Consensus60	61
PKR08386	61
121	
Bacillus megaterium	121
Bacillus subtilis	121
Paenibacillus cooki	121
Bacillus licheniformis	121
Paenibacillus lautus	121
Oceanobacillus oncorhynch	121
Bacillus amyloliquefaciens	121
Bacillus sp.	121
Paenibacillus chibensis	121
Bacillus flexus	121
Bacillus firmus	121
Virgibacillus halophilus copy 1	121
Virgibacillus halophilus copy 2	121
Virgibacillus azoreducens	121
Consensus60	121
PKR08386	121
181	
Bacillus megaterium	181
Bacillus subtilis	181
Paenibacillus cooki	181
Bacillus licheniformis	181
Paenibacillus lautus	181
Oceanobacillus oncorhynch	181
Bacillus amyloliquefaciens	181
Bacillus sp.	181
Paenibacillus chibensis	181
Bacillus flexus	181
Bacillus firmus	181
Virgibacillus halophilus copy 1	181
Virgibacillus halophilus copy 2	181
Virgibacillus azoreducens	181
Consensus60	181
PKR08386	181
241	
Bacillus megaterium	241
Bacillus subtilis	241
Paenibacillus cooki	241
Bacillus licheniformis	241
Paenibacillus lautus	241
Oceanobacillus oncorhynch	241
Bacillus amyloliquefaciens	241
Bacillus sp.	241
Paenibacillus chibensis	241
Bacillus flexus	241
Bacillus firmus	241
Virgibacillus halophilus copy 1	241
Virgibacillus halophilus copy 2	241
Virgibacillus azoreducens	241
Consensus60	241
PKR08386	241

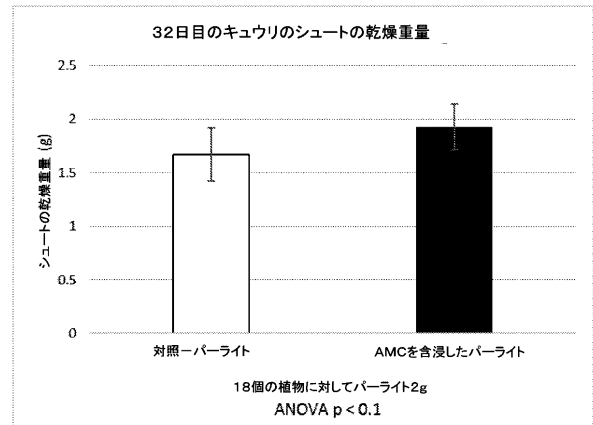
【 図 4 】

FIG. 4



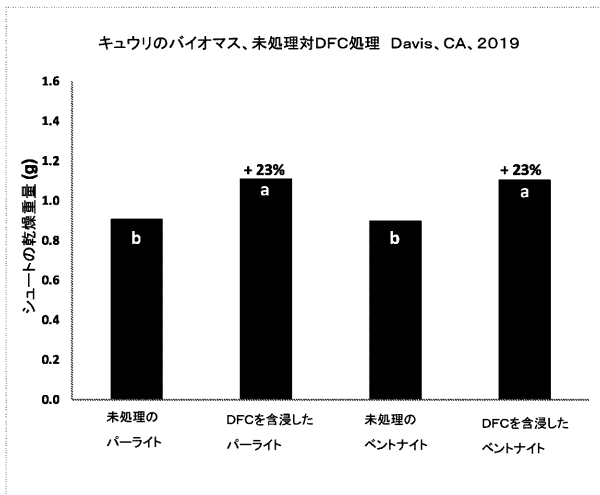
【 図 5 】

FIG. 5



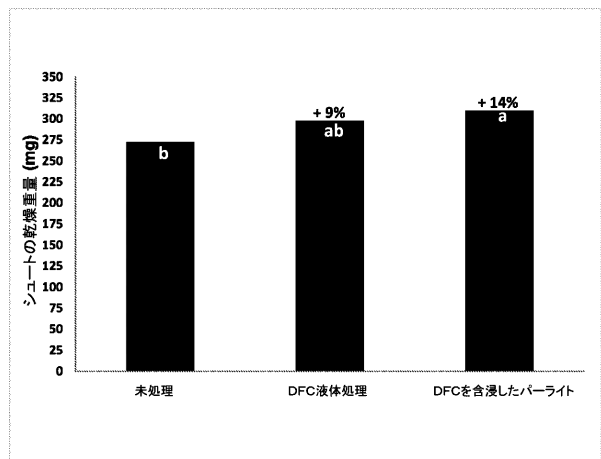
【 図 6 】

FIG. 6



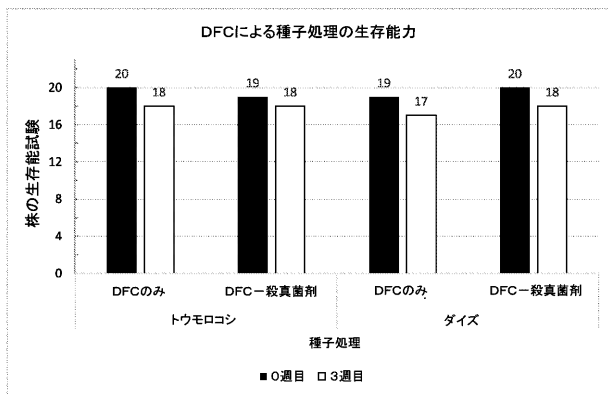
【 図 7 】

FIG. 7



【 図 8 】

FIG. 8



【 配 列 表 】

2021526855000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/35530

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/35530

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 6-10, 14, 25-29, 37-47
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-Please See Supplemental Page-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-5, 11-13

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/35530

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - C12N 1/20; C07K 21/04; A01N 63/02; C05F 11/08; C12R 1/01 (2019.01) CPC - C12N 1/20; C07K 21/04; A01N 63/02; C05F 11/08; C12R 1/01, 1/07, 1/10, 1/11, 1/125, 1/145, 1/225, 1/245, 1/38, 1/465, 1/545 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) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
D, A	WO 2018/045004 A1 (AGRINOS AS) 8 March 2018; abstract; page 1, line 29-page 2, line 32, page 3, lines 33-36; page 4, lines 1-2, 7-9, 11-19, 22-29; page 10, lines 7-37.	1-4, 5/1-5, 11/1-4, 12/11/1-4, 13/11/1-4
A	(LEE, et al.) <i>Fontibacillus Panadisegetis</i> Sp. Nov., Isolated From Soil Of A Ginseng Field. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. February 2011, Epub 19 March 2010, Vol. 61, Pt. 2; pages 36-374; abstract; DOI: 10.1099/ijs.0.019620-0	1, 5/1, 11/1, 12/11/1, 13/11/1
A	US 2016/0143961 A1 (EPIVA BIOSCIENCES, INC.) 26 May 2016; Table 1; paragraphs [0004], [0012], [0167], [0201], [0207], [0219], [0282], [0285]-[0286].	1-4, 5/1-5, 11/1-4, 12/11/1-4, 13/11/1-4
A	US 2014/0147425 A1 (SERES HEALTH, INC.) 29 May 2014; Table 3; paragraphs [0008]-[0009], [0033], [0067], [0069].	2-4, 5/2-5, 11/2-4, 12/11/2-4, 13/11/2-4
A	(LEE, et al.) Transfer Of <i>Bacillus Ehimensis</i> And <i>Bacillus Chitinolyticus</i> To The Genus <i>Paenibacillus</i> With Emended Descriptions Of <i>Paenibacillus Ehimensis</i> Comb. Nov. And <i>Paenibacillus Chitinolyticus</i> Comb. Nov.. International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology. May 2004, Vol. 54, Pt. 3; pages 929-933; DOI: 10.1099/ijs.0.02765-0	1, 5/1, 11/1, 12/11/1, 13/11/1
A	(ADELSKOV, et al.) Draft Genome Sequence Of <i>Paenibacillus</i> Strain P1XP2, A Polysaccharide-Degrading, Thermophilic, Facultative Anaerobic Bacterium Isolated From A Commercial Bioreactor Degrading Food Waste. Genome Announcements. 29 January 2015, Vol. 3, No. 1; pages 1-2; DOI: 10.1128/genomeA.01484-14	1, 5/1, 11/1, 12/11/1, 13/11/1
☐ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent 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 15 October 2019 (15.10.2019)		Date of mailing of the international search report 29 OCT 2019
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/35530

-Continued from Box No. III: Observations Where Unity of Invention is Lacking-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-5, 11-13 are directed toward a composition comprising cells of microbial species.

Groups II+, Claims 15-24, 30-36, DpaA (DPA synthase subunit); SEQ ID NO: 26 (DpaA amino acid sequence) and EtfA (flavoprotein) are directed toward a method for selecting a microbe for co-formulation with a carrier or seed.

The method can be searched to the extent that it comprises DpaA (first exemplary DPA synthase subunit), SEQ ID NO: 26 (first exemplary DpaA amino acid sequence) and EtfA (first exemplary flavoprotein). Applicant is invited to elect additional DPA sequence(s) and/or flavoprotein sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO: such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional DPA sequence(s) and/or flavoprotein sequence(s) can be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 15-16, 17-24 (each in-part), 30-32, and 33 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims can be searched without fee to the extent that they encompass DpaA (DPA synthase subunit), SEQ ID NO: 26 (DpaA amino acid sequence) and EtfA (flavoprotein). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected DPA sequence(s) and/or flavoprotein sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) can result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NO: 27 (DpaA amino acid sequence); SEQ ID NO: 57 (flavoprotein amino acid sequence).

The inventions listed as Groups I and II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include microbes with 16S rDNA, not present in any of Groups II+; the special technical features of Groups II+ include a microbe that comprises one or more dipicolinic acid (DPA) synthase genes, not present in Group I.

Groups I-II+ share the technical features including a composition comprising a microbe.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2018/045004 A1 AGRINOS AS (hereinafter 'Agrinos').

Agrinos discloses a composition comprising a microbe (abstract).

No technical features are shared between the DPA sequences and flavoprotein sequences of Groups II+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups II+ were considered to share the technical features including: a method for selecting a microbe for co-formulation with a carrier or seed, comprising: identifying a microbe that comprises one or more dipicolinic acid (DPA) synthase flavoproteins, a microbe that expresses one or more DPA synthase proteins, and/or a microbe that produces DPA; and selecting the microbe for co-formulation with a carrier or seed; these shared technical features are previously disclosed by Agrinos, as above, in view of the publication entitled 'Detection of Bacterial Endospores in Soil by Terbium Fluorescence' by Ammann, et al. (hereinafter 'Ammann').

Agrinos discloses a method for selecting a microbe for co-formulation with a carrier (nitrogen fixation assay for determining nitrogen metabolism for use in liquid fertilizers comprising nitrogen sources (a method for selecting a microbe for co-formulation with a carrier); page 22, lines 5-17; page 46, lines 12-18) or seed, comprising: identifying a microbe (page 46, lines 12-18); and selecting the microbe for co-formulation with a carrier or seed (only robust nitrogen fixers were scored as positive; page 1, lines 31-35; page 46, lines 12-18; Table 11).

Agrinos does not disclose identifying a microbe that comprises one or more dipicolinic acid (DPA) synthase genes, a microbe that expresses one or more DPA synthase proteins, and/or a microbe that produces DPA.

Ammann discloses identifying a microbe that comprises one or more dipicolinic acid (DPA) synthase genes, a microbe that expresses one or more DPA synthase proteins, and/or a microbe that produces DPA (identifying a microbe that produces DPA; abstract).

It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify the disclosure of Ammann, to include identifying a microbe that produces DPA, as taught by Ammann, in order to provide a microbe for use in a superior co-formulation with a suitable carrier.

Since none of the special technical features of the Groups I and II+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Agrinos and Ammann references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/52 (2006.01)	C 1 2 N 15/52	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 27/62 (2021.01)	G 0 1 N 33/53	Y
C 1 2 R 1/10 (2006.01)	G 0 1 N 33/569	F
C 1 2 R 1/07 (2006.01)	G 0 1 N 27/62	V
C 1 2 R 1/11 (2006.01)	C 1 2 R 1:10	
C 1 2 R 1/125 (2006.01)	C 1 2 R 1:07	
C 1 2 R 1/145 (2006.01)	C 1 2 R 1:11	
C 1 2 R 1/225 (2006.01)	C 1 2 R 1:125	
C 1 2 R 1/01 (2006.01)	C 1 2 R 1:145	
C 1 2 R 1/38 (2006.01)	C 1 2 R 1:225	
C 1 2 R 1/545 (2006.01)	C 1 2 R 1:01	
	C 1 2 R 1:38	
	C 1 2 R 1:545	

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74) 代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72) 発明者 ゴードン, ベンジャミン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 6 1 8, デービス, カスター ブレイス 2 7 9, スイート 1 0 0

(72) 発明者 ケンディルギ, フレデリック

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 6 1 8, デービス, カスター ブレイス 2 7 9, スイート 1 0 0

F ターム(参考) 2G041 CA01 FA10 FA12

4B063 QA08 QA13 QA17 QA18 QQ06 QQ28 QQ42 QQ62 QR08 QR32

QR42 QR75 QS03 QS24 QS34 QS36 QX02

4B065 AA01X AA15X AA17X AA19X AC14 CA11 CA18 CA46 CA47