

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1 Título de la Invención(200 caracteres o espacios máximos)

PROCESO DE PRODUCCION DE BIOMASA Y METABOLITOS DE MICROORGANISMOS DE LA ESPECIE Bacillus sp. Y SUS COMPOSICIONES PARA EL CONTROL BIOLOGICO DE PLAGAS

2 Datos del Solicitante / Titular

Nombre:	UNIVERSIDAD EAFIT	Dirección Electrónica:	patents@olartemoure.com
Dirección:	CARRERA 49 NO 7 SUR 50	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - ANTIOQUIA - MEDELLIN
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☒ NIT		Tipo Empresa: ☐ GRAN EMPRESA ☐ OTRO ☐ MICROEMPRESA ☒ UNIVERSIDADES ☐ MEDIANA EMPRESA ☐ PEQUEÑA EMPRESA ☐ PERSONAL ☐ ENTIDADES DE ANIMO DE LUCRO	
Número:	8909013895-		

3 Solicitantes

	Apellidos - Nombres o Razón Social	Tipo	Identificación
1.	UNIVERSIDAD EAFIT	NI	8909013895
2.	ASOCIACION DE BANANEROS DE COLOMBIA AUGURA	NI	890900746

4	Datos del Inventor			
Nombre:		Isabel Cristina CEBALLOS ROJAS	Dirección Electrónica:	patents@olartemoure.com
Dirección:		Calle 56 # 35A 22 Apto. 501	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - ANTIOQUIA - MEDELLIN
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT ☒ No Aplica Número: -				
5	Inventor(es)			
Apellidos - Nombres		Domicilio		
1.	CEBALLOS ROJAS Isabel Cristina	COLOMBIA		
2.	VILLEGAS ESCOBAR Valeska	COLOMBIA		
3.	MOSQUERA LÓPEZ Sandra	COLOMBIA		
4.	MIRA CASTILLO John Jairo	COLOMBIA		
5.	GUTIERREZ MONSALVE Jaime Andrés	COLOMBIA		
6.	ARROYAVE TORO Juan José	COLOMBIA		
7.	POSADA URIBE Luisa Fernanda	COLOMBIA		
6	Datos Inventor(es)			
País de Residencia		Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	COLOMBIA	ANTIOQUIA	MEDELLIN	Calle 56 # 35A 22 Apto. 501
2.	COLOMBIA	ANTIOQUIA	MEDELLIN	Calle 7 No. 22- 31 Apto. 9804

3.	COLOMBIA	ANTIOQUIA	MEDELLIN	Av. 37 # 75-35 Apto. 1210
4.	COLOMBIA	ANTIOQUIA	MEDELLIN	Calle 3 Sur No. 41-65. Piso 9
5.	COLOMBIA	ANTIOQUIA	ENVIGADO	Calle 40D Sur No. 39-98, Barrio el Dorado, Manzana 6 Apto. 307
6.	COLOMBIA	ANTIOQUIA	MEDELLIN	Calle 6 # 25-112 Apto. 402
7.	COLOMBIA	ANTIOQUIA	MEDELLIN	Calle 30A # 71-23 Belén Rosales

7	Datos del Representante Legal / Apoderado			
Nombre:		CARLOS R. OLARTE GARCIA	Dirección Electrónica:	patents@olartemoure.com
Dirección:		Cra. 5ta No. 34-03	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE Número: 79782747-				

Presentación de Poder	
Año de Radicación	
Número de Radicación	

8	Datos Solicitud: PCT / WO			
Número Solicitud:		PCT/IB2014/061167	Fecha Solicitud:	02/05/2014
Número Publicacion:		WO2014/178032	Fecha Publicacion:	06/11/2014

9	Declaraciones de prioridad	☒ SI ☐ NO		
1.	(33) País de origen ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	Codigo del país US	(31) No. Solicitud 61/819,258	(32) Fecha 03/05/2013

10	Reivindicaciones		
Número reivindicaciones:		28	Pago Reivindicaciones: No
11	Reducción de tasas.		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☒ SI ☐ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☒ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
12	Documentos Anexos		
☒ Reivindicaciones ☒ Descripción ☒ Dibujos y/o Figuras ☒ Resumen ☐ Certificado Depósito Material Biológico ☐ Uso de Conocimiento tradicional ☐ Listado de secuencias ☐ Artes finales 12 x 12 cm ☐ Poderes, si fuere el caso ☒ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad ☒ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad ☒ Otros Anexos			

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
FORMULARIO DE REDUCCIÓN DE TASAS

1. Identificación del Trámite

☒ PATENTE DE INVENCION	☐ PATENTE DE MODELO DE UTILIDAD
☐ Examen de Patentabilidad	☐ Tasas de Mantenimiento

2. BENEFICIARIO

Nombre: UNIVERSIDAD EAFIT
Dirección: Carrera 49 No 7 Sur 50 Medellín
Teléfono: _____
Nacionalidad o Domicilio: Colombia
Ciudad: Medellin

IDENTIFICACIÓN

☐ C.C.	☒ NIT
☐ C.E.	☐ Otro
<u>890.901.389-5</u>	

En caso de ser una persona natural y carecer de medios económicos y por tanto lo aplique la reducción de tasas a la que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

3. Anexos

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☐

UNIVERSIDAD EAFIT

Nombre o denominación / Nombre ó razón social

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: C.C. ☐ C.E. ☐ NIT. ☐ Otro ☐ Número: 890.901.389-5

Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004	Universidades públicas o privadas ☐ Universidad pública ☐ Universidad privada Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación.	Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar
--	--	---

Nacionalidad/País de constitución COLOMBIANA	Dirección y domicilio del titular Carrera 5 No. 34-03		
Dirección electrónica office@olartemoure.com	No. Fax 601-7799	Número telefónico 601-7700	

4. Firma

CARLOS R. OLARTE

Nombre del Firmante

Firma

C.C 79.782.747 Btá

Tarjeta Profesional 74.295

PROCESO DE PRODUCCION DE BIOMASA Y METABOLITOS DE MICROORGANISMOS DE LA ESPECIE *Bacillus* sp. Y SUS COMPOSICIONES PARA EL CONTROL BIOLOGICO DE PLAGAS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un proceso para de producción de biomasa y metabolitos de microorganismos de la especie *Bacillus* sp, entre ellos *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*. El proceso incluye un medio de cultivo adecuado y unas condiciones ambientales específicas que permiten obtener una gran cantidad de biomasa y metabolitos de la familia de fengicinas, surfactinas e iturinas, los cuales exhiben actividad antifúngica y antibacteriana contra diversos agentes fitopatógenos.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Entre los microorganismos para control biológico, las bacterias del género *Bacillus* sp. han recibido mucha atención por la gran variedad de compuestos antibióticos que producen, su larga vida en anaquel, su rápido crecimiento en cultivos y su capacidad para colonizar superficies foliares [1, 2, 3, 4]. Particularmente, ciertas especies de *Bacillus* tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus anthracis* y *Bacillus thurigiensis* presentan actividad antimicrobiana [4].

La actividad antimicrobiana de estas bacterias se debe a su capacidad de producir lipopéptidos de la familia de las surfactinas, iturinas y fengicinas [5, 6, 7] las cuales difieren en la secuencia de aminoácidos y la ramificación de la cadena del ácido graso. Las surfactinas exhiben un alto poder antibacteriano, en tanto que las iturinas y fengicinas han sido reconocidas por su actividad antifúngica [4].

En el estado de la técnica se describe el uso de *B. subtilis* y *B. amiloquefacences* para controlar diversos microorganismos causantes de enfermedades en una amplia variedad de cultivos, entre los que se encuentran cultivos de frutas y hortalizas tales como mora, uva, frambuesa, fresa, tomates, pepino, pimienta, naranja, melón, manzana, durazno, chirimoya, banano, papaya, mango y kiwi.

El documento EP2311936 divulga una cepa de *B. subtilis* KS1 (NITE BP-569) como agente de control biológico para contrarrestar varios microorganismos fitopatógenos en cultivos de uva. El documento WO 98/21968 describe un antibiótico producido por *B. subtilis* AQ153 (ATCC 55614) efectivo contra infecciones bacterianas y fúngicas así como un método para la protección de plantas que comprende la aplicación de dichos compuestos antibióticos.

Los documentos WO9850422 y WO0029426 divulgan otros compuestos antibióticos producidos por la cepa de *B. subtilis* AQ713 (NRRL B21661) y sus mutantes, los cuales exhiben actividad insecticida, antifúngica y antibacterial. El documento WO9909819 divulga antibióticos de una cepa de *B. subtilis* AQ 713 (NRRL N° 21665) que produce metabolitos con actividad pesticida y un metabolito de alto peso molecular, soluble en agua, que exhibe actividad insecticida y nematicida contra el gusano de la raíz del maíz y otros nematodos.

El documento US2011/0318386 describe métodos para inducir resistencia sistémica contra diversos patógenos mediante el uso de controladores biológicos del género *Bacillus*, específicamente de la especie *B. mojavensis* aislado 203-7 y *B. mycoides* aislado. Por su parte, el documento ES 2345969 describe un preparado fitofortificante para aplicación en pseudotallos de plataneras y bananos que incluye *B. subtilis*, *Trichoderma viride* y *B. megaterium* var *phosphaticum*.

El documento US2012/00031999 divulga una estrategia de control para diferentes enfermedades de origen fúngico, entre ellas la Sigatoka negra en banano, basada en la

aplicación de fungicidas sintéticos con algunos microorganismos de control biológico y sus metabolitos (específicamente la cepa *B. subtilis* QST 713 correspondiente a la cepa del producto comercial Serenade®).

En los procesos de producción de microorganismos de la especie *Bacillus* sp divulgados en el estado del arte, la cantidad de biomasa obtenida es muy escasa, ya que por lo general la densidad celular obtenida no supera los 5,0 g/L [8, 9], por lo que se hace necesario desarrollar nuevos procesos para incrementar la producción de biomasa y la de sus metabolitos activos.

De igual forma, es necesario desarrollar composiciones biocidas a partir de dichos microorganismos y/o sus metabolitos con actividad biológica que tengan una mayor eficacia y selectividad para el control de diversos agentes fitopatógenos en una gran variedad de cultivos.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención permite solucionar éstos y otros inconvenientes ya que comprende un proceso para incrementar la producción de biomasa de microorganismos del género *Bacillus*, entre ellos *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959, así como la de sus metabolitos biológicamente activos, tales como lipopéptidos de la familia de las surfactinas, iturinas y fengicinas.

Adicionalmente, la presente invención comprende composiciones agroquímicas que comprenden microorganismos de la especie *Bacillus*, entre ellos, *Bacillus subtilis* EA-CB0015, *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 y/o sus metabolitos activos, bien sea solos o en combinación con agentes biocidas, para el control de agentes fitopatógenos tales como *Mycosphaerella fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum sp.*, *Monilia sp.*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*.

La presente invención también está dirigida al uso de microorganismos de la especie *Bacillus*, entre ellos *B. subtilis* EA-CB0015, *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 y/o de sus metabolitos activos y de las composiciones agroquímicas que los contienen, para inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos, tales como *Mycosphaerella fijiensis* en cultivos agrícolas.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Estructura de las fengicinas C producidas por *Bacillus subtilis* EA-CB0015.

FIG. 2. Densidad celular de *B. subtilis* EA-CB0015 en diferentes medios de cultivo.

FIG. 3. Cromatograma HPLC de los compuestos de *Bacillus subtilis* EA-CB0015.

FIG. 4. Espectro MS/MS del lipopéptido purificado P5 (m/z 1429.9) de *B. subtilis* EA-CB0015.

FIG. 5. Espectro MS/MS del lipopéptido purificado P5 después (m/z 1447.8) de la hidrólisis alcalina del anillo lactona de *B. subtilis* EA-CB0015.

FIG. 6. Área bajo la curva de los lipopéptidos producidos por *B. subtilis* EA-CB0015 en diferentes medios de cultivo.

FIG. 7. Porcentajes de inhibición generados por *B. subtilis* EA-CB0015 sobre diferentes microorganismos fitopatógenos.

FIG. 8. Porcentajes de inhibición generados por el SLC de *B. subtilis* EA-CB0015 obtenidos en diferentes medios de cultivo sobre *M. fijiensis*.

FIG. 9. Viabilidad de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 contenido en diferentes composiciones de la invención

FIG. 10. Grado de severidad de la Sigatoka negra en plantas de banano tratadas con diferentes composiciones de la invención a nivel de invernadero.

FIG. 11. Porcentaje de área necrosada causada por la Sigatoka negra en hojas de banano tratadas con diferentes composiciones de la invención.

FIG. 12. Efecto de diferentes adyuvantes protectores UV sobre la viabilidad de *B. subtilis* EA-CB0015.

FIG. 13. Efecto de diferentes adyuvantes sobre la adherencia de las composiciones (MH₂O y P2) con base en *B. subtilis* EA-CB0015.

FIG. 14. Efecto de la composición mezcla base agua con base en *B. subtilis* EA-CB0015 sobre el porcentaje de área necrosada de las hojas de banano a nivel de invernadero.

FIG. 15. Fotografías de las hojas de banano afectadas por la enfermedad de la Sigatoka negra después de tratadas con diferentes productos.

FIG. 16. Efecto de la composición base agua de *B. subtilis* EA-CB0015 sobre la severidad de la Sigatoka negra en banano en campo.

FIG. 17. Efecto de *B. subtilis* EA-CB0015 sobre la severidad de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* EAHP-009 en pompones.

FIG. 18. Efecto de *B. subtilis* EA-CB0015 sobre *Colletotrichum* sp. en Tomate de Árbol (*Cyphomandra betacea*).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Para incrementar la producción de biomasa de microorganismos de la especie *Bacillus* sp y de sus metabolitos (lipopéptidos), se debe cultivar el microorganismo en un medio de cultivo adecuado y bajo condiciones ambientales necesarias para incrementar la producción de biomasa y de sus metabolitos. Para ello, se prepara un medio de cultivo (en adelante medio D) que comprende uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste de carbohidratos, extracto de levadura, sulfato de amonio, peptona, sales que contengan magnesio, azufre, manganeso, cloro, potasio, fósforo, calcio, y sodio bien sea en una matriz sólida, semisólida o líquida.

Las condiciones ambientales necesarias para llevar a cabo el proceso de la invención incluyen temperatura, pH, velocidad de agitación, tiempo de fermentación y aireación. El proceso de la presente invención se puede llevar a cabo a pequeña escala en el laboratorio o a gran escala en un biorreactor.

En una modalidad preferida, el medio D comprende, en porcentajes p/v, entre 3,2% y 3,4% de glucosa, entre 3,1% y 3,3% de extracto de levadura, entre $2,5 \times 10^{-3}\%$ y $4,5 \times 10^{-3}\%$ de sulfato de manganeso, entre $2 \times 10^{-3}\%$ y $4 \times 10^{-3}\%$ de cloruro de calcio, entre 0,08% y 0,12% de sulfato de amonio, entre 0,35% y 0,45% de sulfato de magnesio, entre 0,04% y 0,12% de fosfato disódico de potasio y entre 0,04% y 0,12% de fosfato monosódico de potasio.

En otra modalidad aún más preferida de la invención, el medio de cultivo D comprende, en porcentajes p/v, 3,34% de glucosa, 3,25% de extracto de levadura, $4,2 \times 10^{-3}\%$ de sulfato de manganeso, $3,1 \times 10^{-3}\%$ de cloruro de calcio, 0,1% de sulfato de amonio, 0,4% de sulfato de magnesio, 0,05% de fosfato disódico de potasio, 0,05% de fosfato monosódico de potasio.

En una modalidad preferida del proceso de la invención, el microorganismo se incuba durante un tiempo entre 24 y 96 horas con una velocidad de agitación entre 400 y 600 rpm, aireación entre 1 y 5 vvm, a una temperatura entre 20°C y 40°C y pH entre 5,5 y 7,5. Para controlar

y/o ajustar el pH se pueden emplear ácidos fuertes como ácido sulfúrico y/o bases fuertes como hidróxido de sodio. Se pueden adicionar también tensioactivos y antiespumantes para controlar la formación de espuma.

El proceso llevado a cabo bajo las condiciones anteriormente indicadas, permite incrementar la obtención de biomasa y metabolitos activos del microorganismo de la especie *Bacillus* sp. La biomasa obtenida mediante el proceso de la presente invención se puede separar del medio de cultivo utilizando métodos convencionales de centrifugación o microfiltración, en tanto que los metabolitos activos se pueden extraer mediante procedimientos de extracción con solventes, precipitación, adsorción o cromatografía.

En una modalidad preferida de la invención, la cantidad de biomasa de microorganismos de la especie *Bacillus* sp. obtenida puede ser de 3,0 hasta 20,0 g/L, preferiblemente entre 7,0 y 18,0 g/L en tanto que la concentración de metabolitos está entre 300 y 1500 mg/L, preferiblemente entre 500 y 1000 mg/L.

En una modalidad preferida, el proceso de la invención permite incrementar la producción de biomasa y metabolitos activos de *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959. La identificación por medio del análisis 16S rDNA permitió establecer que el *B. subtilis* EA-CB0015 corresponde con la secuencia SEQ ID NO:1, la cual está depositada en el GenBank con número de acceso KC006063.

Entre los metabolitos de *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 obtenidos mediante el proceso de la invención se encuentran lipopéptidos tipo surfactinas, iturinas y fengicinas. El análisis mediante técnicas cromatográficas y espectrometría de masas identificó una nueva isoforma de fengicinas producida por *B. subtilis* EA-CB0015, denominada fengicinas C, cuya secuencia de aminoácidos es (Glu1-Orn2-Tyr3-Thr4-Glu5-Val6-Pro7-Gln8-Thr9-Ile10), la cual difiere de la secuencia de las fengicinas B en la posición 9 y de la secuencia de las fengicinas A en las posiciones 6 y 9.

Adicionalmente, siguiendo el procedimiento de la invención para *B. subtilis* EA-CB0015, se pueden obtener 14 diferentes homólogos de fengicina C con fórmula general R-Glu1-Orn2-Tyr3-Thr4-Glu5-Val6-Pro7-Gln8-Thr9-Ile10, los cuales varían según el tamaño de su cadena hidrocarbonada (R) que puede ser saturada o insaturada de 14 a 18 carbonos. La estructura de las diferentes fengicinas producidas por *B. subtilis* EA-CB0015 mediante el proceso de la invención se ilustran en la FIG 1.

Los diferentes homólogos de fengicinas C, así como las surfactinas e iturinas se pueden separar por técnicas convencionales como cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Las surfactinas producidas corresponden a diferentes homólogos de longitud de cadena hidrocarbonada entre 13 y 16 carbonos y las iturinas corresponden a las iturinas A de 14 y 15 carbonos.

Para el caso de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959, los metabolitos producidos mediante el proceso de la invención corresponden a diferentes homólogos de surfactina (C12 a C15), dos homólogos de iturina A (C14 y C15) y dos isoformas de fengicinas (A y B) con 4 homólogos para la fengicina A (C14, C15, C16 y C17) y 2 homólogos de fengicina B (C16 y C17).

En un aspecto adicional de la invención, la biomasa de *B. subtilis* EA-CB0015 o la biomasa de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 obtenida mediante el proceso de la presente invención, inhibe el crecimiento de diversos fitopatógenos tales como *Mycosphaerella fijiensis*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, y *Colletotrichum sp.* La inhibición se puede determinar mediante técnicas como la de platos duales, la cual consiste en comparar el crecimiento de los fitopatógenos al cultivarlos en un medio con y sin la presencia de las sustancias activas a evaluar. Los porcentajes de inhibición *in vitro* determinados siempre son superiores al 50%.

Una vez realizado el procedimiento de la presente invención, se pueden preparar diferentes composiciones o formulaciones a partir de la biomasa y/o metabolitos obtenidos para obtener composiciones biocidas fisicoquímicamente estables que garanticen la viabilidad

del microorganismo y la actividad de los metabolitos en la composición durante largos periodos de tiempo.

Las composiciones se pueden preparar en un recipiente adecuado hermético para evitar contaminación. Allí se dispone de la biomasa y/o sus metabolitos, se agregan los adyuvantes y demás ingredientes hasta obtener una mezcla homogénea. El producto final así obtenido se puede disponer en envases adecuados y almacenarlo a temperatura ambiente.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a composiciones biocidas que comprenden *B. subtilis* EA-CB0015, *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 y/o sus metabolitos activos bien sea de manera individual, combinados o en asociación con otros agentes activos para potenciar la actividad biológica. Las composiciones biocidas de la presente invención pueden contener uno o más coadyuvantes y un vehículo agroquímicamente aceptable.

En una modalidad preferida, las composiciones biocidas de la presente invención comprenden entre el 80,0 y el 99,9% p/p de una suspensión acuosa de *B. subtilis* EA-CB0015 a una concentración de 1×10^7 a 1×10^{11} UFC/mL junto con una mezcla compuesta de 2,0% a 4,0% p/v de carboximetil celulosa sódica (CMC), 1,0% a 5,0% v/v de buffer de fosfatos 3M (pH 5,0), 1,0% a 4,0% v/v de glicerol, 0,25% a 0,75% v/v de tween 20®, 0,25% a 0,75% v/v de Triton X-100®, 0,01% a 1,0% v/v de sorbato de potasio, 0,05% a 0,15% p/v de goma xanthan, 0,2% a 1,5 % p/v de leche descremada y 0,028% a 1,0% p/v de TiO₂. Esta composición es de coloración blanca, tiene un pH de 4,0 a 6,5 y una viscosidad de 20 a 80 cp.

En una modalidad preferida adicional, las composiciones biocidas de la invención comprenden adicionalmente plaguicidas químicos, entre ellos, anilino pirimidinas, bitartenoles, esteroides, difeconazol, tebuconazol, epoxiconazole, mancozeb, clorotolonil y otros agentes para el control biológico de plagas, junto con uno o más coadyuvantes en un vehículo agroquímicamente aceptable.

En un aspecto adicional, la presente invención está dirigida al uso de microorganismos de la especie *Bacillus* sp., particularmente de *B. subtilis* EA-CB0015, *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 y/o sus metabolitos así como de sus composiciones biocidas para inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos tales como *Mycosphaella fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinérea*, *Colletotrichum* sp., *Monilia* sp. *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* en cultivos agrícolas.

En un aspecto adicional, la presente invención está dirigida a un método para el tratamiento de plantas contra infecciones causadas por diferentes fitopatógenos, el cual comprende la aplicación a la planta de una cantidad efectiva de un microorganismo de la especie *Bacillus* sp, particularmente *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 y/o sus metabolitos, o la aplicación de composiciones biocidas que los contienen bien sea cada uno de manera individual o en combinación con otros agentes biocidas.

La aplicación se puede hacer por aspersión en dosis que van desde 0,1 hasta 10 litros por hectárea (L/ha) en mezcla con un vehículo apropiado o mezclado con otras composiciones que contengan uno o más plaguicidas.

Los siguientes Ejemplos ilustran con mayor detalle la invención, sin estar el concepto inventivo restringido a los mismos.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1. Obtención de *Bacillus* sp.

Se obtuvieron cepas de *Bacillus* sp. a partir de los cultivares cv. Gran enano y cv. Valery, ambos de banano, y cv. Hartón de plátano. Para cada cultivar se seleccionó una plantación en la que se establecieron cinco puntos para recolectar muestras compuestas de tres plantas antes de floración, utilizando un muestreo probabilístico aleatorio sin reposición. El muestreo se realizó en las hojas número 2, 5 y 10 de cada una de las plantas y cada hoja fue cuarteada para seleccionar una zona del ápice y otra de la base.

El aislamiento de bacterias se realizó lavando con un buffer de fosfato de sodio más Tween 80® y sonicación de las muestras. Se efectuaron diluciones seriadas y se sembraron por superficie en TSA (Agar Tripticasa de Soya, Merck al 10%). Las bacterias Gram positivas fueron purificadas, cultivadas en el medio Finley y Field's (150 rpm, 4 días, 30 °C) y sometidas a choque térmico (80 °C, 20 min). Todas las BAFEs (Bacterias Aeróbicas Formadoras de Endosporas) fueron conservadas en TSB (Caldo Tripticasa de Soya, Merck) y glicerol (20% v/v) a -80°C y activadas en TSA al 50% previo a cualquier uso experimental.

EJEMPLO 2. Obtención de biomasa de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y de *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959,

La cepa de *B. subtilis* EA-CB0015 se replicó en TSA al 50% y se incubó durante 48 horas a 30°C. Una colonia de la cepa se inoculó en el medio de cultivo D y se incubó por 12 horas a 30°C y 200 rpm. Este cultivo se empleó como preinóculo. La fermentación se realizó en matraces de 50 mL con 10 mL de medio de cultivo D a una temperatura de 30°C y 200 rpm en un agitador orbital. Cada Erlenmeyer se inoculó con 1 mL de una suspensión bacteriana ajustada a una DO₆₀₀ de 1 y obtenida al cabo de 12 horas de crecimiento. Se obtuvieron densidades celulares de hasta $13,2 \pm 1,7$ g/L de *B. subtilis* EA-CB0015.

Para determinar el rendimiento del proceso en la obtención de biomasa de *B. subtilis* EA-CB0015, se comparó la cantidad de biomasa obtenida al emplear el medio de cultivo de la invención (medio D) con la cantidad de biomasa obtenida al emplear los medios de cultivo CIB, MOLP, Finley and Field's y TSB.

La densidad celular obtenida con el medio de cultivo de la invención fue 29,3 veces superior a la obtenida con el medio Finley and Field's ($0,6 \pm 0,1$ g/L), 4,5 veces superior a la obtenida con el medio TSB ($2,95 \pm 0,4$ g/L), 3,6 veces superior a la obtenida con el medio CIB ($3,65 \pm 0,8$ g/L) y 3,2 veces superior a la obtenida con el medio MOLP ($4,1 \pm 0,6$ g/L), como se ilustra en la FIG 2.

Siguiendo el mismo procedimiento, se obtuvo biomasa de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959. Al igual que para *B. subtilis* EA-CB0015, la cantidad de biomasa obtenida al emplear el medio de cultivo de la invención (medio D) fue superior a la obtenida con los medios de cultivo MOLP y TSB. Se obtuvieron densidades celulares entre 8,0 y 10,0 g/L con el medio de la invención.

EJEMPLO 3. Extracción y determinación de los metabolitos activos de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959

A partir del cultivo de *B. subtilis* EA-CB0015 obtenido de acuerdo al Ejemplo 2, se realizó un proceso de extracción con solventes de sus metabolitos activos con metanol. Posteriormente se realizó una extracción en fase sólida (SPE) con metanol como solvente orgánico y las fracciones activas fueron purificadas por HPLC en fase reversa con detector UV a una longitud de onda de 214 nm. En la FIG. 2 se ilustra los respectivos Cromatogramas. Los picos eluidos entre el minuto 16 y 19 corresponden a las Iturinas A (FIG. 3A) y los picos P1 a P14 (FIG 3B) corresponden a las fengicinas C, en tanto que los picos P15 a P19 (FIG 2B) corresponden a las surfactinas.

Algunos de los metabolitos activos también se identificaron por ESI-MS/MS (espectrometría de masas por electrospray), tal como se ilustra en las FIGS 4 y 5:

Para determinar el rendimiento del proceso en la obtención de los dos grupos de metabolitos activos de *B. subtilis* EA-CB0015, se comparó la cantidad de metabolitos obtenida al emplear el medio de cultivo de la invención (medio D) con la cantidad de metabolitos obtenida al emplear los medios de cultivo CIB, MOLP, Finley and Field's y TSB. Las áreas de los picos y por ende la cantidad de metabolitos obtenidos, fueron superiores al emplear en el proceso el medio de cultivo D de la invención como se ilustra en la FIG. 6.

Siguiendo con el mismo procedimiento de extracción y purificación por HPLC indicado anteriormente, se identificaron los metabolitos producidos por la cepa *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 los cuales corresponden a diferentes homólogos de surfactina (C12 a C15), dos homólogos de iturina A (C14 y C15) y dos isoformas de fengicinas (A y B) con 4 homólogos para la fengicina A (C14, C15, C16 y C17) y 2 homólogos de fengicina B (C16 y C17).

EJEMPLO 4. Evaluación de la actividad de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 contra microorganismos fitopatógenos

La evaluación de la actividad antifúngica se realizó mediante el método del anillo. Para ello se realizó una impresión circular (6 cm de diámetro) del *B. subtilis* EA-CB0015 en una caja petri (9 cm de diámetro) con PDA y posteriormente se colocó un disco de 5 mm de diámetro del hongo (crecido durante 10 días) en el centro de la misma. Se utilizaron como control absoluto cajas de petri inoculadas únicamente con discos del hongo y en el momento que alcanzó un crecimiento igual al diámetro del círculo formado por la bacteria, se midió el crecimiento radial del micelio.

El diseño de experimentos fue un diseño unifactorial completamente aleatorio con tres réplicas por tratamiento. La variable de respuesta determinada fue el porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio el cual se calculó considerando el crecimiento del control absoluto como 100%.

Como se puede observar en la FIG. 7, los porcentaje de inhibición generados por *B. subtilis* EA-CB0015 estuvieron entre un 20% para *Pestalotia* sp y un 80% para *Moniliophthora roreri*.

Adicionalmente *B. subtilis* EA-CB0015 exhibe actividad antibacteriana contra varios microorganismos, entre ellos, *Ralstonia solanacearum*, generando halos de inhibición hasta de 6 milímetros en medio de cultivo BGTA. Las pruebas de antagonismo cuantitativas contra

R. solanacearum se realizaron sembrando por superficie 100 µL de una suspensión de *R. solanacearum* ajustada a 10⁶ UFC/mL en agar BGTA. Luego, se colocaron discos de TSA (5 mm) de *B. subtilis* EA-CB0015 de 48 horas de incubación a 30°C. Finalmente, transcurridas 72 horas se determinó el halo de inhibición generado.

Con la misma metodología descrita anteriormente, se evaluó la actividad de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 contra *F. oxysporum*, *M. fijiensis* y *R. solanacearum*, con porcentajes de inhibición de 58,5%, 76,0% y un radio de inhibición de 10,9 mm respectivamente.

EJEMPLO 5. Evaluación de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 contra *Mycosphaerella fijiensis*

Para la selección de antagonistas se realizó un tamizaje inicial utilizando la técnica de microplatos, empleando la metodología modificada de Peláez 2006 [10]. Se determinó de una forma rápida cuales de los sobrenadantes libres de células (SLC) de las BAFes aisladas generaron inhibición en el crecimiento del micelio de *Mycosphaerella fijiensis* al incubarse en medio líquido.

Para la evaluación se emplearon las cepas del hongo *M. fijiensis* EASGK09, *M. fijiensis* EASGK10, *M. fijiensis* EASGK11 y *M. fijiensis* EASGK14 aisladas de las hojas de banano cv. Gran Enano y se siguió la metodología de Dupont, 1982 [11]. Como control positivo se utilizaron los SLC de *B. subtilis* UA321 y como control absoluto se empleó caldo fresco estéril.

La prueba de platos duales se realizó con la metodología modificada de Riveros [12]. Se evaluó el porcentaje de inhibición de crecimiento de las colonias del hongo sobre PDA (Merck, suplementado con cloranfenicol: 200 ppm y ampicilina: 250 ppm). Las pruebas de inhibición del tubo germinativo se realizaron con la técnica modificada del esmalte descrita por Talavera [13].

Se evaluó la inhibición en el crecimiento del tubo germinativo de las ascosporas del hongo descargadas sobre discos de hoja de Banano cv. Gran Enano sumergida previamente en los SLC. El porcentaje de inhibición del tubo germinativo se determinó considerando la germinación de las esporas del control absoluto como 100%.

Las bacterias seleccionadas como antagonistas fueron aquellas cuyos SLC presentaron porcentajes de inhibición en el crecimiento de *M. fijiensis* mayores que el control positivo *B. subtilis* UA321. Este proceso inicial de selección se llevó a cabo con 648 BAFEs. A las BAFEs seleccionadas como antagonistas de *M. fijiensis* se les repitió la prueba de microplatos y se les realizaron las pruebas de platos duales e inhibición de ascosporas, empleando los SLC obtenidos de una fermentación en medio de cultivo MOLP [14]. Para estos ensayos, se utilizó la cepa *M. fijiensis* EASGK14 y los mismos controles del tamizaje inicial.

Finalmente, a las BAFEs antagonistas de *M. fijiensis* se les realizaron tres pruebas adicionales contra el hongo: microplatos con el medio MOLP, platos duales e inhibición de ascosporas y se realizó un promedio ponderado de las tres pruebas, dándole un peso de 60%, 20% y 20% a las pruebas de ascosporas, platos duales y microplatos respectivamente.

El mayor peso adjudicado a la prueba de ascosporas se relaciona con la importancia de atacar el hongo antes de penetrar los estomas de la hoja. Los porcentajes de inhibición en el crecimiento del micelio y en la germinación de las ascosporas de *M. fijiensis* generados por *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 *in vitro* se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Porcentajes de inhibición generados por *Bacillus* sp. contra *M. fijiensis*

Microorganismo	Inhibición del crecimiento del micelio /Técnica:		Inhibición en la germinación de ascosporas ^c	Promedio ponderado de las tres pruebas ^d
	Microplatos en MOLP (%) ^a	Platos duales (%) ^b		

<i>B. subtilis</i> EA-CB0015	89 ± 1	78 ± 1	98 ± 1	92
<i>B. amyloliquefaciens</i> EA-CB0959	89±0	62±2	77±0	76

^a Inhibición de crecimiento del micelio de *M. fijiensis* por la técnica de microplatos con caldo MOLP con 2 réplicas y 4 repeticiones por tratamiento del experimento realizado 2 veces en el tiempo.

^b Inhibición de crecimiento del micelio de *M. fijiensis* por la técnica de platos duales en PDA con 2 réplicas y 30 repeticiones por tratamiento del experimento realizado 2 veces en el tiempo.

^c Inhibición de la germinación de las ascosporas de *M. fijiensis* con dos réplicas por tratamiento.

^d Promedio de las tres pruebas de antagonismo: ascosporas (60%), microplatos (20%) y platos duales (20%).

El porcentaje de inhibición en el crecimiento de *M. fijiensis* obtenidos con los SLC de *B. subtilis* EA-CB0015 del medio D fue 1,5 veces superior a la obtenida con el medio CIB ($53,0 \pm 4,0$ %), 80,9 veces superior a la obtenida con el medio Finley and Field's ($1,0 \pm 1,6$ %) (FIG. 8). Los porcentajes de inhibición en el crecimiento de *M. fijiensis* obtenidos con los SLC de los medios Molp y TSB fueron estadísticamente similares al obtenido con el medio D.

La inhibición *in vitro* del crecimiento de *M. fijiensis* por los SLC de las BAFEs aisladas sugieren una afectación a las estructuras celulares del hongo. Por esta razón se evaluó la presencia de cambios morfológicos en el micelio y las ascosporas de *M. fijiensis* por microscopía óptica.

Se observó que los SLC de todas las bacterias antagonistas produjeron cambios morfológicos evidenciados por abultamientos en las hifas del micelio e inhibiciones en la germinación del tubo de las ascosporas en comparación con el control absoluto.

EJEMPLO 6. Composiciones biocidas que comprenden *Bacillus subtilis* EA-CB0015

Para el desarrollo de las composiciones biocidas de la invención se realizó una selección previa de los adyuvantes y se determinaron las combinaciones que generaran las mezclas más estables y las proporciones de cada uno de los componentes en la mezcla, evaluando aspectos como la aparición de fases y presencia de precipitados. Los ayudantes seleccionados y sus funciones se ilustran en la Tabla 2.

Tabla 2. Adyuvantes de las diferentes composiciones.

Ayudante ^a	Producto ^b	Formulación ^c	Función ^d
Aceite	Aceite de girasol	EM; BA	Da cuerpo a la formulación. Evita disecación del microorganismo.
	Aceite de soya	EM; BA	
	Aceite de canola	EM; BA	
Surfactante	Tween 20	EM; MH2O	Mejora la cobertura de la superficie hidrofóbica de la planta.
	Tween 80	EM; MH2O	Facilitar la mezcla de las esporas hidrofóbicas con el agua.
	Triton x-100	EM; MH2O	Facilitar la mezcla de las esporas hidrofóbicas con el agua.
Adherente	Goma xhantan	MH2O; EM	Mejora la adherencia del microorganismo sobre la superficie de la hoja. Estabilizar la mezcla.
Dispersante	Alginato de sodio	MH2O	Neutralizar interacciones entre partículas similares logrando una suspensión uniforme. Asegurar la liberación del microorganismo después de la aplicación
	Veguum	MH2O	
	Carboximetil celulosa (CMC)	MH2O	
Humectante	Glicerol	MH2O	Aumenta el contenido de humedad del producto mediante la absorción de agua del aire. Evitar disecación del microorganismo.
Antimicrobiano	Ácido propiónico	MH2O; EM	Evita degradación del producto por contaminación

^a Grupo de ayudantes necesarios para la mezcla.

^b Ayudantes seleccionados para la evaluación.

^c Composición de la cual hacen parte. EM: Emulsión, BA: Composición en base aceite, MH2O: Mezcla base agua.

^d Función que tiene cada ayudante dentro de la mezcla.

Para la composición en forma de emulsión, se determinó la mejor combinación de aceite y surfactante, para lo que se empleó un diseño factorial 3 x 2 (factores: tipo de aceite y tipo de emulsión, con tres niveles cada uno), la proporción en la que se evaluaron los componentes fue constante: 20 mL aceite, 1 µmol surfactante y 80 mL de agua.

Una vez seleccionado el surfactante y tipo de aceite se realizó un diseño de mezclas ternario con punto al centro con el fin de determinar en qué proporción debía agregarse el aceite de girasol, el surfactante y un dispersante (goma xhantan) para obtener una emulsión altamente estable.

Los rangos evaluados fueron 0,3 a 1,0%, 0,0 a 5,0%, y 14,0 a 19,6% para la goma xhantan, el surfactante y el aceite respectivamente. Las proporciones fueron seleccionadas según lo

reportado por Burges (1998) y Brar y colaboradores (2006) [15, 16]. A las mezclas adicional a los componente evaluados, se les adicionó un buffer de fosfatos 3M de pH 5,0 (3%) para contrarrestar los cambios drásticos del pH al adicionar los ayudantes, ácido propiónico (0,5%) como agente antimicrobiano y agua c.s.p 100%.

Para la mezcla con base agua se determinó cuál de las combinaciones de dispersante, surfactante y adherente era las más estables empleando un diseño factorial fraccionado con el que se obtenían ocho mezclas, las mezclas evaluadas en el diseño fraccionado para la selección de ayudantes de la mezcla base agua se presentan en la Tabla 3. El porcentaje restante fue completado con agua.

Tabla 3. Mezclas evaluadas en el diseño fraccionado para la selección de adyuvantes de la composición mezcla base agua (MH₂O)

Mezcla	A (goma X)	B (CMC)	C (veggum)	AB (alginato)	AC (tween 20)	BC (tween 80)	ABC (triton X-100)
1	-	-	-	+	+	+	-
2	+	-	-	-	-	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	-	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	+
6	+	-	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+
- ^a	0,1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
+ ^b	0,5%	1,25%	1,25%	1,25%	2,50%	2,50%	2,50%

^a Nivel mínimo en la que se evalúa cada factor.

^b Nivel máximo en el que se evalúa cada factor

* Los signos + y - denotan el nivel en el que cada factor se evalúa en la mezcla.

La mezcla 3 fue seleccionada como la más estable y fue sometida a un diseño de mezclas ternario con punto al centro con el fin de determinar las proporciones del CMC, el Tween 20® y el Triton X-100®. Los rangos evaluados fueron 0,5% al 3,5% para los tres componentes evaluados, los rangos fueron determinados según reportes de Burges (1998) y de Brar y colaboradores (2006) [16, 15].

La concentración de la goma xhantan se dejó constante en el nivel más bajo (0,1%) evaluado en el diseño factorial fraccionado ya que todas las mezclas que se presentaron estables contenían este aditivo en dicha concentración. A las mezclas del diseño de mezclas, adicional a los componente evaluados, se les agrego buffer fosfato 3M pH 5,0 (3%) para contrarrestar los cambios drásticos del pH al adicionar los ayudantes, ácido propiónico (0,5%) como agente antimicrobiano [15] y agua c.s.p 100%.

Las mezclas con mayor estabilidad en el tiempo para la emulsión y la mezcla base agua fueron seleccionadas. La proporción de agua fue remplazada por cultivo bacteriano de *B. subtilis* EA-CB0015, cuya concentración bacteriana final se ajustó a $2 \pm x 10^8$ UFC/mL.

Adicional a las dos composiciones mencionadas anteriormente, se evaluaron suspensiones bacterianas (SB) que consistían únicamente del cultivo bacteriano obtenido después de las 72 horas de fermentación acondicionados con buffer fosfato 3M pH5 (3M K₂HPO₄, 3M KH₂PO₄) (3%) y ácido propiónico (0,5%). Las composiciones de las diferentes formulaciones evaluadas con *B. subtilis* EA-CB0015 se ilustran en la Tabla 4.

Tabla 4. Composiciones de diferentes formulaciones con base en *Bacillus subtilis* EA-CB0015.

FORMULACIÓN	SIGLA	COMPOSICIÓN
Suspensión bacteriana	SB	Cultivo bacteriano (94,25% v/v-98,75% v/v), buffer fosfato 3 M pH 5 (1% v/v-5% v/v), y ácido propiónico (0,25% v/v-0,75% v/v v/v)

Composición base agua	MH ₂ O	Cultivo bacteriano (86,6% v/v-93,2% v/v), carboximetil celulosa de sodio CMC (2% w/v-4% w/v), buffer fosfato 3 M pH 5 (1% v/v-5% v/v), glicerol (1% v/v-4% v/v), Tween 20® (0,25% v/v-0,75% v/v), triton X-100 (0,25% v/v-0,75% v/v), ácido propiónico (0,25% v/v-0,75% v/v) y goma xanthan (0,05% w/v-0,15% w/v).
Composición base emulsión	EM	Cultivo bacteriano (71,4% w/v-83,6% v/v), aceite de girasol (14% v/v-18% v/v), buffer fosfato 3 M pH 5 (1% v/v-5% v/v), Tween 80® (1% v/v-4% v/v), goma xanthan (0,2% w/v-0,9% w/v) y ácido propiónico (0,25% v/v-0,75% v/v)

EJEMPLO 7. Evaluación de las composiciones biocidas de la invención

Las composiciones obtenidas en el Ejemplo 6 fueron empleadas para evaluar la capacidad antagonica contra las ascosporas de *M. fijiensis* y la viabilidad de *B. subtilis* EA-CB0015 en la formulación durante un tiempo de almacenamiento determinado (180 días).

Con respecto a la evaluación de la viabilidad de la bacteria en el tiempo, en la FIG. 9 se muestra una disminución paulatina de las UFC con el tiempo para todos los tratamientos, con una disminución más marcada para la emulsión a partir del tercer mes. La mezcla base agua y la suspensión bacteriana presentaron reducciones muy similares siendo menor la de la mezcla base agua. De acuerdo a lo anterior, las mejores composiciones en relación a la viabilidad de *B. subtilis* EA-CB0015 en la formulación durante el periodo de tiempo evaluado, son aquellas con base agua o las que tienen una suspensión bacteriana.

Para la evaluación del efecto de los formulados sobre el desarrollo de la Sigatoka negra en plantas de banano se realizó un experimento en el que se evaluaron la emulsión, la mezcla base agua y la suspensión de la bacteriana de *B. subtilis* EA-CB0015. Las composiciones fueron diluidas hasta una concentración de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL y se aplicaron por aspersión 30 gotas/cm² sobre la primera hoja completamente desdoblada después de la hoja bandera (hoja número uno), sobre la cual se realizó la evaluación.

La inoculación del patógeno se realizó mediante inoculación artificial adicionando 20 mililitros de una suspensión micelial de *M. fijiensis* de 10 días de edad a la hoja número uno. La inoculación del patógeno se hizo 24 horas antes de la aplicación de las composiciones de las BAFEs. El grado de severidad de la enfermedad fue determinado al cabo de 30 días de la aplicación de los formulados con la escala de Fouré (1982) [17] y se determinó el porcentaje de área de hoja necrosada empleando fotos de las hojas y el software Assess 1.0 para análisis de imágenes.

Para ambas mediciones se tomaron como control negativo los resultados obtenidos de la aplicación de agua estéril y como control positivo los datos reportados para el fungicida químico Dithane® y el fungicida biológico Rhapsody® empleados según las recomendaciones del comerciante. Los resultados obtenidos se ilustran en las FIG 10 y 11, donde se encontraron diferencias en el grado de severidad y en los porcentajes de área necrosada para los diferentes tratamientos evaluados según el análisis de varianza (valor $p < 0,05$).

Es notorio que la composición mezcla base agua fue el único tratamiento biológico que presentó un control de la enfermedad significativamente igual al control químico, Dithane®, para las dos variables de respuesta evaluadas. Este bioformulado redujo el grado de severidad hasta 2,9% y reportó un área de necrosis de un 2,3%, porcentaje de necrosis similar al obtenido por el control químico (1,0%).

El grado de severidad y porcentaje de área necrosada del control negativo fue de 4,2% y 16,3%, respectivamente. Los demás tratamientos evaluados no mostraron ningún control de la enfermedad, es decir, no presentaron diferencias significativas con el control negativo para ninguna de las dos variables analizadas.

EJEMPLO 8. Evaluación de propiedades fisicoquímicas, adherencia, resistencia a radiación UV y características de las composiciones de la invención.

La adherencia y la resistencia a la radiación UV de las composiciones del Ejemplo 6 fueron bajas comparadas con otros productos químicos del mercado. Para mejorar dichas propiedades, se llevó a cabo una selección inicial de adyuvantes. En la Tabla 5 se muestran los adyuvantes utilizados para el mejoramiento de las propiedades de adherencia y protección UV y el rango en el cuál fueron evaluados.

Tabla 5. Adyuvantes evaluados para el mejoramiento de la adherencia y protección UV de las composiciones de la presente invención.

Función	Tipo de Adyuvante	Concentración (% p/v)
Protector U.V.	TiO ₂ (Técnico)	0,5 - 1,5
Protector U.V.	ZnO ₂ (Técnico)	0,5 - 1,5
Protector U.V.	Alcohol polivinílico (PVA)	0,1 – 1,0
Adherente	Leche descremada (Skimmed)	0,1 - 1,5
Adherente	Pegal®	0,01 - 0,1
Adherente	Caseinato de sodio (CaNa)	0,1 - 1,0

Se tamizaron los adyuvantes empleando criterios de costo, disponibilidad en el mercado y compatibilidad con el bioformulado de la invención. Luego se realizó una evaluación de los adyuvantes previamente seleccionados a partir de un diseño de experimentos multifactorial, en el cual se identificaron los de mejor desempeño para cada criterio de evaluación en un determinado rango de concentraciones (FIG 12 y 13).

De acuerdo a la FIG. 12., la composición bacteriana base agua (MH₂O) de la invención suplementada con el adyuvante TiO₂ al 0.5% p/v mejoró la resistencia a la radiación UV logrando reducir la muerte celular de *B. subtilis* EA-CB0015 de un 55% a un 21.5% a los 120 min de exposición a la radiación UV. Con este hallazgo se desarrolló una nueva composición base agua en la cual se incorporó TiO₂ al 0.5% y se reemplazó el ácido propiónico por sorbato de potasio, composición denominada P2.

De la FIG. 13., se observa que la adición de caseinato de sodio y de leche descremada mejoraron significativamente la adherencia del producto a superficies hidrofóbicas. Por lo anterior se incorporó leche descremada a la composición base agua P2, nueva composición denominada P3.

Para determinar si la composición de *B. subtilis* EA-CB0015 puede actuar en combinación con las mezclas de fungicidas químicos se determinó la viabilidad de *B. subtilis* EA-CB0015 antes y después de someter la composición a las mezclas de tanque empleadas para el control de la Sigatoka negra en plantaciones comerciales. Con esta finalidad se tomó una muestra de 10 mL de la composición y se sometió a las diferentes mezclas de tanque descritas en la Tabla 6.

Tabla 6. Mezclas de la composición base agua con base en *Bacillus subtilis* EA-CB005 con diferentes fungicidas químicos.

Compuesto/ Tratamiento	Agua (%V/V)	Aceite agrícola (%V/V)	Dithane® (%V/V)	Pegal® (%V/V)	Clorotalonil® (%V/V)	Formulado (%V/V)	SICO® (%V/V)	SIGANEX® (%V/V)	Baycor ® (%V/V)	Impulse® (%V/V)	OPUS ® (%V/V)	Atlas® (%V/V)	Calixin ® (%V/V)
Mezcla 1	72,53	0	0	0	7,47	20	0	0	0	0	0	0	0
Mezcla 2	38,86	40,88	8,79	0,41	0	9,31	1,76	0	0	0	0	0	0
Mezcla 3	38,51	40,88	8,79	0,41	0	9,22	0	2,2	0	0	0	0	0
Mezcla 4	38,51	40,88	8,79	0,41	0	9,22	0	0	2,2	0	0	0	0
Mezcla 5	38,86	40,88	8,79	0,41	0	9,31	0	0	0	1,76	0	0	0
Mezcla 6	36,75	40,88	8,79	0,41	0	8,78	0	0	0	0	4,4	0	0
Mezcla 7	38,86	40,88	8,79	0,41	0	9,31	0	0	0	0	0	1,76	0
Mezcla 8	38,51	40,88	8,79	0,41	0	9,21	0	0	0	0	0	0	2,2

Para esta evaluación se empleó un diseño multifactorial 8 x 8, en donde el primer factor evaluado fue tipo de mezclas de tanque con 8 niveles, y el segundo fue el tiempo de exposición a las mezclas o tiempo de evaluación de la viabilidad con ocho niveles (0,0; 0,5; 1,5; 3,0; 6,0; 12,0 y 25,0 horas). Los resultados se compararon con el control biológico Rhapsody® y se utilizaron dos réplicas por tratamiento.

La variable de respuesta evaluada fue el número de UFC/mL en cada uno de los tiempos de evaluación. Adicionalmente, se determinó el t_{d50} , que corresponde al tiempo en que el 50% de la biomasa de *B. subtilis* EA-CB0015 pierde su viabilidad a causa de la exposición a cada una de las mezclas, utilizando para el análisis de los datos un diseño unifactorial, en donde el factor sería el porcentaje (%) de muerte celular.

También se determinó el porcentaje de muerte celular luego de 3 y 25 horas (3 horas corresponde al tiempo promedio que se demora una composición en ser aplicada luego de su preparación y 25 horas es el tiempo máximo que una composición permanece en los tanques de mezcla antes de ser aplicada).

En la Tabla 7 se muestra el t_{d50} (tiempo en que el 50% de las esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 pierden su viabilidad) y el porcentaje de muerte celular a las 3 y 25 horas para el formulado de *B. subtilis* EA-CB0015 en cada mezcla de fungicida. Para su producción, el cultivo es llevado junto con los respectivos ayudantes de la composición a un tanque agitado para ser mezclados. M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 y M8 denotan las diferentes mezclas fungicidas a las cuáles fueron sometidos los formulados.

Tabla 7. Porcentaje de muerte celular y t_{d50} de *B. subtilis* EA-CB0015 después de mezclado con diferentes mezclas de fungicidas químicos.

Mezcla	t_{d50} MH₂O (horas)	% de muerte celular a las 3 horas	% de muerte celular a las 25 horas
M1	>25	3,7	24,6

M2	>25	18,6	10,6
M3	>25	32,1	25,4
M4	>25	25,9	22,0
M5	>25	16,3	36,4
M6	>25	7,2	28,1
M7	>25	17,0	17,4
M8	>25	6,0	6,5

En la tabla anterior se observa que para todas las mezclas fungicidas la composición de *B. subtilis* EA-CB0015 presentó un t_{d50} mayor a 25 horas, alcanzando reducciones promedio de solo el 20,1 % en la viabilidad. Además, dado que en la composición las reducciones de la viabilidad fueron inferiores al 50%, muy probablemente la composición de la presente invención le brinda protección extra al *B. subtilis* EA-CB0015, lo que le permite conservar la viabilidad durante largos periodos de exposición a mezclas fungicidas.

En relación a los porcentaje de pérdida de la viabilidad, se observó que en condiciones ordinarias (3 horas) las mezclas M2 (SICO®), M3 (Siganex®) y M4 (Baycor®), presentaron los mayores índices de reducción de la viabilidad bacteriana en la composición, en tanto que en condiciones extraordinarias (25 horas) los mayores índices de reducción se registraron en las mezclas M1 (Bravonil®), M3 (Siganex®), M5 (Bumper®) y M6 (Opus®).

EJEMPLO 9. Evaluación del efecto sobre la severidad de la Sigatoka negra de las composiciones de la invención. Pruebas en invernadero y en campo.

Se realizó una evaluación del efecto de la composición bacteriana base agua de *B. subtilis* EA-CB0015 sobre la Sigatoka negra en condiciones de invernadero. Para ello se emplearon plantas de banano c.v. Williams de 4 meses de edad y la inoculación del patógeno se hizo de manera artificial aplicando una suspensión micelial del hongo *M. fijiensis* a la hoja número uno de la planta. La obtención de micelio de *M. fijiensis* para la inoculación de las plantas se hizo siguiendo la metodología de descarga de ascosporas utilizada por Cenibanano [11].

La aplicación de las composiciones se realizó un día después de la inoculación de las plantas con el patógeno. Las composiciones fueron diluidas hasta una concentración de $1,0 \times 10^8 \pm 0,1$ UFC/mL y se aplicaron utilizando un aerógrafo de la referencia *Mini Spray gun with cup K-3®* con aspersor en abanico conectado a un compresor de 30 psi y calibrado para asperjar 50 gotas/cm² a una altura de 30 cm. Para la fumigación se hizo un solo paso por el haz y el envés de las hojas infectadas a una altura de 30 cm, garantizando una concentración mínima de 50 gotas/cm².

Para este experimento se empleó un diseño unifactorial en el cuál se evaluó la composición base agua (MH₂O y P3), un control químico Bravonil® en agua, un control biológico, Serenade® ($1 \times 10^8 \pm 0,1$ UFC/ml) y agua estéril como control absoluto.

El desarrollo de la enfermedad se midió al mes de haber infectado las plantas. Se determinó el grado de infección utilizando la escala de Fouré (1982) [17] y el área necrosada con la ayuda de una cámara Samsung de 8 Mega-pixels y el software de procesamiento de imágenes Axio Visio® 4.2 de Zeiss®.

A partir del análisis de varianza ANOVA se encontró que había diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados. Para determinar la diferencia entre éstos se utilizó la prueba de rangos múltiples por el método de Tukey. Los porcentajes de área necrosada para los diferentes tratamientos se ilustran en la FIG. 14.

Como se observa en la FIG 14, la composición mezcla base agua (MH₂O y P3) de *B. subtilis* EA-CB0015 de acuerdo a la presente invención y el control positivo Bravonil 720® redujeron significativamente el porcentaje de área necrosada de las hojas de banano con porcentajes de área necrosada de 1,67% y con un 1,26 % respectivamente. En la FIG. 15 se muestran fotografías de hojas tratadas con cada uno de los tratamientos, donde se puede apreciar visualmente la diferencia en la apariencia de las hojas post-tratamiento. Las fotografías fueron seleccionadas de porciones de hoja promedio.

Con el fin de evaluar la eficacia de la composición mezcla base agua de *B. subtilis* EA-CB0015 se evaluó el producto a nivel de campo en un lote de 1,5 ha, tres parcelas por tratamiento. Cada parcela de 220 m² contenía 42 plantas, de las cuales se tomaron seis plantas centrales por parcela para la evaluación de la enfermedad. Los tratamientos fueron aplicados cada 11 días con una fumigadora de motor (Stihl® SR-420) de 15 L de capacidad y lanzas a 60 gotas/cm² de hoja.

La evaluación de la enfermedad de la Sigatoka negra se realizó mediante dos metodologías de preaviso biológico y severidad por Stover. En la FIG. 16 se observa el área bajo la curva (ABC) de la severidad de la Sigatoka negra obtenida durante 14 semanas de evaluación. En dicha figura se observa que las dos composición base agua de *B. subtilis* EA-CB0015 (MH₂O y P3) redujeron la severidad la enfermedad sin diferencias significativas con los controles químicos (Bravonil®, Dithane®) y biológico (Serenade®).

EJEMPLO 10. Efecto de *B. subtilis* EA-CB0015 sobre *Botritys cinérea* en pompón

Se realizó una evaluación del efecto de *B. subtilis* EA-CB0015 sobre *Botritys Cinerea* en pompones. Los pompones se desinfectaron por 1 minuto en hipoclorito de sodio al 1%, se lavaron con agua destilada estéril y finalmente se dejaron secar. Posteriormente cada flor se colocó en un vaso desechable y se asperjó cada tratamiento con un aerógrafo. Transcurridas 24 h de la aplicación de los tratamientos se realizó la aplicación del patógeno (*B. cinerea*) a una concentración de 5000 esporas/mL con un atomizador (2 mL) y se incubaron a una temperatura promedio de 20°C y una humedad relativa superior al 90%.

La medición de la enfermedad se realizó al cabo de 7 días de acuerdo a porcentaje de pétalos afectados y a la severidad. En la FIG. 17, se puede apreciar que la suspensión de esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 (T1) disminuyó la severidad de la enfermedad en un 84% con relación al control no tratado (C).

EJEMPLO 11. Efecto de *B. subtilis* EA-CB0015 sobre *Colletotrichum* sp. en Tomate de Árbol (*Cyphomandra betacea*).

Se realizó una evaluación del efecto de *B. subtilis* EA-CB0015 sobre *Colletotrichum* sp. en tomate de árbol. Para ello los tomates se desinfectaron por 2 minutos en etanol al 70% y se lavaron con agua destilada estéril dejándolos secar.

Luego se realizó una herida con un punzón en la región del ecuador del fruto no superior a 2 mm de profundidad y se aplicó 25 µL de agua (C) o de esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 (T1, concentración 1×10^7 UFC/mL). Transcurridas 24 horas se hizo inoculación artificial de 15 µL *Colletotrichum* sp. EAHP-007 en la herida a una concentración de 400.000 esporas/mL.

En la FIG. 18 se observan los resultados de la suspensión de esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 sobre el diámetro de la lesión generado por *Colletotrichum* sp EAHP-007 en el fruto, logrando un control efectivo de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Shoda, «Bacterial Control of Plant Disease,» *Journal of Bioscience and Bioengineering*, pp. 515-521, 200.
- [2] H. P. Bais, R. Fall y J. M. Vivanco, «Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production,» *Plant Physiology*, vol. 134, pp. 307-319, 2004.
- [3] T. Stein, «*Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions,» *Molecular Microbiology*, vol. 56, pp. 854-857, 2005.
- [4] M. Ongena y P. Jacques, «*Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 16, n° 3, pp. 115-125, 2008.

- [5] G. Winkelmann, R. Allgaier y G. Jung, «Iturin AL A New Chain Iturin A possessing an unusual high content of C16 - β - amino acids,» *Journal of Antibiotics*, vol. 16, pp. 1451-1457, 1983.
- [6] N. Vanittanakon y W. Loeffler, «Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3,» n° 7, pp. 888-901, 1986.
- [7] F. Peypoux, J. M. Bonmatin y J. Wallach, «Recent trends in the biochemistry of surfactin,» vol. 51, pp. 553-563, 1999.
- [8] Y. H. Wei, L. F. Wang , J. S. Changy y S. S. Kung, «Identification of of induced acidification in in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation,» *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 96, n° 2, pp. 174-178, 2003.
- [9] X. J. Tang , G. Q. He, Q. H. Chen, X. Y. Zhang y M. Ali, «Medium optimization for the production of thermal stable beta-glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology,» *Bioresource Technology*, vol. 93, n° 2, pp. 175-181, 2004.
- [10] J. Pelaez, L. E. Vasquez, T. J. Diaz, D. A. Castañeda, E. Rodríguez y R. E. Arango, «Use of a micro title plate dilution assay to measure activity of antifungal compounds against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet,» *evista Facultad Nacional de Agronomia*, vol. 59, n° 2, pp. 4325-3433, 2006.
- [11] Dupont, «Técnicas mejoradas para el manejo e identificación,» Boletín Técnico E55786,, 1982.
- [12] A. G. C. I. y. G. A. Riveros, «Microbiological control of black leaf streak disease,» de *Mycosphaerella leaf spot disease of bananas: present status and outlook*, Montpellier, INIBAP, 2003, pp. 287-295.
- [13] S. Talavera, E. Bustamante, R. González y V. Sánchez, «Selección y evaluación en laboratorio y campo de microorganismos glucanolíticos antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis*,» *Manejo Integrado de Plagas*, vol. 47, pp. 24-30, 1998.

- [14] P. Jacques, C. Hbid, J. Destain, H. Razafindralambo, M. Paquot, E. De Pauw y P. Thonart, «Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman Design,» *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vols. %1 de %277-79, pp. 223-233, 1999.
- [15] S. K. Brar, M. Verma , R. D. Tyagy, J. R. Valero y R. Y. Surampalli, «Screening of different Adjuvants for Waste/water sludge-based *Bacillus thuringiensis* formulation,» *Microbial Control*, vol. 99, nº 4, pp. 1065-1079, 2006.
- [16] H. Burges, Formulation of microbial biopesticidas, beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments, USA: Kluwer Academic Publishers, 1998.
- [17] E. Foure, «Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Comportement des variétés. Etude de la sensibilite varietale des bananiers et plantains e *Mycosphawerella fijiensis* Morelet au Gabomn (maladie desreies noires). I-Incubation et evolution de la maladie,» *Fruits*, vol. 37, pp. 749-771, 1982.
- [18] G. Holz, S. Coertze y B. Williamson, «The Ecology of Botrytis on Plant Surfaces,» de *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Netherlands, Springer, 2007, pp. 9-27.
- [19] AgraQuest, «Serenade,» 2009. [En línea]. Available: www.agraquest.com. [Último acceso: 17 03 2010].
- [20] P. Tudzynski y L. Kokkelink, «). Botrytis cinerea: Molecular Aspects of a Necrotrophic Life Style,» de *Plant Relationships*, Berlin, Springer, 2009, pp. 29-50.

Se debe entender que la presente invención no se halla limitada a las modalidades descritas e ilustradas, pues como será evidente para una persona versada en el arte, existen variaciones y modificaciones posibles que no se apartan del espíritu de la invención, el cual solo se encuentra definido por las siguientes reivindicaciones:

REIVINDICACIONES

- 1) Un procedimiento para incrementar la producción de biomasa y metabolitos de microorganismos de la especie *Bacillus sp*, que comprende cultivar el microorganismo en un medio de cultivo adecuado bajo condiciones ambientales específicas.
- 2) Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste de *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*.
- 3) Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde el microorganismo es *Bacillus subtilis* EA-CB0015 o *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959.
- 4) Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde el medio de cultivo adecuado comprende uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste de carbohidratos, extracto de levadura, sulfato de amonio, peptona, sales que contengan magnesio, azufre, manganeso, cloro, potasio, fósforo, calcio y sodio, bien sea en una matriz sólida, semisólida o líquida.
- 5) Un procedimiento según la Reivindicación 4, donde el medio de cultivo adecuado tiene la siguiente composición:

COMPONENTE	Concentración (g/L)
Glucosa	30,0 - 35,0
Extracto de levadura	30,0 - 35,0
MnSO ₄	0,025 - 0,05
Cloruro de calcio	0,02 - 0,04
Sulfato de amonio	0,80 - 1,20
MgSO ₄	3,50 - 5,00
HPO ₄	0,40 - 0,60

KH ₂ PO ₄	0,40 - 0,60
---------------------------------	-------------

- 6) Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde las condiciones ambientales específicas incluyen, pH, temperatura, velocidad de agitación, tiempo de fermentación y aireación.
- 7) Un procedimiento según la Reivindicación 6, donde las condiciones ambientales específicas del cultivo son:

Velocidad de agitación	400 - 600 rpm
Aireación	1 - 5 vvm
pH	5,5 - 7,5
Temperatura	20 - 40 °C
Tiempo de fermentación	10 – 100 horas

- 8) Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde adicionalmente se separa la biomasa obtenida mediante centrifugación y/o microfiltración.
- 9) Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde adicionalmente se extraen los metabolitos mediante extracción con solventes, precipitación, adsorción o cromatografía.
- 10) Biomasa de *Bacillus subtilis* o de *Bacillus amyloliquefaciens* obtenida mediante un procedimiento según las Reivindicaciones 1 a 8.
- 11) Biomasa de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 obtenida mediante un procedimiento según las Reivindicaciones 1 a 8.

- 12) Biomasa de *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 obtenida mediante un procedimiento según las Reivindicaciones 1 a 8.
- 13) Metabolitos de *Bacillus subtilis* y/o metabolitos de *Bacillus amyloliquefaciens*, obtenidos mediante un procedimiento según las Reivindicaciones 1 a 9.
- 14) Metabolitos de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y/o metabolitos de *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959, obtenidos mediante un procedimiento según las Reivindicaciones 1 a 9.
- 15) Metabolitos de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y/o *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 según la Reivindicación 14, caracterizados por ser lipopéptidos de la familia de las surfactinas, iturinas y fengicinas.
- 16) Metabolitos de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 según la Reivindicación 15, donde los lipopéptidos de la familia de las fengicinas corresponden a fengicinas C de fórmula general:



en donde R corresponde a una cadena hidrocarbonada de 14 a 18 carbonos saturada o insaturada.

- 17) Metabolitos de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y/o metabolitos de *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 según las Reivindicaciones 13 a 16, con actividad antimicrobiana.
- 18) Una composición que comprende biomasa de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 según la Reivindicación 11 y/o sus metabolitos, junto con un vehículo agroquímicamente aceptable.

- 19) Una composición que comprende biomasa de *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 según la Reivindicación 12 y/o sus metabolitos, junto con un vehículo agroquímicamente aceptable.
- 20) Una composición que comprende metabolitos de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y/o metabolitos de *Bacillus amyloliquefaicens* EA-CB0959 según la Reivindicación 14, junto con un vehículo agroquímicamente aceptable.
- 21) Una composición según cualquiera de las Reivindicaciones 18 a 20, que adicionalmente comprende uno o más agentes biocidas seleccionados del grupo que consiste de anilino pirimidinas, bitartenoles, esteroides, difeconazol, tebuconazole, epoxiconazole, mancozeb y clorotoloni.
- 22) Una composición según cualquiera de las Reivindicaciones 18 a 21, que comprende:

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
Cultivo de <i>Bacillus</i> sp. con una concentración de 7,0 a 18,0 g/L	86,6% - 93,2% v/v
Carboximetilcelulosa sódica	2,0 - 4,0 p/v
Buffer fosfato 3M pH 5	1,0 - 5,0 v/v
Glicerol	1,0 - 4,0 v/v
Tween 20	0,25 - 0,75 v/v
Triton X100	0,25 - 0,75 v/v
Sorbato de Potasio	0,01 - 0,1 v/v
Goma Xanthan	0,05 - 0,15 p/v
Leche descremada	0,20 - 1,50 p/v
Dióxido de Titanio	0,03 - 1,00 p/v

- 23) Uso de biomasa de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y/o de biomasa de *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 según las Reivindicaciones 11 y 12, para el control de

fitopatógenos tales como *Mycosphaella fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum sp.*, *Monilia sp.* *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*.

- 24) Uso de metabolitos de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y/o *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 según la Reivindicación 14, para el control de fitopatógenos tales como *Mycosphaella fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum sp.*, *Monilia sp.* *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*.
- 25) Uso de una composición según las Reivindicaciones 18 a 22, para el control de fitopatógenos tales como *Mycosphaella fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum sp.*, *Monilia sp.* *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*.
- 26) Un método para el tratamiento de cultivos contra agentes fitopatógenos que comprende la aplicación de una cantidad efectiva de biomasa de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y/o biomasa *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 según las Reivindicaciones 11 y 12.
- 27) Un método para el tratamiento de cultivos contra agentes fitopatógenos que comprende la aplicación de una cantidad efectiva de metabolitos de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y/o *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 según la Reivindicación 14.
- 28) Un método para el tratamiento de cultivos contra agentes fitopatógenos tales como *Mycosphaella fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum sp.*, *Monilia sp.* *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*, que comprende la aplicación de una cantidad efectiva de una composición según las Reivindicaciones 18 a 22.

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

ASSIGNMENT

CESION

Isabel Cristina CEBALLOS ROJAS
Valeska VILLEGAS ESCOBAR
Sandra MOSQUERA LÓPEZ
John Jairo MIRA CASTILLO
Jaime Andrés GUTIERREZ MONSALVE
Juan José ARROYAVE TORO
Luisa Fernanda POSADA URIBE

by means of this document assign(s) worldwide,
to

por medio de la presente cedo(cedemos) a
nivel mundial, a

UNIVERSIDAD EAFIT y ASOCIACIÓN DE BANANEROS DE COLOMBIA (AUGURA)

a company,
organized under the laws of Republic of
Colombia

una compañía organizada bajo las leyes de
la República de Colombia

Domiciled in

domiciliada en

Carrera 49 No 7 Sur 50 Medellín, Colombia y Calle 3 Sur No. 41-65. Piso 9 Medellín

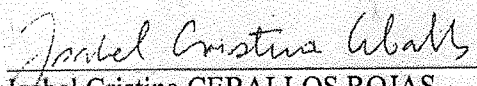
(hereinafter referred to as the "ASSIGNEE"),
all my (our) rights, including those of priority,
title and interest in and to my (our) invention for
a new and useful improvement entitled and as
fully set forth and described in:

(de ahora en adelante el "CESIONARIO"),
todos mis (nuestros) derechos, incluyendo los de
prioridad, título e interés sobre mi (nuestra)
invención tal como describe en:

PRODUCTION PROCESS FOR BIOMASS AND FENGYCIN METABOLITES OF BACILLUS SPECIES AND COMPOSITIONS THEREOF FOR BIOLOGICAL PEST CONTROL

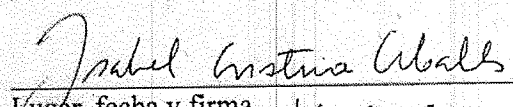
Priority number US 61/819,258 filed on 3 May 2013

International application number PCT/IB2014/061167 filed on 2 May 2014


Isabel Cristina CEBALLOS ROJAS

Place, date and signature Lausanne

30-10-2015

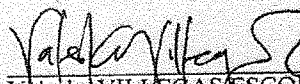

Lugar, fecha y firma

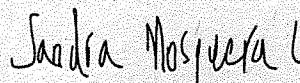
Lausanne

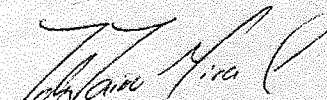
30-10-2015

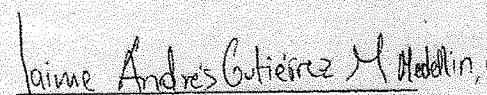
OLARTEMOURE

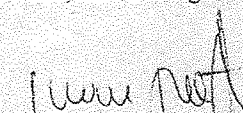
OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

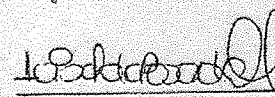

Valeska VILLEGAS ESCOBAR 28/10/2015
Place, date and signature

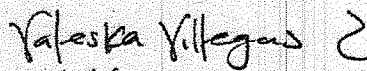

Sandra MOSQUERA LOPEZ
Place, date and signature

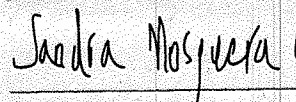

John Jairo MIRA CASTILLO 29/10/2015
Place, date and signature

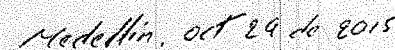

Jaime Andrés GUTIERREZ MONSALVE
Place, date and signature

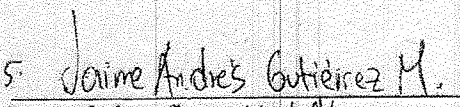

Juan José ARROYAVE TORO
Place, date and signature

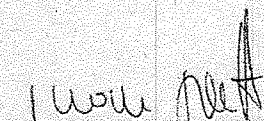

Luisa Fernanda POSADA URIBE
Place, date and signature

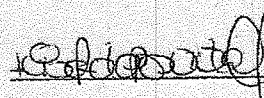

Medellín, 28/10/2015
Lugar, fecha y firma


Davis, CA
28/10/2015
Lugar, fecha y firma


Medellín, Oct 29 de 2015
Lugar, fecha y firma


Lugar, fecha y firma Medellín, Oct. 29/2015


Medellín, octubre 26/15
Lugar, fecha y firma


Medellín, octubre 26/15
Lugar, fecha y firma

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PCTUSP2013-3	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/IB2014/061167	International filing date (<i>day/month/year</i>) 2 May 2014 (02-05-2014)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 3 May 2013 (03-05-2013)
Applicant UNIVERSIDAD EAFIT		

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

This international search report consists of a total of 4 sheets.

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

1. Basis of the report

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

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

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

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

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

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

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

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

PRODUCTION PROCESS FOR BIOMASS AND FENGYCIN METABOLITES OF BACILLUS SPECIES AND COMPOSITIONS THEREOF FOR BIOLOGICAL PEST CONTROL

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

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

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

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 2

- ☒ as suggested by the applicant
- ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
- ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2014/061167

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A01N63/02 C07K14/32
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N C07K

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

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

EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VALESKA VILLEGAS-ESCOBAR ET AL: "Fengycin C Produced by Bacillus subtilis EA-CB0015", JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS, vol. 76, no. 4, 5 March 2013 (2013-03-05), pages 503-509, XP055142706, ISSN: 0163-3864, DOI: 10.1021/np300574v	1-4,6, 8-11, 13-20, 23-28
Y	abstract page 507 - page 508; figure 4 ----- -/--	5,7,21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

"E" earlier 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

30 September 2014

Date of mailing of the international search report

07/10/2014

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Gurdjian, Didier

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2014/061167

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ISABEL CEBALLOS ET AL: "Cultivable Bacteria Populations Associated with Leaves of Banana and Plantain Plants and Their Antagonistic Activity Against", MICROBIAL ECOLOGY, SPRINGER-VERLAG, NE, vol. 64, no. 3, 5 May 2012 (2012-05-05), pages 641-653, XP035116074, ISSN: 1432-184X, DOI: 10.1007/S00248-012-0052-8	1-4,6,8, 10, 12-15, 18,20, 23-28
Y	abstract	5,7,21
X	----- WO 2013/050700 A2 (UNIV LILLE 1 SCIENCES ET TECHNOLOGIES USTL [FR]; COUTTE FRANCOIS [FR];) 11 April 2013 (2013-04-11)	1,2,4, 13-15
Y	page 6, line 16 - line 18 page 6, line 26 - page 7, line 10; examples 2,3	5,7,21
Y	----- WO 2010/108973 A2 (BASF SE [DE]; SCHERER MARIA [DE]; KLAPPACH KRISTIN [DE]; HADEN EGON [D]) 30 September 2010 (2010-09-30) page 7, line 37 page 8, line 12 - line 14 page 9, line 27 page 24; claims 1,10-12 page 26 - page 28	21
X	----- EEMAN M ET AL: "Influence of environmental conditions on the interfacial organisation of fengycin, a bioactive lipopeptide produced by Bacillus subtilis", JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE, ACADEMIC PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 329, no. 2, 15 January 2009 (2009-01-15), pages 253-264, XP025677564, ISSN: 0021-9797, DOI: 10.1016/J.JCIS.2008.10.017 [retrieved on 2008-10-14]	13-15
A	abstract	1,2,10, 18,23,26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2014/061167

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013050700 A2	11-04-2013	AU 2012320330 A1 CA 2851033 A1 EP 2764126 A2 FR 2980802 A1 WO 2013050700 A2	01-05-2014 11-04-2013 13-08-2014 05-04-2013 11-04-2013
WO 2010108973 A2	30-09-2010	AR 076150 A1 AU 2010227493 A1 CA 2753150 A1 CN 102361551 A CR 20110460 A EA 201101333 A1 EC SP11011349 A EP 2410840 A2 JP 2012521390 A KR 20110132461 A NZ 594887 A PE 05362012 A1 US 2012003199 A1 US 2014212401 A1 WO 2010108973 A2	18-05-2011 20-10-2011 30-09-2010 22-02-2012 24-10-2011 30-05-2012 31-10-2011 01-02-2012 13-09-2012 07-12-2011 29-11-2013 05-05-2012 05-01-2012 31-07-2014 30-09-2010

LISTA DE INVENTORES

PCT/IB2014/061167

Isabel Cristina CEBALLOS ROJAS

Calle 56 # 35A 22 Apt 501
Medellín
Colombia

Valeska VILLEGAS ESCOBAR

Calle 7 No. 22 -31 apto 9804
Medellín
Colombia

Sandra MOSQUERA LÓPEZ

Av37#75-35 apto 1210
Medellín
Colombia

John Jairo MIRA CASTILLO

Calle 3 Sur No. 41-65. Piso 9
Medellín
Colombia

Jaime Andrés GUTIERREZ MONSALVE

Calle 40D Sur No 39-98
Barrio el Dorado Manzana 6 Apto 307
Envigado
Colombia

Juan José ARROYAVE TORO

Calle 6 #25-112. Apto 402.
Medellín
Colombia

Luisa Fernanda POSADA URIBE

Calle 30a # 71-23 Belén Rosales,
Medellín
Colombia

PROCESO DE PRODUCCION DE BIOMASA Y METABOLITOS DE MICROORGANISMOS DE LA ESPECIE *Bacillus* sp. Y SUS COMPOSICIONES PARA EL CONTROL BIOLOGICO DE PLAGAS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un proceso para de producción de biomasa y metabolitos de microorganismos de la especie *Bacillus* sp, entre ellos *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*. El proceso incluye un medio de cultivo adecuado y unas condiciones ambientales específicas que permiten obtener una gran cantidad de biomasa y metabolitos de la familia de fengicinas, surfactinas e iturinas, los cuales exhiben actividad antifúngica y antibacteriana contra diversos agentes fitopatógenos.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Entre los microorganismos para control biológico, las bacterias del género *Bacillus* sp. han recibido mucha atención por la gran variedad de compuestos antibióticos que producen, su larga vida en anaquel, su rápido crecimiento en cultivos y su capacidad para colonizar superficies foliares [1, 2, 3, 4]. Particularmente, ciertas especies de *Bacillus* tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus anthracis* y *Bacillus thurigiensis* presentan actividad antimicrobiana [4].

La actividad antimicrobiana de estas bacterias se debe a su capacidad de producir lipopéptidos de la familia de las surfactinas, iturinas y fengicinas [5, 6, 7] las cuales difieren en la secuencia de aminoácidos y la ramificación de la cadena del ácido graso. Las surfactinas exhiben un alto poder antibacteriano, en tanto que las iturinas y fengicinas han sido reconocidas por su actividad antifúngica [4].

En el estado de la técnica se describe el uso de *B. subtilis* y *B. amiloquefacences* para controlar diversos microorganismos causantes de enfermedades en una amplia variedad de cultivos, entre los que se encuentran cultivos de frutas y hortalizas tales como mora, uva, frambuesa, fresa, tomates, pepino, pimienta, naranja, melón, manzana, durazno, chirimoya, banano, papaya, mango y kiwi.

El documento EP2311936 divulga una cepa de *B. subtilis* KS1 (NITE BP-569) como agente de control biológico para contrarrestar varios microorganismos fitopatógenos en cultivos de uva. El documento WO 98/21968 describe un antibiótico producido por *B. subtilis* AQ153 (ATCC 55614) efectivo contra infecciones bacterianas y fúngicas así como un método para la protección de plantas que comprende la aplicación de dichos compuestos antibióticos.

Los documentos WO9850422 y WO0029426 divulgan otros compuestos antibióticos producidos por la cepa de *B. subtilis* AQ713 (NRRL B21661) y sus mutantes, los cuales exhiben actividad insecticida, antifúngica y antibacterial. El documento WO9909819 divulga antibióticos de una cepa de *B. subtilis* AQ 713 (NRRL N° 21665) que produce metabolitos con actividad pesticida y un metabolito de alto peso molecular, soluble en agua, que exhibe actividad insecticida y nematocida contra el gusano de la raíz del maíz y otros nematodos.

El documento US2011/0318386 describe métodos para inducir resistencia sistémica contra diversos patógenos mediante el uso de controladores biológicos del género *Bacillus*, específicamente de la especie *B. mojavensis* aislado 203-7 y *B. mycoides* aislado. Por su parte, el documento ES 2345969 describe un preparado fitofortificante para aplicación en pseudotallos de plataneras y bananos que incluye *B. subtilis*, *Trichoderma viride* y *B. megaterium* var *phosphaticum*.

El documento US2012/00031999 divulga una estrategia de control para diferentes enfermedades de origen fúngico, entre ellas la Sigatoka negra en banano, basada en la

aplicación de fungicidas sintéticos con algunos microorganismos de control biológico y sus metabolitos (específicamente la cepa *B. subtilis* QST 713 correspondiente a la cepa del producto comercial Serenade®).

En los procesos de producción de microorganismos de la especie *Bacillus* sp divulgados en el estado del arte, la cantidad de biomasa obtenida es muy escasa, ya que por lo general la densidad celular obtenida no supera los 5,0 g/L [8, 9], por lo que se hace necesario desarrollar nuevos procesos para incrementar la producción de biomasa y la de sus metabolitos activos.

De igual forma, es necesario desarrollar composiciones biocidas a partir de dichos microorganismos y/o sus metabolitos con actividad biológica que tengan una mayor eficacia y selectividad para el control de diversos agentes fitopatógenos en una gran variedad de cultivos.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención permite solucionar éstos y otros inconvenientes ya que comprende un proceso para incrementar la producción de biomasa de microorganismos del género *Bacillus*, entre ellos *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959, así como la de sus metabolitos biológicamente activos, tales como lipopéptidos de la familia de las surfactinas, iturinas y fengicinas.

Adicionalmente, la presente invención comprende composiciones agroquímicas que comprenden microorganismos de la especie *Bacillus*, entre ellos, *Bacillus subtilis* EA-CB0015, *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 y/o sus metabolitos activos, bien sea solos o en combinación con agentes biocidas, para el control de agentes fitopatógenos tales como *Mycosphaerella fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum sp.*, *Monilia sp.*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*.

La presente invención también está dirigida al uso de microorganismos de la especie *Bacillus*, entre ellos *B. subtilis* EA-CB0015, *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 y/o de sus metabolitos activos y de las composiciones agroquímicas que los contienen, para inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos, tales como *Mycosphaerella fijiensis* en cultivos agrícolas.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Estructura de las fengicinas C producidas por *Bacillus subtilis* EA-CB0015.

FIG. 2. Densidad celular de *B. subtilis* EA-CB0015 en diferentes medios de cultivo.

FIG. 3. Cromatograma HPLC de los compuestos de *Bacillus subtilis* EA-CB0015.

FIG. 4. Espectro MS/MS del lipopéptido purificado P5 (m/z 1429.9) de *B. subtilis* EA-CB0015.

FIG. 5. Espectro MS/MS del lipopéptido purificado P5 después (m/z 1447.8) de la hidrólisis alcalina del anillo lactona de *B. subtilis* EA-CB0015.

FIG. 6. Área bajo la curva de los lipopéptidos producidos por *B. subtilis* EA-CB0015 en diferentes medios de cultivo.

FIG. 7. Porcentajes de inhibición generados por *B. subtilis* EA-CB0015 sobre diferentes microorganismos fitopatógenos.

FIG. 8. Porcentajes de inhibición generados por el SLC de *B. subtilis* EA-CB0015 obtenidos en diferentes medios de cultivo sobre *M. fijiensis*.

FIG. 9. Viabilidad de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 contenido en diferentes composiciones de la invención

FIG. 10. Grado de severidad de la Sigatoka negra en plantas de banano tratadas con diferentes composiciones de la invención a nivel de invernadero.

FIG. 11. Porcentaje de área necrosada causada por la Sigatoka negra en hojas de banano tratadas con diferentes composiciones de la invención.

FIG. 12. Efecto de diferentes adyuvantes protectores UV sobre la viabilidad de *B. subtilis* EA-CB0015.

FIG. 13. Efecto de diferentes adyuvantes sobre la adherencia de las composiciones (MH₂O y P2) con base en *B. subtilis* EA-CB0015.

FIG. 14. Efecto de la composición mezcla base agua con base en *B. subtilis* EA-CB0015 sobre el porcentaje de área necrosada de las hojas de banano a nivel de invernadero.

FIG. 15. Fotografías de las hojas de banano afectadas por la enfermedad de la Sigatoka negra después de tratadas con diferentes productos.

FIG. 16. Efecto de la composición base agua de *B. subtilis* EA-CB0015 sobre la severidad de la Sigatoka negra en banano en campo.

FIG. 17. Efecto de *B. subtilis* EA-CB0015 sobre la severidad de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* EAHP-009 en pompones.

FIG. 18. Efecto de *B. subtilis* EA-CB0015 sobre *Colletotrichum* sp. en Tomate de Árbol (*Cyphomandra betacea*).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Para incrementar la producción de biomasa de microorganismos de la especie *Bacillus* sp y de sus metabolitos (lipopéptidos), se debe cultivar el microorganismo en un medio de cultivo adecuado y bajo condiciones ambientales necesarias para incrementar la producción de biomasa y de sus metabolitos. Para ello, se prepara un medio de cultivo (en adelante medio D) que comprende uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste de carbohidratos, extracto de levadura, sulfato de amonio, peptona, sales que contengan magnesio, azufre, manganeso, cloro, potasio, fósforo, calcio, y sodio bien sea en una matriz sólida, semisólida o líquida.

Las condiciones ambientales necesarias para llevar a cabo el proceso de la invención incluyen temperatura, pH, velocidad de agitación, tiempo de fermentación y aireación. El proceso de la presente invención se puede llevar a cabo a pequeña escala en el laboratorio o a gran escala en un biorreactor.

En una modalidad preferida, el medio D comprende, en porcentajes p/v, entre 3,2% y 3,4% de glucosa, entre 3,1% y 3,3% de extracto de levadura, entre $2,5 \times 10^{-3}\%$ y $4,5 \times 10^{-3}\%$ de sulfato de manganeso, entre $2 \times 10^{-3}\%$ y $4 \times 10^{-3}\%$ de cloruro de calcio, entre 0,08% y 0,12% de sulfato de amonio, entre 0,35% y 0,45% de sulfato de magnesio, entre 0,04% y 0,12% de fosfato disódico de potasio y entre 0,04% y 0,12% de fosfato monosódico de potasio.

En otra modalidad aún más preferida de la invención, el medio de cultivo D comprende, en porcentajes p/v, 3,34% de glucosa, 3,25% de extracto de levadura, $4,2 \times 10^{-3}\%$ de sulfato de manganeso, $3,1 \times 10^{-3}\%$ de cloruro de calcio, 0,1% de sulfato de amonio, 0,4% de sulfato de magnesio, 0,05% de fosfato disódico de potasio, 0,05% de fosfato monosódico de potasio.

En una modalidad preferida del proceso de la invención, el microorganismo se incuba durante un tiempo entre 24 y 96 horas con una velocidad de agitación entre 400 y 600 rpm, aireación entre 1 y 5 vvm, a una temperatura entre 20°C y 40°C y pH entre 5,5 y 7,5. Para controlar

y/o ajustar el pH se pueden emplear ácidos fuertes como ácido sulfúrico y/o bases fuertes como hidróxido de sodio. Se pueden adicionar también tensioactivos y antiespumantes para controlar la formación de espuma.

El proceso llevado a cabo bajo las condiciones anteriormente indicadas, permite incrementar la obtención de biomasa y metabolitos activos del microorganismo de la especie *Bacillus* sp. La biomasa obtenida mediante el proceso de la presente invención se puede separar del medio de cultivo utilizando métodos convencionales de centrifugación o microfiltración, en tanto que los metabolitos activos se pueden extraer mediante procedimientos de extracción con solventes, precipitación, adsorción o cromatografía.

En una modalidad preferida de la invención, la cantidad de biomasa de microorganismos de la especie *Bacillus* sp. obtenida puede ser de 3,0 hasta 20,0 g/L, preferiblemente entre 7,0 y 18,0 g/L en tanto que la concentración de metabolitos está entre 300 y 1500 mg/L, preferiblemente entre 500 y 1000 mg/L.

En una modalidad preferida, el proceso de la invención permite incrementar la producción de biomasa y metabolitos activos de *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959. La identificación por medio del análisis 16S rDNA permitió establecer que el *B. subtilis* EA-CB0015 corresponde con la secuencia SEQ ID NO:1, la cual está depositada en el GenBank con número de acceso KC006063.

Entre los metabolitos de *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 obtenidos mediante el proceso de la invención se encuentran lipopéptidos tipo surfactinas, iturinas y fengicinas. El análisis mediante técnicas cromatográficas y espectrometría de masas identificó una nueva isoforma de fengicinas producida por *B. subtilis* EA-CB0015, denominada fengicinas C, cuya secuencia de aminoácidos es (Glu1-Orn2-Tyr3-Thr4-Glu5-Val6-Pro7-Gln8-Thr9-Ile10), la cual difiere de la secuencia de las fengicinas B en la posición 9 y de la secuencia de las fengicinas A en las posiciones 6 y 9.

Adicionalmente, siguiendo el procedimiento de la invención para *B. subtilis* EA-CB0015, se pueden obtener 14 diferentes homólogos de fengicina C con fórmula general R-Glu1-Orn2-Tyr3-Thr4-Glu5-Val6-Pro7-Gln8-Thr9-Ile10, los cuales varían según el tamaño de su cadena hidrocarbonada (R) que puede ser saturada o insaturada de 14 a 18 carbonos. La estructura de las diferentes fengicinas producidas por *B. subtilis* EA-CB0015 mediante el proceso de la invención se ilustran en la FIG 1.

Los diferentes homólogos de fengicinas C, así como las surfactinas e iturinas se pueden separar por técnicas convencionales como cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Las surfactinas producidas corresponden a diferentes homólogos de longitud de cadena hidrocarbonada entre 13 y 16 carbonos y las iturinas corresponden a las iturinas A de 14 y 15 carbonos.

Para el caso de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959, los metabolitos producidos mediante el proceso de la invención corresponden a diferentes homólogos de surfactina (C12 a C15), dos homólogos de iturina A (C14 y C15) y dos isoformas de fengicinas (A y B) con 4 homólogos para la fengicina A (C14, C15, C16 y C17) y 2 homólogos de fengicina B (C16 y C17).

En un aspecto adicional de la invención, la biomasa de *B. subtilis* EA-CB0015 o la biomasa de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 obtenida mediante el proceso de la presente invención, inhibe el crecimiento de diversos fitopatógenos tales como *Mycosphaerella fijiensis*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, y *Colletotrichum sp.* La inhibición se puede determinar mediante técnicas como la de platos duales, la cual consiste en comparar el crecimiento de los fitopatógenos al cultivarlos en un medio con y sin la presencia de las sustancias activas a evaluar. Los porcentajes de inhibición *in vitro* determinados siempre son superiores al 50%.

Una vez realizado el procedimiento de la presente invención, se pueden preparar diferentes composiciones o formulaciones a partir de la biomasa y/o metabolitos obtenidos para obtener composiciones biocidas fisicoquímicamente estables que garanticen la viabilidad

del microorganismo y la actividad de los metabolitos en la composición durante largos periodos de tiempo.

Las composiciones se pueden preparar en un recipiente adecuado hermético para evitar contaminación. Allí se dispone de la biomasa y/o sus metabolitos, se agregan los adyuvantes y demás ingredientes hasta obtener una mezcla homogénea. El producto final así obtenido se puede disponer en envases adecuados y almacenarlo a temperatura ambiente.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a composiciones biocidas que comprenden *B. subtilis* EA-CB0015, *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 y/o sus metabolitos activos bien sea de manera individual, combinados o en asociación con otros agentes activos para potenciar la actividad biológica. Las composiciones biocidas de la presente invención pueden contener uno o más coadyuvantes y un vehículo agroquímicamente aceptable.

En una modalidad preferida, las composiciones biocidas de la presente invención comprenden entre el 80,0 y el 99,9% p/p de una suspensión acuosa de *B. subtilis* EA-CB0015 a una concentración de 1×10^7 a 1×10^{11} UFC/mL junto con una mezcla compuesta de 2,0% a 4,0% p/v de carboximetil celulosa sódica (CMC), 1,0% a 5,0% v/v de buffer de fosfatos 3M (pH 5,0), 1,0% a 4,0% v/v de glicerol, 0,25% a 0,75% v/v de tween 20®, 0,25% a 0,75% v/v de Triton X-100®, 0,01% a 1,0% v/v de sorbato de potasio, 0,05% a 0,15% p/v de goma xanthan, 0,2% a 1,5 % p/v de leche descremada y 0,028% a 1,0% p/v de TiO₂. Esta composición es de coloración blanca, tiene un pH de 4,0 a 6,5 y una viscosidad de 20 a 80 cp.

En una modalidad preferida adicional, las composiciones biocidas de la invención comprenden adicionalmente plaguicidas químicos, entre ellos, anilino pirimidinas, bitartenoles, esteroides, difeconazol, tebuconazol, epoxiconazole, mancozeb, clorotolonil y otros agentes para el control biológico de plagas, junto con uno o más coadyuvantes en un vehículo agroquímicamente aceptable.

En un aspecto adicional, la presente invención está dirigida al uso de microorganismos de la especie *Bacillus* sp., particularmente de *B. subtilis* EA-CB0015, *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 y/o sus metabolitos así como de sus composiciones biocidas para inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos tales como *Mycosphaella fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinérea*, *Colletotrichum* sp., *Monilia* sp. *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* en cultivos agrícolas.

En un aspecto adicional, la presente invención está dirigida a un método para el tratamiento de plantas contra infecciones causadas por diferentes fitopatógenos, el cual comprende la aplicación a la planta de una cantidad efectiva de un microorganismo de la especie *Bacillus* sp, particularmente *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 y/o sus metabolitos, o la aplicación de composiciones biocidas que los contienen bien sea cada uno de manera individual o en combinación con otros agentes biocidas.

La aplicación se puede hacer por aspersión en dosis que van desde 0,1 hasta 10 litros por hectárea (L/ha) en mezcla con un vehículo apropiado o mezclado con otras composiciones que contengan uno o más plaguicidas.

Los siguientes Ejemplos ilustran con mayor detalle la invención, sin estar el concepto inventivo restringido a los mismos.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1. Obtención de *Bacillus* sp.

Se obtuvieron cepas de *Bacillus* sp. a partir de los cultivares cv. Gran enano y cv. Valery, ambos de banano, y cv. Hartón de plátano. Para cada cultivar se seleccionó una plantación en la que se establecieron cinco puntos para recolectar muestras compuestas de tres plantas antes de floración, utilizando un muestreo probabilístico aleatorio sin reposición. El muestreo se realizó en las hojas número 2, 5 y 10 de cada una de las plantas y cada hoja fue cuarteada para seleccionar una zona del ápice y otra de la base.

El aislamiento de bacterias se realizó lavando con un buffer de fosfato de sodio más Tween 80® y sonicación de las muestras. Se efectuaron diluciones seriadas y se sembraron por superficie en TSA (Agar Tripticasa de Soya, Merck al 10%). Las bacterias Gram positivas fueron purificadas, cultivadas en el medio Finley y Field's (150 rpm, 4 días, 30 °C) y sometidas a choque térmico (80 °C, 20 min). Todas las BAFEs (Bacterias Aeróbicas Formadoras de Endosporas) fueron conservadas en TSB (Caldo Tripticasa de Soya, Merck) y glicerol (20% v/v) a -80°C y activadas en TSA al 50% previo a cualquier uso experimental.

EJEMPLO 2. Obtención de biomasa de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y de *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959,

La cepa de *B. subtilis* EA-CB0015 se replicó en TSA al 50% y se incubó durante 48 horas a 30°C. Una colonia de la cepa se inoculó en el medio de cultivo D y se incubó por 12 horas a 30°C y 200 rpm. Este cultivo se empleó como preinóculo. La fermentación se realizó en matraces de 50 mL con 10 mL de medio de cultivo D a una temperatura de 30°C y 200 rpm en un agitador orbital. Cada Erlenmeyer se inoculó con 1 mL de una suspensión bacteriana ajustada a una DO₆₀₀ de 1 y obtenida al cabo de 12 horas de crecimiento. Se obtuvieron densidades celulares de hasta $13,2 \pm 1,7$ g/L de *B. subtilis* EA-CB0015.

Para determinar el rendimiento del proceso en la obtención de biomasa de *B. subtilis* EA-CB0015, se comparó la cantidad de biomasa obtenida al emplear el medio de cultivo de la invención (medio D) con la cantidad de biomasa obtenida al emplear los medios de cultivo CIB, MOLP, Finley and Field's y TSB.

La densidad celular obtenida con el medio de cultivo de la invención fue 29,3 veces superior a la obtenida con el medio Finley and Field's ($0,6 \pm 0,1$ g/L), 4,5 veces superior a la obtenida con el medio TSB ($2,95 \pm 0,4$ g/L), 3,6 veces superior a la obtenida con el medio CIB ($3,65 \pm 0,8$ g/L) y 3,2 veces superior a la obtenida con el medio MOLP ($4,1 \pm 0,6$ g/L), como se ilustra en la FIG 2.

Siguiendo el mismo procedimiento, se obtuvo biomasa de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959. Al igual que para *B. subtilis* EA-CB0015, la cantidad de biomasa obtenida al emplear el medio de cultivo de la invención (medio D) fue superior a la obtenida con los medios de cultivo MOLP y TSB. Se obtuvieron densidades celulares entre 8,0 y 10,0 g/L con el medio de la invención.

EJEMPLO 3. Extracción y determinación de los metabolitos activos de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959

A partir del cultivo de *B. subtilis* EA-CB0015 obtenido de acuerdo al Ejemplo 2, se realizó un proceso de extracción con solventes de sus metabolitos activos con metanol. Posteriormente se realizó una extracción en fase sólida (SPE) con metanol como solvente orgánico y las fracciones activas fueron purificadas por HPLC en fase reversa con detector UV a una longitud de onda de 214 nm. En la FIG. 2 se ilustra los respectivos Cromatogramas. Los picos eluidos entre el minuto 16 y 19 corresponden a las Iturinas A (FIG. 3A) y los picos P1 a P14 (FIG 3B) corresponden a las fengicinas C, en tanto que los picos P15 a P19 (FIG 2B) corresponden a las surfactinas.

Algunos de los metabolitos activos también se identificaron por ESI-MS/MS (espectrometría de masas por electrospray), tal como se ilustra en las FIGS 4 y 5:

Para determinar el rendimiento del proceso en la obtención de los dos grupos de metabolitos activos de *B. subtilis* EA-CB0015, se comparó la cantidad de metabolitos obtenida al emplear el medio de cultivo de la invención (medio D) con la cantidad de metabolitos obtenida al emplear los medios de cultivo CIB, MOLP, Finley and Field's y TSB. Las áreas de los picos y por ende la cantidad de metabolitos obtenidos, fueron superiores al emplear en el proceso el medio de cultivo D de la invención como se ilustra en la FIG. 6.

Siguiendo con el mismo procedimiento de extracción y purificación por HPLC indicado anteriormente, se identificaron los metabolitos producidos por la cepa *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 los cuales corresponden a diferentes homólogos de surfactina (C12 a C15), dos homólogos de iturina A (C14 y C15) y dos isoformas de fengicinas (A y B) con 4 homólogos para la fengicina A (C14, C15, C16 y C17) y 2 homólogos de fengicina B (C16 y C17).

EJEMPLO 4. Evaluación de la actividad de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 contra microorganismos fitopatógenos

La evaluación de la actividad antifúngica se realizó mediante el método del anillo. Para ello se realizó una impresión circular (6 cm de diámetro) del *B. subtilis* EA-CB0015 en una caja petri (9 cm de diámetro) con PDA y posteriormente se colocó un disco de 5 mm de diámetro del hongo (crecido durante 10 días) en el centro de la misma. Se utilizaron como control absoluto cajas de petri inoculadas únicamente con discos del hongo y en el momento que alcanzó un crecimiento igual al diámetro del círculo formado por la bacteria, se midió el crecimiento radial del micelio.

El diseño de experimentos fue un diseño unifactorial completamente aleatorio con tres réplicas por tratamiento. La variable de respuesta determinada fue el porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio el cual se calculó considerando el crecimiento del control absoluto como 100%.

Como se puede observar en la FIG. 7, los porcentaje de inhibición generados por *B. subtilis* EA-CB0015 estuvieron entre un 20% para *Pestalotia* sp y un 80% para *Moniliophthora roreri*.

Adicionalmente *B. subtilis* EA-CB0015 exhibe actividad antibacteriana contra varios microorganismos, entre ellos, *Ralstonia solanacearum*, generando halos de inhibición hasta de 6 milímetros en medio de cultivo BGTA. Las pruebas de antagonismo cuantitativas contra

R. solanacearum se realizaron sembrando por superficie 100 µL de una suspensión de *R. solanacearum* ajustada a 10⁶ UFC/mL en agar BGTA. Luego, se colocaron discos de TSA (5 mm) de *B. subtilis* EA-CB0015 de 48 horas de incubación a 30°C. Finalmente, transcurridas 72 horas se determinó el halo de inhibición generado.

Con la misma metodología descrita anteriormente, se evaluó la actividad de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 contra *F. oxysporum*, *M. fijiensis* y *R. solanacearum*, con porcentajes de inhibición de 58,5%, 76,0% y un radio de inhibición de 10,9 mm respectivamente.

EJEMPLO 5. Evaluación de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 contra *Mycosphaerella fijiensis*

Para la selección de antagonistas se realizó un tamizaje inicial utilizando la técnica de microplatos, empleando la metodología modificada de Peláez 2006 [10]. Se determinó de una forma rápida cuales de los sobrenadantes libres de células (SLC) de las BAFEs aisladas generaron inhibición en el crecimiento del micelio de *Mycosphaerella fijiensis* al incubarse en medio líquido.

Para la evaluación se emplearon las cepas del hongo *M. fijiensis* EASGK09, *M. fijiensis* EASGK10, *M. fijiensis* EASGK11 y *M. fijiensis* EASGK14 aisladas de las hojas de banano cv. Gran Enano y se siguió la metodología de Dupont, 1982 [11]. Como control positivo se utilizaron los SLC de *B. subtilis* UA321 y como control absoluto se empleó caldo fresco estéril.

La prueba de platos duales se realizó con la metodología modificada de Riveros [12]. Se evaluó el porcentaje de inhibición de crecimiento de las colonias del hongo sobre PDA (Merck, suplementado con cloranfenicol: 200 ppm y ampicilina: 250 ppm). Las pruebas de inhibición del tubo germinativo se realizaron con la técnica modificada del esmalte descrita por Talavera [13].

Se evaluó la inhibición en el crecimiento del tubo germinativo de las ascosporas del hongo descargadas sobre discos de hoja de Banano cv. Gran Enano sumergida previamente en los SLC. El porcentaje de inhibición del tubo germinativo se determinó considerando la germinación de las esporas del control absoluto como 100%.

Las bacterias seleccionadas como antagonistas fueron aquellas cuyos SLC presentaron porcentajes de inhibición en el crecimiento de *M. fijiensis* mayores que el control positivo *B. subtilis* UA321. Este proceso inicial de selección se llevó a cabo con 648 BAFEs. A las BAFEs seleccionadas como antagonistas de *M. fijiensis* se les repitió la prueba de microplatos y se les realizaron las pruebas de platos duales e inhibición de ascosporas, empleando los SLC obtenidos de una fermentación en medio de cultivo MOLP [14]. Para estos ensayos, se utilizó la cepa *M. fijiensis* EASGK14 y los mismos controles del tamizaje inicial.

Finalmente, a las BAFEs antagonistas de *M. fijiensis* se les realizaron tres pruebas adicionales contra el hongo: microplatos con el medio MOLP, platos duales e inhibición de ascosporas y se realizó un promedio ponderado de las tres pruebas, dándole un peso de 60%, 20% y 20% a las pruebas de ascosporas, platos duales y microplatos respectivamente.

El mayor peso adjudicado a la prueba de ascosporas se relaciona con la importancia de atacar el hongo antes de penetrar los estomas de la hoja. Los porcentajes de inhibición en el crecimiento del micelio y en la germinación de las ascosporas de *M. fijiensis* generados por *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 *in vitro* se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Porcentajes de inhibición generados por *Bacillus* sp. contra *M. fijiensis*

Microorganismo	Inhibición del crecimiento del micelio /Técnica:		Inhibición en la germinación de ascosporas ^c	Promedio ponderado de las tres pruebas ^d
	Microplatos en MOLP (%) ^a	Platos duales (%) ^b		

<i>B. subtilis</i> EA-CB0015	89 ± 1	78 ± 1	98 ± 1	92
<i>B. amyloliquefaciens</i> EA-CB0959	89±0	62±2	77±0	76

^a Inhibición de crecimiento del micelio de *M. fijiensis* por la técnica de microplatos con caldo MOLP con 2 réplicas y 4 repeticiones por tratamiento del experimento realizado 2 veces en el tiempo.

^b Inhibición de crecimiento del micelio de *M. fijiensis* por la técnica de platos duales en PDA con 2 réplicas y 30 repeticiones por tratamiento del experimento realizado 2 veces en el tiempo.

^c Inhibición de la germinación de las ascosporas de *M. fijiensis* con dos réplicas por tratamiento.

^d Promedio de las tres pruebas de antagonismo: ascosporas (60%), microplatos (20%) y platos duales (20%).

El porcentaje de inhibición en el crecimiento de *M. fijiensis* obtenidos con los SLC de *B. subtilis* EA-CB0015 del medio D fue 1,5 veces superior a la obtenida con el medio CIB ($53,0 \pm 4,0$ %), 80,9 veces superior a la obtenida con el medio Finley and Field's ($1,0 \pm 1,6$ %) (FIG. 8). Los porcentajes de inhibición en el crecimiento de *M. fijiensis* obtenidos con los SLC de los medios Molp y TSB fueron estadísticamente similares al obtenido con el medio D.

La inhibición *in vitro* del crecimiento de *M. fijiensis* por los SLC de las BAFEs aisladas sugieren una afectación a las estructuras celulares del hongo. Por esta razón se evaluó la presencia de cambios morfológicos en el micelio y las ascosporas de *M. fijiensis* por microscopía óptica.

Se observó que los SLC de todas las bacterias antagonistas produjeron cambios morfológicos evidenciados por abultamientos en las hifas del micelio e inhibiciones en la germinación del tubo de las ascosporas en comparación con el control absoluto.

EJEMPLO 6. Composiciones biocidas que comprenden *Bacillus subtilis* EA-CB0015

Para el desarrollo de las composiciones biocidas de la invención se realizó una selección previa de los adyuvantes y se determinaron las combinaciones que generaran las mezclas más estables y las proporciones de cada uno de los componentes en la mezcla, evaluando aspectos como la aparición de fases y presencia de precipitados. Los ayudantes seleccionados y sus funciones se ilustran en la Tabla 2.

Tabla 2. Adyuvantes de las diferentes composiciones.

Ayudante ^a	Producto ^b	Formulación ^c	Función ^d
Aceite	Aceite de girasol	EM; BA	Da cuerpo a la formulación. Evita disecación del microorganismo.
	Aceite de soya	EM; BA	
	Aceite de canola	EM; BA	
Surfactante	Tween 20	EM; MH ₂ O	Mejora la cobertura de la superficie hidrofóbica de la planta.
	Tween 80	EM; MH ₂ O	Facilitar la mezcla de las esporas hidrofóbicas con el agua.
	Triton x-100	EM; MH ₂ O	Facilitar la mezcla de las esporas hidrofóbicas con el agua.
Adherente	Goma xhantan	MH ₂ O; EM	Mejora la adherencia del microorganismo sobre la superficie de la hoja. Estabilizar la mezcla.
Dispersante	Alginato de sodio	MH ₂ O	Neutralizar interacciones entre partículas similares logrando una suspensión uniforme. Asegurar la liberación del microorganismo después de la aplicación
	Veguum	MH ₂ O	
	Carboximetil celulosa (CMC)	MH ₂ O	
Humectante	Glicerol	MH ₂ O	Aumenta el contenido de humedad del producto mediante la absorción de agua del aire. Evitar disecación del microorganismo.
Antimicrobiano	Ácido propiónico	MH ₂ O; EM	Evita degradación del producto por contaminación

^a Grupo de ayudantes necesarios para la mezcla.

^b Ayudantes seleccionados para la evaluación.

^c Composición de la cual hacen parte. EM: Emulsión, BA: Composición en base aceite, MH₂O: Mezcla base agua.

^d Función que tiene cada ayudante dentro de la mezcla.

Para la composición en forma de emulsión, se determinó la mejor combinación de aceite y surfactante, para lo que se empleó un diseño factorial 3 x 2 (factores: tipo de aceite y tipo de emulsión, con tres niveles cada uno), la proporción en la que se evaluaron los componentes fue constante: 20 mL aceite, 1 µmol surfactante y 80 mL de agua.

Una vez seleccionado el surfactante y tipo de aceite se realizó un diseño de mezclas ternario con punto al centro con el fin de determinar en qué proporción debía agregarse el aceite de girasol, el surfactante y un dispersante (goma xhantan) para obtener una emulsión altamente estable.

Los rangos evaluados fueron 0,3 a 1,0%, 0,0 a 5,0%, y 14,0 a 19,6% para la goma xhantan, el surfactante y el aceite respectivamente. Las proporciones fueron seleccionadas según lo

reportado por Burges (1998) y Brar y colaboradores (2006) [15, 16]. A las mezclas adicional a los componente evaluados, se les adicionó un buffer de fosfatos 3M de pH 5,0 (3%) para contrarrestar los cambios drásticos del pH al adicionar los ayudantes, ácido propiónico (0,5%) como agente antimicrobiano y agua c.s.p 100%.

Para la mezcla con base agua se determinó cuál de las combinaciones de dispersante, surfactante y adherente era las más estables empleando un diseño factorial fraccionado con el que se obtenían ocho mezclas, las mezclas evaluadas en el diseño fraccionado para la selección de ayudantes de la mezcla base agua se presentan en la Tabla 3. El porcentaje restante fue completado con agua.

Tabla 3. Mezclas evaluadas en el diseño fraccionado para la selección de adyuvantes de la composición mezcla base agua (MH₂O)

Mezcla	A (goma X)	B (CMC)	C (veggum)	AB (alginato)	AC (tween 20)	BC (tween 80)	ABC (triton X-100)
1	-	-	-	+	+	+	-
2	+	-	-	-	-	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	-	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	+
6	+	-	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+
- ^a	0,1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
+ ^b	0,5%	1,25%	1,25%	1,25%	2,50%	2,50%	2,50%

^a Nivel mínimo en la que se evalúa cada factor.

^b Nivel máximo en el que se evalúa cada factor

* Los signos + y - denotan el nivel en el que cada factor se evalúa en la mezcla.

La mezcla 3 fue seleccionada como la más estable y fue sometida a un diseño de mezclas ternario con punto al centro con el fin de determinar las proporciones del CMC, el Tween 20® y el Triton X-100®. Los rangos evaluados fueron 0,5% al 3,5% para los tres componentes evaluados, los rangos fueron determinados según reportes de Burges (1998) y de Brar y colaboradores (2006) [16, 15].

La concentración de la goma xhantan se dejó constante en el nivel más bajo (0,1%) evaluado en el diseño factorial fraccionado ya que todas las mezclas que se presentaron estables contenían este aditivo en dicha concentración. A las mezclas del diseño de mezclas, adicional a los componente evaluados, se les agrego buffer fosfato 3M pH 5,0 (3%) para contrarrestar los cambios drásticos del pH al adicionar los ayudantes, ácido propiónico (0,5%) como agente antimicrobiano [15] y agua c.s.p 100%.

Las mezclas con mayor estabilidad en el tiempo para la emulsión y la mezcla base agua fueron seleccionadas. La proporción de agua fue remplazada por cultivo bacteriano de *B. subtilis* EA-CB0015, cuya concentración bacteriana final se ajustó a $2 \pm x 10^8$ UFC/mL.

Adicional a las dos composiciones mencionadas anteriormente, se evaluaron suspensiones bacterianas (SB) que consistían únicamente del cultivo bacteriano obtenido después de las 72 horas de fermentación acondicionados con buffer fosfato 3M pH5 (3M K₂HPO₄, 3M KH₂PO₄) (3%) y ácido propiónico (0,5%). Las composiciones de las diferentes formulaciones evaluadas con *B. subtilis* EA-CB0015 se ilustran en la Tabla 4.

Tabla 4. Composiciones de diferentes formulaciones con base en *Bacillus subtilis* EA-CB0015.

FORMULACIÓN	SIGLA	COMPOSICIÓN
Suspensión bacteriana	SB	Cultivo bacteriano (94,25% v/v-98,75% v/v), buffer fosfato 3 M pH 5 (1% v/v-5% v/v), y ácido propiónico (0,25% v/v-0,75% v/v v/v)

Composición base agua	MH ₂ O	Cultivo bacteriano (86,6% v/v-93,2% v/v), carboximetil celulosa de sodio CMC (2% w/v-4% w/v), buffer fosfato 3 M pH 5 (1% v/v-5% v/v), glicerol (1% v/v-4% v/v), Tween 20® (0,25% v/v-0,75% v/v), triton X-100 (0,25% v/v-0,75% v/v), ácido propiónico (0,25% v/v-0,75% v/v) y goma xanthan (0,05% w/v-0,15% w/v).
Composición base emulsión	EM	Cultivo bacteriano (71,4% w/v-83,6% v/v), aceite de girasol (14% v/v-18% v/v), buffer fosfato 3 M pH 5 (1% v/v-5% v/v), Tween 80® (1% v/v-4% v/v), goma xanthan (0,2% w/v-0,9% w/v) y ácido propiónico (0,25% v/v-0,75% v/v)

EJEMPLO 7. Evaluación de las composiciones biocidas de la invención

Las composiciones obtenidas en el Ejemplo 6 fueron empleadas para evaluar la capacidad antagonica contra las ascosporas de *M. fijiensis* y la viabilidad de *B. subtilis* EA-CB0015 en la formulación durante un tiempo de almacenamiento determinado (180 días).

Con respecto a la evaluación de la viabilidad de la bacteria en el tiempo, en la FIG. 9 se muestra una disminución paulatina de las UFC con el tiempo para todos los tratamientos, con una disminución más marcada para la emulsión a partir del tercer mes. La mezcla base agua y la suspensión bacteriana presentaron reducciones muy similares siendo menor la de la mezcla base agua. De acuerdo a lo anterior, las mejores composiciones en relación a la viabilidad de *B. subtilis* EA-CB0015 en la formulación durante el periodo de tiempo evaluado, son aquellas con base agua o las que tienen una suspensión bacteriana.

Para la evaluación del efecto de los formulados sobre el desarrollo de la Sigatoka negra en plantas de banano se realizó un experimento en el que se evaluaron la emulsión, la mezcla base agua y la suspensión de la bacteriana de *B. subtilis* EA-CB0015. Las composiciones fueron diluidas hasta una concentración de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL y se aplicaron por aspersión 30 gotas/cm² sobre la primera hoja completamente desdoblada después de la hoja bandera (hoja número uno), sobre la cual se realizó la evaluación.

La inoculación del patógeno se realizó mediante inoculación artificial adicionando 20 mililitros de una suspensión micelial de *M. fijiensis* de 10 días de edad a la hoja número uno. La inoculación del patógeno se hizo 24 horas antes de la aplicación de las composiciones de las BAFEs. El grado de severidad de la enfermedad fue determinado al cabo de 30 días de la aplicación de los formulados con la escala de Fouré (1982) [17] y se determinó el porcentaje de área de hoja necrosada empleando fotos de las hojas y el software Assess 1.0 para análisis de imágenes.

Para ambas mediciones se tomaron como control negativo los resultados obtenidos de la aplicación de agua estéril y como control positivo los datos reportados para el fungicida químico Dithane® y el fungicida biológico Rhapsody® empleados según las recomendaciones del comerciante. Los resultados obtenidos se ilustran en las FIG 10 y 11, donde se encontraron diferencias en el grado de severidad y en los porcentajes de área necrosada para los diferentes tratamientos evaluados según el análisis de varianza (valor $p < 0,05$).

Es notorio que la composición mezcla base agua fue el único tratamiento biológico que presentó un control de la enfermedad significativamente igual al control químico, Dithane®, para las dos variables de respuesta evaluadas. Este bioformulado redujo el grado de severidad hasta 2,9% y reportó un área de necrosis de un 2,3%, porcentaje de necrosis similar al obtenido por el control químico (1,0%).

El grado de severidad y porcentaje de área necrosada del control negativo fue de 4,2% y 16,3%, respectivamente. Los demás tratamientos evaluados no mostraron ningún control de la enfermedad, es decir, no presentaron diferencias significativas con el control negativo para ninguna de las dos variables analizadas.

EJEMPLO 8. Evaluación de propiedades fisicoquímicas, adherencia, resistencia a radiación UV y características de las composiciones de la invención.

La adherencia y la resistencia a la radiación UV de las composiciones del Ejemplo 6 fueron bajas comparadas con otros productos químicos del mercado. Para mejorar dichas propiedades, se llevó a cabo una selección inicial de adyuvantes. En la Tabla 5 se muestran los adyuvantes utilizados para el mejoramiento de las propiedades de adherencia y protección UV y el rango en el cuál fueron evaluados.

Tabla 5. Adyuvantes evaluados para el mejoramiento de la adherencia y protección UV de las composiciones de la presente invención.

Función	Tipo de Adyuvante	Concentración (% p/v)
Protector U.V.	TiO ₂ (Técnico)	0,5 - 1,5
Protector U.V.	ZnO ₂ (Técnico)	0,5 - 1,5
Protector U.V.	Alcohol polivinílico (PVA)	0,1 – 1,0
Adherente	Leche descremada (Skimmed)	0,1 - 1,5
Adherente	Pegal®	0,01 - 0,1
Adherente	Caseinato de sodio (CaNa)	0,1 - 1,0

Se tamizaron los adyuvantes empleando criterios de costo, disponibilidad en el mercado y compatibilidad con el bioformulado de la invención. Luego se realizó una evaluación de los adyuvantes previamente seleccionados a partir de un diseño de experimentos multifactorial, en el cual se identificaron los de mejor desempeño para cada criterio de evaluación en un determinado rango de concentraciones (FIG 12 y 13).

De acuerdo a la FIG. 12., la composición bacteriana base agua (MH₂O) de la invención suplementada con el adyuvante TiO₂ al 0.5% p/v mejoró la resistencia a la radiación UV logrando reducir la muerte celular de *B. subtilis* EA-CB0015 de un 55% a un 21.5% a los 120 min de exposición a la radiación UV. Con este hallazgo se desarrolló una nueva composición base agua en la cual se incorporó TiO₂ al 0.5% y se reemplazó el ácido propiónico por sorbato de potasio, composición denominada P2.

De la FIG. 13., se observa que la adición de caseinato de sodio y de leche descremada mejoraron significativamente la adherencia del producto a superficies hidrofóbicas. Por lo anterior se incorporó leche descremada a la composición base agua P2, nueva composición denominada P3.

Para determinar si la composición de *B. subtilis* EA-CB0015 puede actuar en combinación con las mezclas de fungicidas químicos se determinó la viabilidad de *B. subtilis* EA-CB0015 antes y después de someter la composición a las mezclas de tanque empleadas para el control de la Sigatoka negra en plantaciones comerciales. Con esta finalidad se tomó una muestra de 10 mL de la composición y se sometió a las diferentes mezclas de tanque descritas en la Tabla 6.

Tabla 6. Mezclas de la composición base agua con base en *Bacillus subtilis* EA-CB005 con diferentes fungicidas químicos.

Compuesto/ Tratamiento	Agua (%V/V)	Aceite agrícola (%V/V)	Dithane® (%V/V)	Pegal® (%V/V)	Clorotalonil® (%V/V)	Formulado (%V/V)	SICO® (%V/V)	SIGANEX® (%V/V)	Baycor ® (%V/V)	Impulse® (%V/V)	OPUS ® (%V/V)	Atlas® (%V/V)	Calixin ® (%V/V)
Mezcla 1	72,53	0	0	0	7,47	20	0	0	0	0	0	0	0
Mezcla 2	38,86	40,88	8,79	0,41	0	9,31	1,76	0	0	0	0	0	0
Mezcla 3	38,51	40,88	8,79	0,41	0	9,22	0	2,2	0	0	0	0	0
Mezcla 4	38,51	40,88	8,79	0,41	0	9,22	0	0	2,2	0	0	0	0
Mezcla 5	38,86	40,88	8,79	0,41	0	9,31	0	0	0	1,76	0	0	0
Mezcla 6	36,75	40,88	8,79	0,41	0	8,78	0	0	0	0	4,4	0	0
Mezcla 7	38,86	40,88	8,79	0,41	0	9,31	0	0	0	0	0	1,76	0
Mezcla 8	38,51	40,88	8,79	0,41	0	9,21	0	0	0	0	0	0	2,2

Para esta evaluación se empleó un diseño multifactorial 8 x 8, en donde el primer factor evaluado fue tipo de mezclas de tanque con 8 niveles, y el segundo fue el tiempo de exposición a las mezclas o tiempo de evaluación de la viabilidad con ocho niveles (0,0; 0,5; 1,5; 3,0; 6,0; 12,0 y 25,0 horas). Los resultados se compararon con el control biológico Rhapsody® y se utilizaron dos réplicas por tratamiento.

La variable de respuesta evaluada fue el número de UFC/mL en cada uno de los tiempos de evaluación. Adicionalmente, se determinó el t_{d50} , que corresponde al tiempo en que el 50% de la biomasa de *B. subtilis* EA-CB0015 pierde su viabilidad a causa de la exposición a cada una de las mezclas, utilizando para el análisis de los datos un diseño unifactorial, en donde el factor sería el porcentaje (%) de muerte celular.

También se determinó el porcentaje de muerte celular luego de 3 y 25 horas (3 horas corresponde al tiempo promedio que se demora una composición en ser aplicada luego de su preparación y 25 horas es el tiempo máximo que una composición permanece en los tanques de mezcla antes de ser aplicada).

En la Tabla 7 se muestra el t_{d50} (tiempo en que el 50% de las esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 pierden su viabilidad) y el porcentaje de muerte celular a las 3 y 25 horas para el formulado de *B. subtilis* EA-CB0015 en cada mezcla de fungicida. Para su producción, el cultivo es llevado junto con los respectivos ayudantes de la composición a un tanque agitado para ser mezclados. M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 y M8 denotan las diferentes mezclas fungicidas a las cuáles fueron sometidos los formulados.

Tabla 7. Porcentaje de muerte celular y t_{d50} de *B. subtilis* EA-CB0015 después de mezclado con diferentes mezclas de fungicidas químicos.

Mezcla	t_{d50} MH₂O (horas)	% de muerte celular a las 3 horas	% de muerte celular a las 25 horas
M1	>25	3,7	24,6

M2	>25	18,6	10,6
M3	>25	32,1	25,4
M4	>25	25,9	22,0
M5	>25	16,3	36,4
M6	>25	7,2	28,1
M7	>25	17,0	17,4
M8	>25	6,0	6,5

En la tabla anterior se observa que para todas las mezclas fungicidas la composición de *B. subtilis* EA-CB0015 presentó un t_{d50} mayor a 25 horas, alcanzando reducciones promedio de solo el 20,1 % en la viabilidad. Además, dado que en la composición las reducciones de la viabilidad fueron inferiores al 50%, muy probablemente la composición de la presente invención le brinda protección extra al *B. subtilis* EA-CB0015, lo que le permite conservar la viabilidad durante largos periodos de exposición a mezclas fungicidas.

En relación a los porcentaje de pérdida de la viabilidad, se observó que en condiciones ordinarias (3 horas) las mezclas M2 (SICO®), M3 (Siganex®) y M4 (Baycor®), presentaron los mayores índices de reducción de la viabilidad bacteriana en la composición, en tanto que en condiciones extraordinarias (25 horas) los mayores índices de reducción se registraron en las mezclas M1 (Bravonil®), M3 (Siganex®), M5 (Bumper®) y M6 (Opus®).

EJEMPLO 9. Evaluación del efecto sobre la severidad de la Sigatoka negra de las composiciones de la invención. Pruebas en invernadero y en campo.

Se realizó una evaluación del efecto de la composición bacteriana base agua de *B. subtilis* EA-CB0015 sobre la Sigatoka negra en condiciones de invernadero. Para ello se emplearon plantas de banano c.v. Williams de 4 meses de edad y la inoculación del patógeno se hizo de manera artificial aplicando una suspensión micelial del hongo *M. fijiensis* a la hoja número uno de la planta. La obtención de micelio de *M. fijiensis* para la inoculación de las plantas se hizo siguiendo la metodología de descarga de ascosporas utilizada por Cenibanano [11].

La aplicación de las composiciones se realizó un día después de la inoculación de las plantas con el patógeno. Las composiciones fueron diluidas hasta una concentración de $1,0 \times 10^8 \pm 0,1$ UFC/mL y se aplicaron utilizando un aerógrafo de la referencia *Mini Spray gun with cup K-3®* con aspersor en abanico conectado a un compresor de 30 psi y calibrado para asperjar 50 gotas/cm² a una altura de 30 cm. Para la fumigación se hizo un solo paso por el haz y el envés de las hojas infectadas a una altura de 30 cm, garantizando una concentración mínima de 50 gotas/cm².

Para este experimento se empleó un diseño unifactorial en el cuál se evaluó la composición base agua (MH₂O y P3), un control químico Bravonil® en agua, un control biológico, Serenade® ($1 \times 10^8 \pm 0,1$ UFC/ml) y agua estéril como control absoluto.

El desarrollo de la enfermedad se midió al mes de haber infectado las plantas. Se determinó el grado de infección utilizando la escala de Fouré (1982) [17] y el área necrosada con la ayuda de una cámara Samsung de 8 Mega-pixels y el software de procesamiento de imágenes Axio Visio® 4.2 de Zeiss®.

A partir del análisis de varianza ANOVA se encontró que había diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados. Para determinar la diferencia entre éstos se utilizó la prueba de rangos múltiples por el método de Tukey. Los porcentajes de área necrosada para los diferentes tratamientos se ilustran en la FIG. 14.

Como se observa en la FIG 14, la composición mezcla base agua (MH₂O y P3) de *B. subtilis* EA-CB0015 de acuerdo a la presente invención y el control positivo Bravonil 720® redujeron significativamente el porcentaje de área necrosada de las hojas de banano con porcentajes de área necrosada de 1,67% y con un 1,26 % respectivamente. En la FIG. 15 se muestran fotografías de hojas tratadas con cada uno de los tratamientos, donde se puede apreciar visualmente la diferencia en la apariencia de las hojas post-tratamiento. Las fotografías fueron seleccionadas de porciones de hoja promedio.

Con el fin de evaluar la eficacia de la composición mezcla base agua de *B. subtilis* EA-CB0015 se evaluó el producto a nivel de campo en un lote de 1,5 ha, tres parcelas por tratamiento. Cada parcela de 220 m² contenía 42 plantas, de las cuales se tomaron seis plantas centrales por parcela para la evaluación de la enfermedad. Los tratamientos fueron aplicados cada 11 días con una fumigadora de motor (Stihl® SR-420) de 15 L de capacidad y lanzas a 60 gotas/cm² de hoja.

La evaluación de la enfermedad de la Sigatoka negra se realizó mediante dos metodologías de preaviso biológico y severidad por Stover. En la FIG. 16 se observa el área bajo la curva (ABC) de la severidad de la Sigatoka negra obtenida durante 14 semanas de evaluación. En dicha figura se observa que las dos composición base agua de *B. subtilis* EA-CB0015 (MH₂O y P3) redujeron la severidad la enfermedad sin diferencias significativas con los controles químicos (Bravonil®, Dithane®) y biológico (Serenade®).

EJEMPLO 10. Efecto de *B. subtilis* EA-CB0015 sobre *Botrytis cinérea* en pompón

Se realizó una evaluación del efecto de *B. subtilis* EA-CB0015 sobre *Botrytis Cinerea* en pompones. Los pompones se desinfectaron por 1 minuto en hipoclorito de sodio al 1%, se lavaron con agua destilada estéril y finalmente se dejaron secar. Posteriormente cada flor se colocó en un vaso desechable y se asperjó cada tratamiento con un aerógrafo. Transcurridas 24 h de la aplicación de los tratamientos se realizó la aplicación del patógeno (*B. cinerea*) a una concentración de 5000 esporas/mL con un atomizador (2 mL) y se incubaron a una temperatura promedio de 20°C y una humedad relativa superior al 90%.

La medición de la enfermedad se realizó al cabo de 7 días de acuerdo a porcentaje de pétalos afectados y a la severidad. En la FIG. 17, se puede apreciar que la suspensión de esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 (T1) disminuyó la severidad de la enfermedad en un 84% con relación al control no tratado (C).

EJEMPLO 11. Efecto de *B. subtilis* EA-CB0015 sobre *Colletotrichum* sp. en Tomate de Árbol (*Cyphomandra betacea*).

Se realizó una evaluación del efecto de *B. subtilis* EA-CB0015 sobre *Colletotrichum* sp. en tomate de árbol. Para ello los tomates se desinfectaron por 2 minutos en etanol al 70% y se lavaron con agua destilada estéril dejándolos secar.

Luego se realizó una herida con un punzón en la región del ecuador del fruto no superior a 2 mm de profundidad y se aplicó 25 µL de agua (C) o de esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 (T1, concentración 1×10^7 UFC/mL). Transcurridas 24 horas se hizo inoculación artificial de 15 µL *Colletotrichum* sp. EAHP-007 en la herida a una concentración de 400.000 esporas/mL.

En la FIG. 18 se observan los resultados de la suspensión de esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 sobre el diámetro de la lesión generado por *Colletotrichum* sp EAHP-007 en el fruto, logrando un control efectivo de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Shoda, «Bacterial Control of Plant Disease,» *Journal of Bioscience and Bioengineering*, pp. 515-521, 200.
- [2] H. P. Bais, R. Fall y J. M. Vivanco, «Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production,» *Plant Physiology*, vol. 134, pp. 307-319, 2004.
- [3] T. Stein, «*Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions,» *Molecular Microbiology*, vol. 56, pp. 854-857, 2005.
- [4] M. Ongena y P. Jacques, «*Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 16, n° 3, pp. 115-125, 2008.

- [5] G. Winkelmann, R. Allgaier y G. Jung, «Iturin AL A New Chain Iturin A possessing an unusual high content of C16 - β - amino acids,» *Journal of Antibiotics*, vol. 16, pp. 1451-1457, 1983.
- [6] N. Vanittanakon y W. Loeffler, «Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3,» n° 7, pp. 888-901, 1986.
- [7] F. Peypoux, J. M. Bonmatin y J. Wallach, «Recent trends in the biochemistry of surfactin,» vol. 51, pp. 553-563, 1999.
- [8] Y. H. Wei, L. F. Wang , J. S. Changy y S. S. Kung, «Identification of of induced acidification in in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation,» *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 96, n° 2, pp. 174-178, 2003.
- [9] X. J. Tang , G. Q. He, Q. H. Chen, X. Y. Zhang y M. Ali, «Medium optimization for the production of thermal stable beta-glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology,» *Bioresource Technology*, vol. 93, n° 2, pp. 175-181, 2004.
- [10] J. Pelaez, L. E. Vasquez, T. J. Diaz, D. A. Castañeda, E. Rodríguez y R. E. Arango, «Use of a micro title plate dilution assay to measure activity of antifungal compounds against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet,» *evista Facultad Nacional de Agronomia*, vol. 59, n° 2, pp. 4325-3433, 2006.
- [11] Dupont, «Técnicas mejoradas para el manejo e identificación,» Boletín Técnico E55786,, 1982.
- [12] A. G. C. I. y. G. A. Riveros, «Microbiological control of black leaf streak disease,» de *Mycosphaerella leaf spot disease of bananas: present status and outlook*, Montpellier, INIBAP, 2003, pp. 287-295.
- [13] S. Talavera, E. Bustamante, R. González y V. Sánchez, «Selección y evaluación en laboratorio y campo de microorganismos glucanolíticos antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis*,» *Manejo Integrado de Plagas*, vol. 47, pp. 24-30, 1998.

- [14] P. Jacques, C. Hbid, J. Destain, H. Razafindralambo, M. Paquot, E. De Pauw y P. Thonart, «Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman Design,» *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vols. %1 de %277-79, pp. 223-233, 1999.
- [15] S. K. Brar, M. Verma , R. D. Tyagy, J. R. Valero y R. Y. Surampalli, «Screening of different Adjuvants for Waste/water sludge-based *Bacillus thuringiensis* formulation,» *Microbial Control*, vol. 99, nº 4, pp. 1065-1079, 2006.
- [16] H. Burges, Formulation of microbial biopesticidas, beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments, USA: Kluwer Academic Publishers, 1998.
- [17] E. Foure, «Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Comportement des variétés. Etude de la sensibilite varietale des bananiers et plantains e *Mycosphawerella fijiensis* Morelet au Gabomn (maladie desreies noires). I-Incubation et evolution de la maladie,» *Fruits*, vol. 37, pp. 749-771, 1982.
- [18] G. Holz, S. Coertze y B. Williamson, «The Ecology of Botrytis on Plant Surfaces,» de *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Netherlands, Springer, 2007, pp. 9-27.
- [19] AgraQuest, «Serenade,» 2009. [En línea]. Available: www.agraquest.com. [Último acceso: 17 03 2010].
- [20] P. Tudzynski y L. Kokkelink, «). Botrytis cinerea: Molecular Aspects of a Necrotrophic Life Style,» de *Plant Relationships*, Berlin, Springer, 2009, pp. 29-50.

Se debe entender que la presente invención no se halla limitada a las modalidades descritas e ilustradas, pues como será evidente para una persona versada en el arte, existen variaciones y modificaciones posibles que no se apartan del espíritu de la invención, el cual solo se encuentra definido por las siguientes reivindicaciones:

REIVINDICACIONES

- 1) Un procedimiento para incrementar la producción de biomasa y metabolitos de microorganismos de la especie *Bacillus sp*, que comprende cultivar el microorganismo en un medio de cultivo adecuado bajo condiciones ambientales específicas.
- 2) Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste de *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*.
- 3) Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde el microorganismo es *Bacillus subtilis* EA-CB0015 o *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959.
- 4) Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde el medio de cultivo adecuado comprende uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste de carbohidratos, extracto de levadura, sulfato de amonio, peptona, sales que contengan magnesio, azufre, manganeso, cloro, potasio, fósforo, calcio y sodio, bien sea en una matriz sólida, semisólida o líquida.
- 5) Un procedimiento según la Reivindicación 4, donde el medio de cultivo adecuado tiene la siguiente composición:

COMPONENTE	Concentración (g/L)
Glucosa	30,0 - 35,0
Extracto de levadura	30,0 - 35,0
MnSO ₄	0,025 - 0,05
Cloruro de calcio	0,02 - 0,04
Sulfato de amonio	0,80 - 1,20
MgSO ₄	3,50 - 5,00
HPO ₄	0,40 - 0,60

KH ₂ PO ₄	0,40 - 0,60
---------------------------------	-------------

- 6) Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde las condiciones ambientales específicas incluyen, pH, temperatura, velocidad de agitación, tiempo de fermentación y aireación.
- 7) Un procedimiento según la Reivindicación 6, donde las condiciones ambientales específicas del cultivo son:

Velocidad de agitación	400 - 600 rpm
Aireación	1 - 5 vvm
pH	5,5 - 7,5
Temperatura	20 - 40 °C
Tiempo de fermentación	10 – 100 horas

- 8) Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde adicionalmente se separa la biomasa obtenida mediante centrifugación y/o microfiltración.
- 9) Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde adicionalmente se extraen los metabolitos mediante extracción con solventes, precipitación, adsorción o cromatografía.
- 10) Biomasa de *Bacillus subtilis* o de *Bacillus amyloliquefaciens* obtenida mediante un procedimiento según las Reivindicaciones 1 a 8.
- 11) Biomasa de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 obtenida mediante un procedimiento según las Reivindicaciones 1 a 8.

- 12) Biomasa de *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 obtenida mediante un procedimiento según las Reivindicaciones 1 a 8.
- 13) Metabolitos de *Bacillus subtilis* y/o metabolitos de *Bacillus amyloliquefaciens*, obtenidos mediante un procedimiento según las Reivindicaciones 1 a 9.
- 14) Metabolitos de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y/o metabolitos de *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959, obtenidos mediante un procedimiento según las Reivindicaciones 1 a 9.
- 15) Metabolitos de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y/o *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 según la Reivindicación 14, caracterizados por ser lipopéptidos de la familia de las surfactinas, iturinas y fengicinas.
- 16) Metabolitos de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 según la Reivindicación 15, donde los lipopéptidos de la familia de las fengicinas corresponden a fengicinas C de fórmula general:



en donde R corresponde a una cadena hidrocarbonada de 14 a 18 carbonos saturada o insaturada.

- 17) Metabolitos de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y/o metabolitos de *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 según las Reivindicaciones 13 a 16, con actividad antimicrobiana.
- 18) Una composición que comprende biomasa de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 según la Reivindicación 11 y/o sus metabolitos, junto con un vehículo agroquímicamente aceptable.

- 19) Una composición que comprende biomasa de *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 según la Reivindicación 12 y/o sus metabolitos, junto con un vehículo agroquímicamente aceptable.
- 20) Una composición que comprende metabolitos de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y/o metabolitos de *Bacillus amyloliquefaicens* EA-CB0959 según la Reivindicación 14, junto con un vehículo agroquímicamente aceptable.
- 21) Una composición según cualquiera de las Reivindicaciones 18 a 20, que adicionalmente comprende uno o más agentes biocidas seleccionados del grupo que consiste de anilino pirimidinas, bitartenoles, esteroides, difeconazol, tebuconazole, epoxiconazole, mancozeb y clorotoloni.
- 22) Una composición según cualquiera de las Reivindicaciones 18 a 21, que comprende:

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
Cultivo de <i>Bacillus</i> sp.con una concentración de 7,0 a 18,0 g/L	86,6% - 93,2% v/v
Carboximetilcelulosa sódica	2,0 - 4,0 p/v
Buffer fosfato 3M pH 5	1,0 - 5,0 v/v
Glicerol	1,0 - 4,0 v/v
Tween 20	0,25 - 0,75 v/v
Triton X100	0,25 - 0,75 v/v
Sorbato de Potasio	0,01 - 0,1 v/v
Goma Xanthan	0,05 - 0,15 p/v
Leche descremada	0,20 - 1,50 p/v
Dióxido de Titanio	0,03 - 1,00 p/v

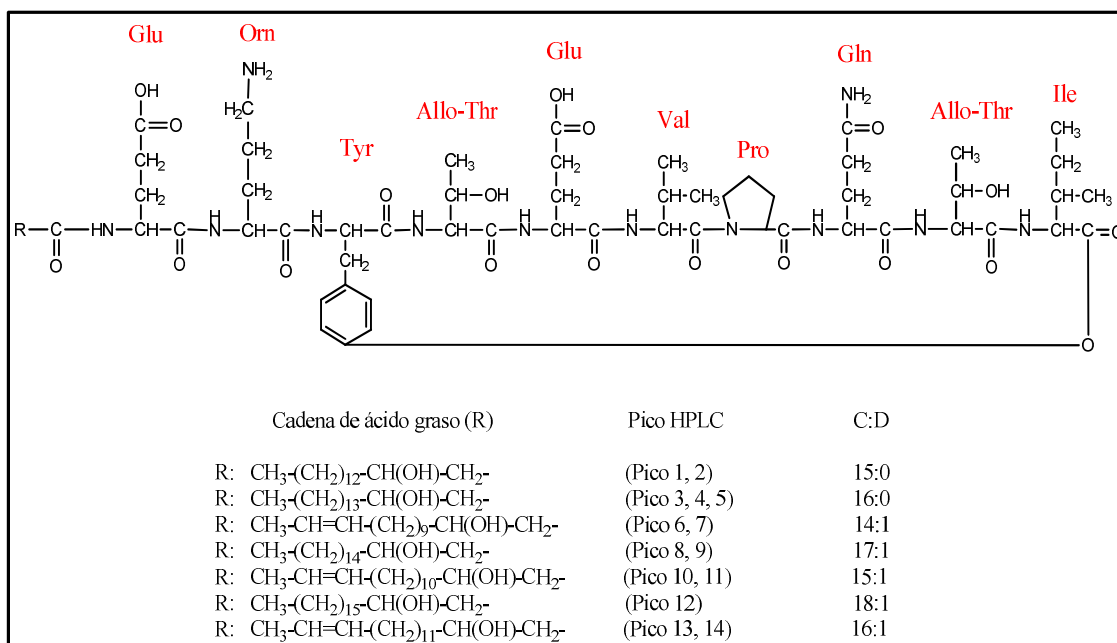
- 23) Uso de biomasa de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y/o de biomasa de *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 según las Reivindicaciones 11 y 12, para el control de

fitopatógenos tales como *Mycosphaella fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum sp.*, *Monilia sp.* *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*.

- 24) Uso de metabolitos de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y/o *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 según la Reivindicación 14, para el control de fitopatógenos tales como *Mycosphaella fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum sp.*, *Monilia sp.* *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*.
- 25) Uso de una composición según las Reivindicaciones 18 a 22, para el control de fitopatógenos tales como *Mycosphaella fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum sp.*, *Monilia sp.* *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*.
- 26) Un método para el tratamiento de cultivos contra agentes fitopatógenos que comprende la aplicación de una cantidad efectiva de biomasa de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y/o biomasa *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 según las Reivindicaciones 11 y 12.
- 27) Un método para el tratamiento de cultivos contra agentes fitopatógenos que comprende la aplicación de una cantidad efectiva de metabolitos de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y/o *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 según la Reivindicación 14.
- 28) Un método para el tratamiento de cultivos contra agentes fitopatógenos tales como *Mycosphaella fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum sp.*, *Monilia sp.* *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*, que comprende la aplicación de una cantidad efectiva de una composición según las Reivindicaciones 18 a 22.

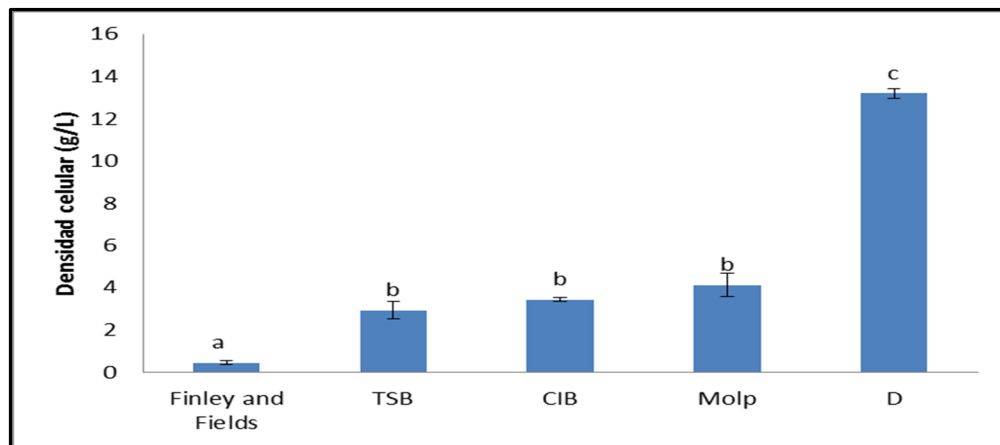
FIGURAS

FIG. 1



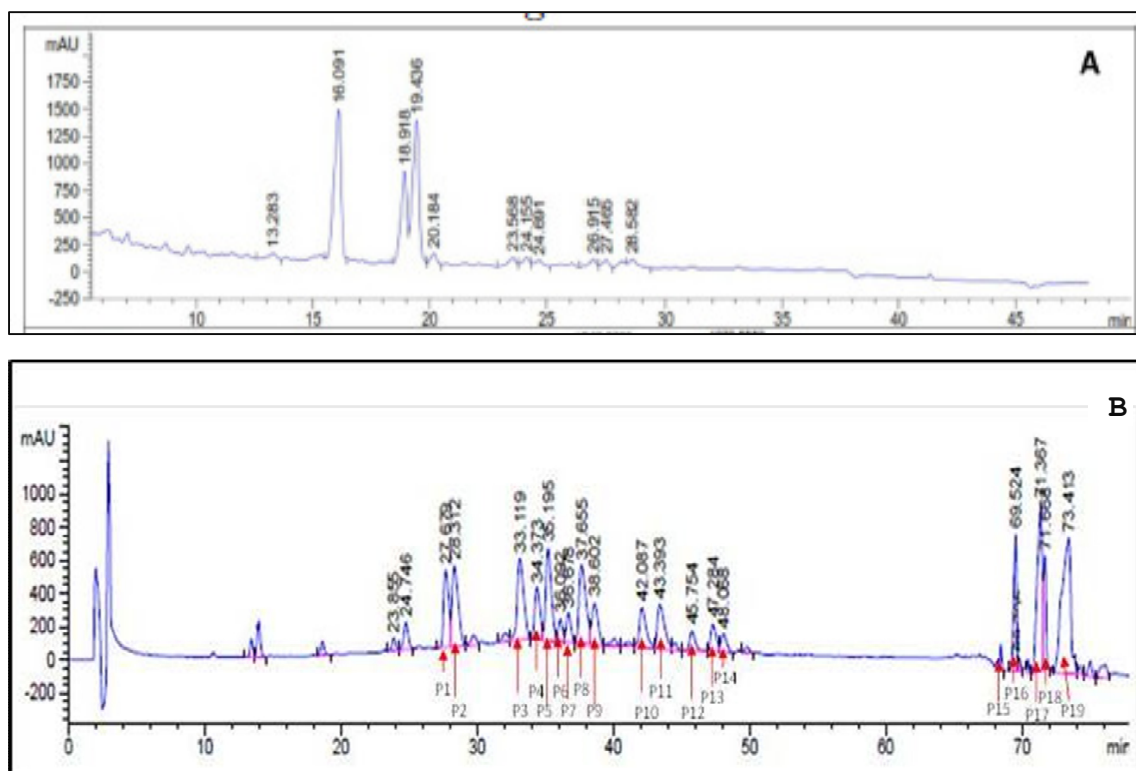
(C:D: C denota el número de carbonos y D el número de insaturaciones)

FIG. 2



Letras diferentes denotan diferencias significativas (valor $P < 0.05$)

FIG. 3



Fracción eluida con A) 70% de metanol y B) 100% de metanol en columna SPE C18.

FIG. 4

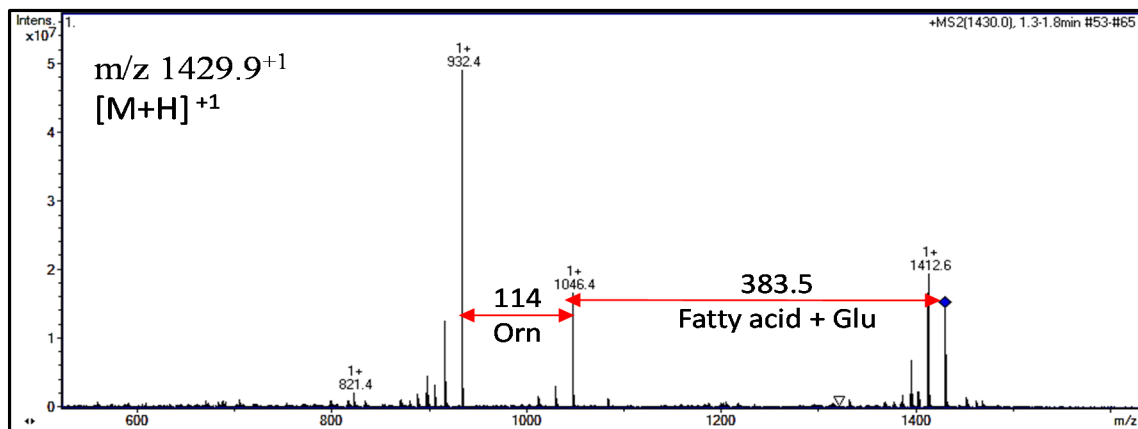


FIG. 5

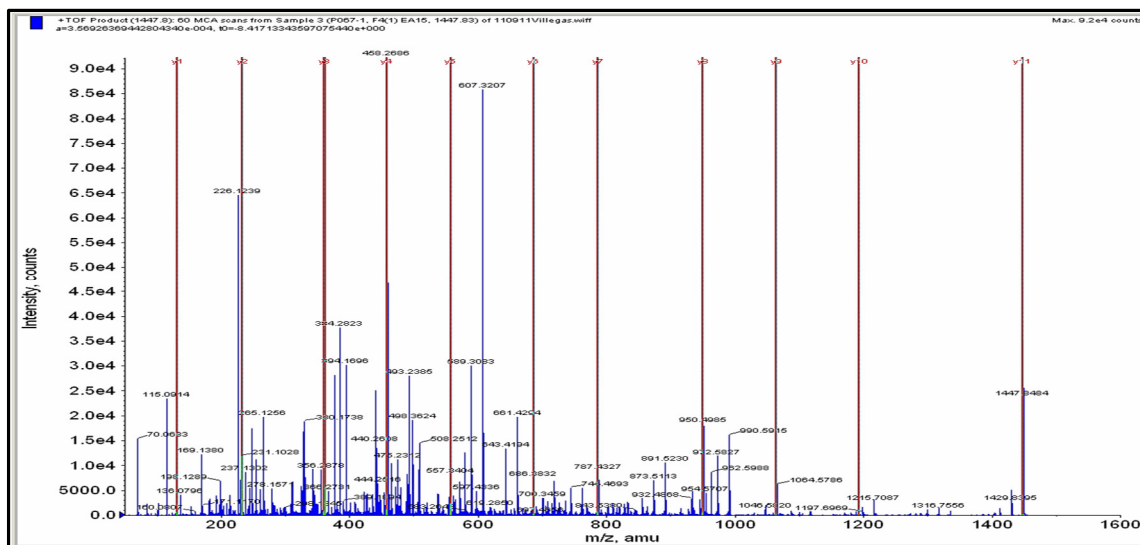


FIG. 6

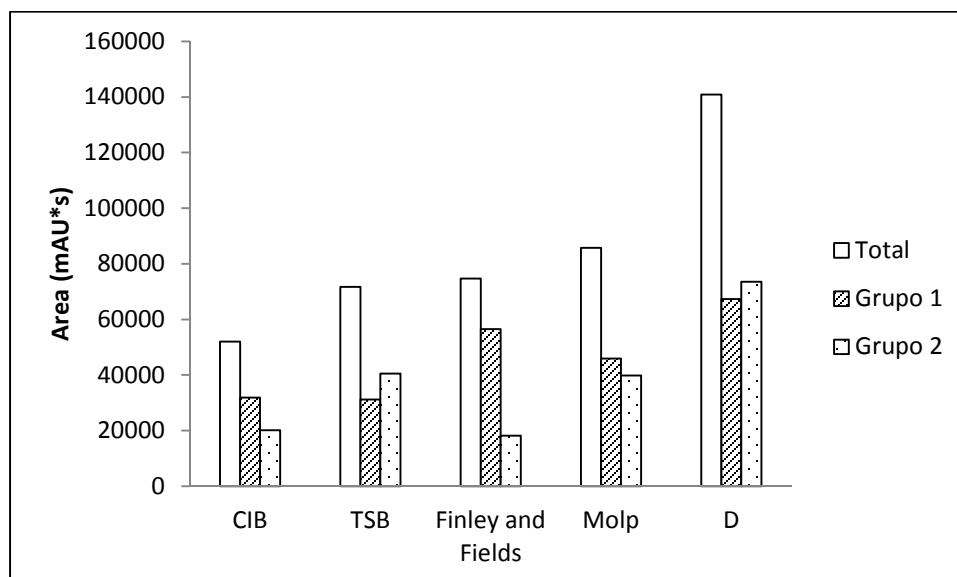
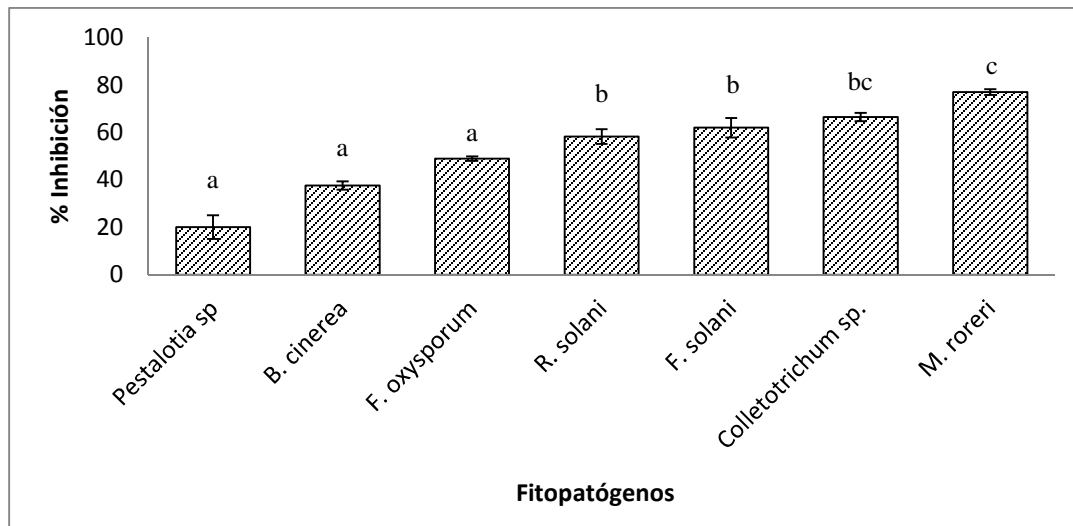
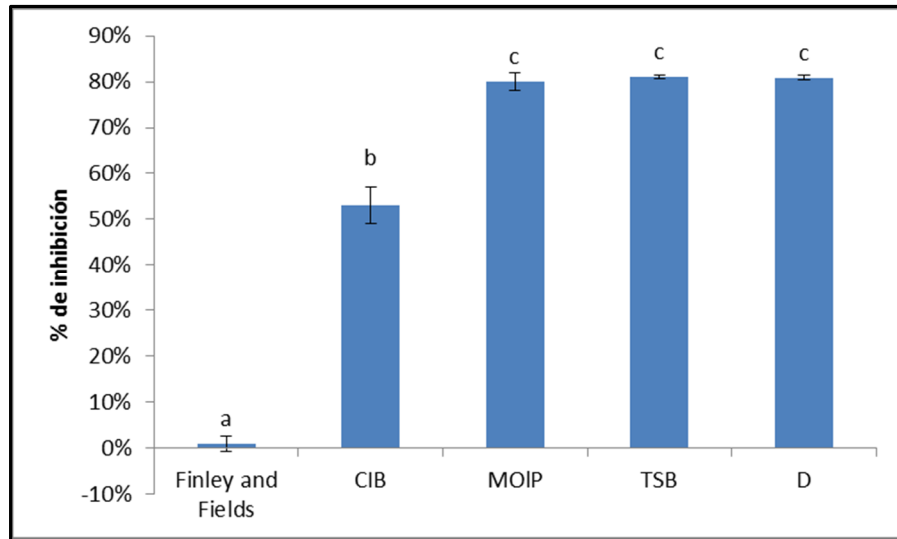


FIG. 7



Letras diferentes denotan diferencias significativas (valor $P < 0.05$)

FIG. 8



Letras diferentes denotan diferencias significativas (valor $P < 0.05$)

FIG. 9

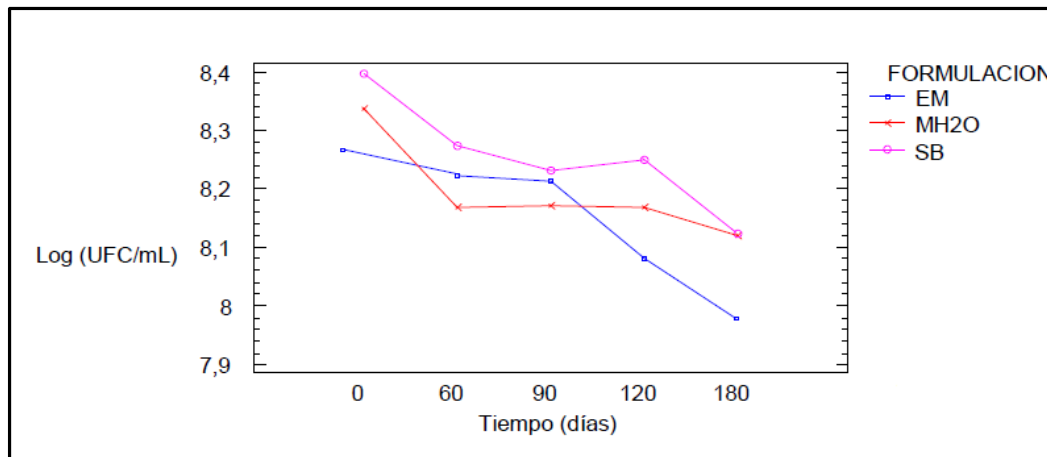
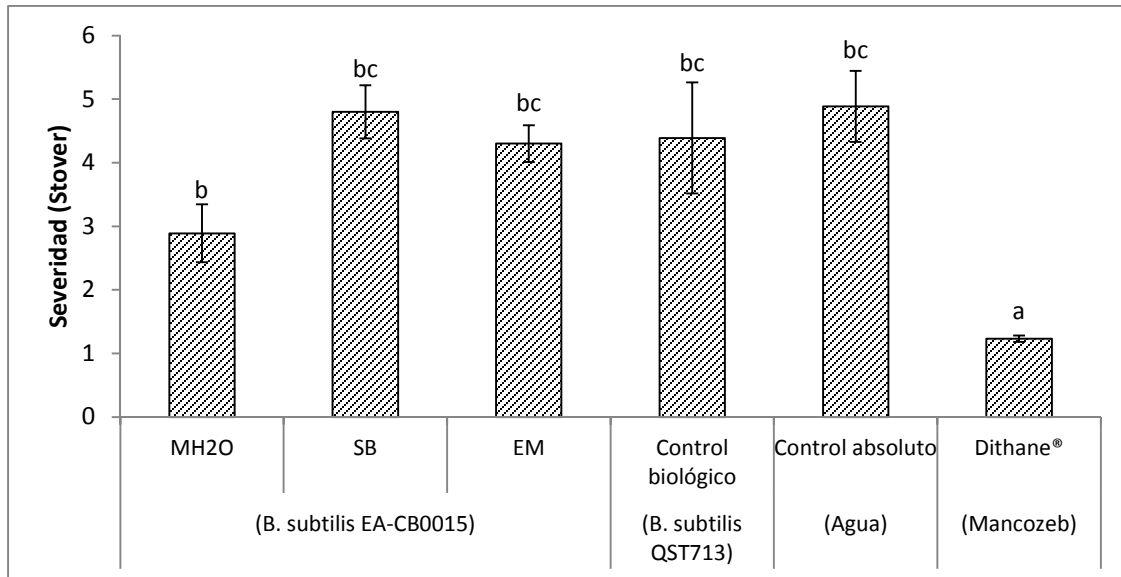
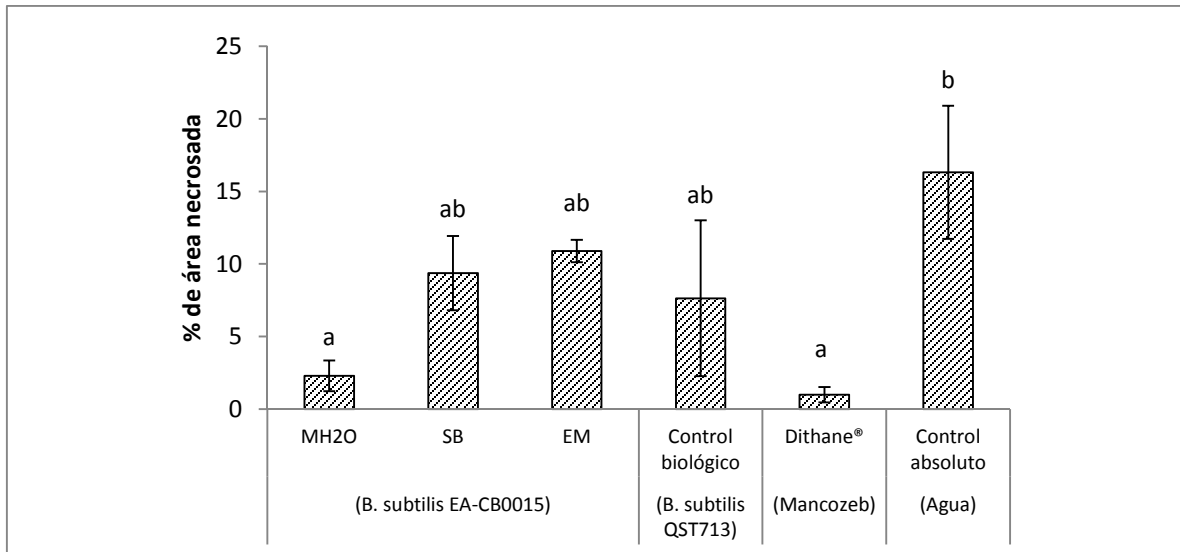


FIG. 10



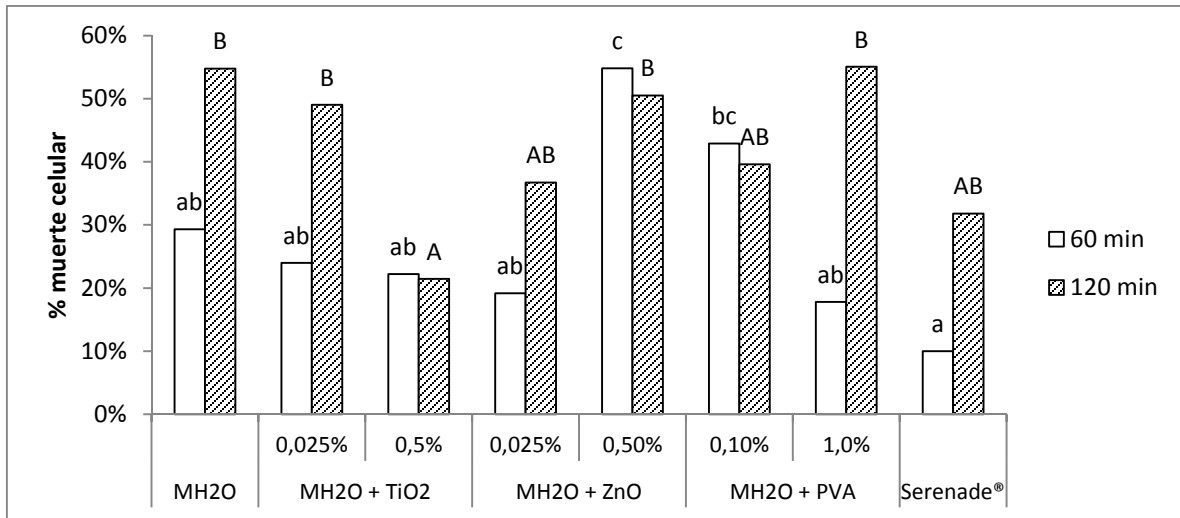
Letras diferentes denotan diferencias significativas (valor $P < 0.05$)

FIG. 11



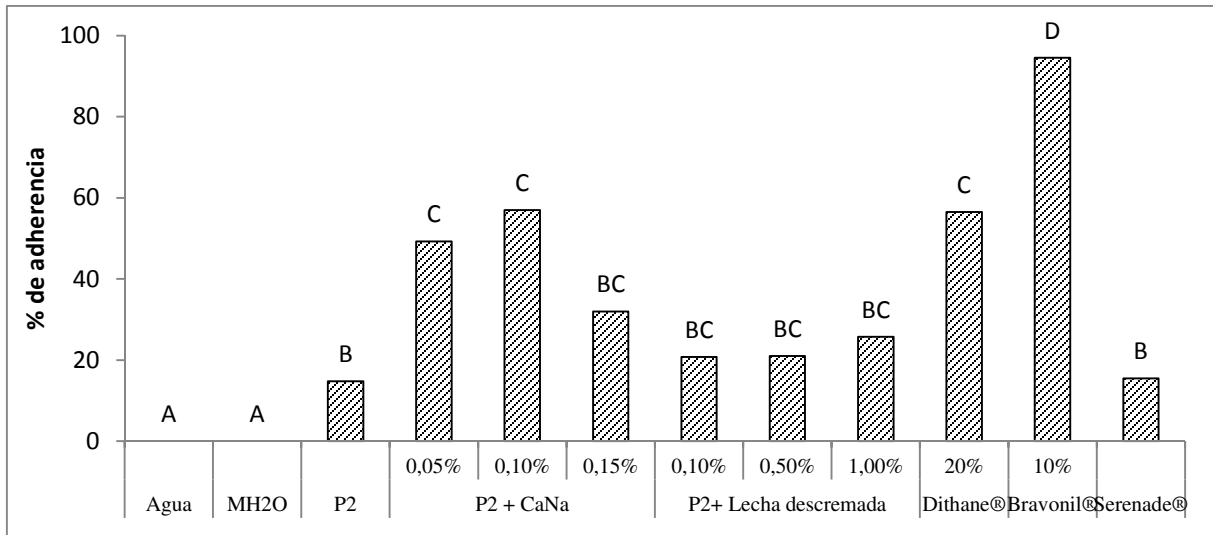
Letras diferentes denotan diferencias significativas (valor $P < 0.05$)

FIG. 12



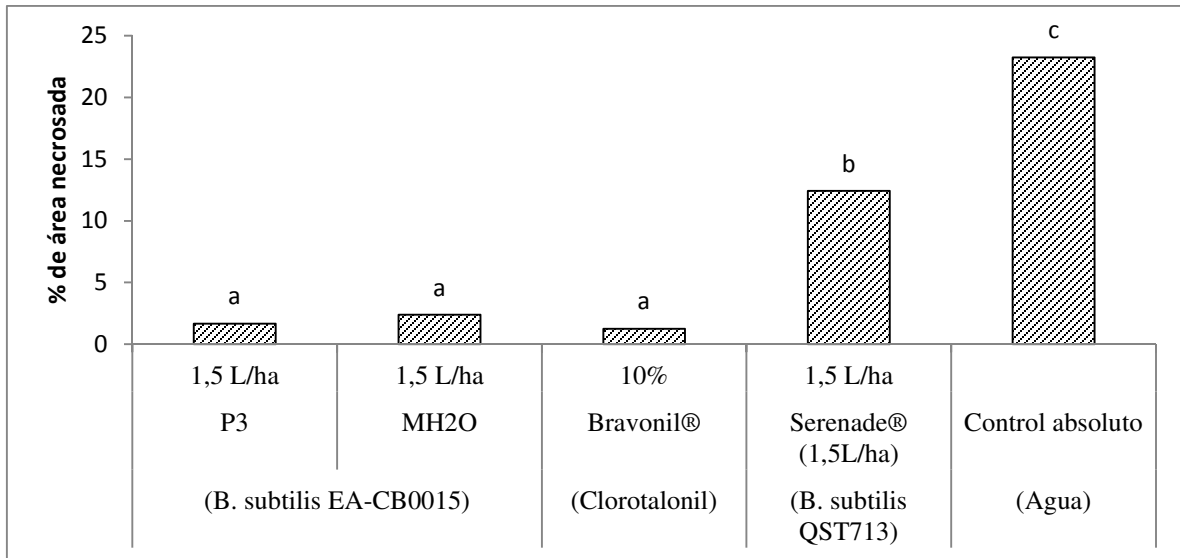
Letras diferentes denotan diferencias significativas (valor $P < 0.05$)

FIG. 13



Letras diferentes denotan diferencias significativas (valor $P < 0.05$)

FIG. 14

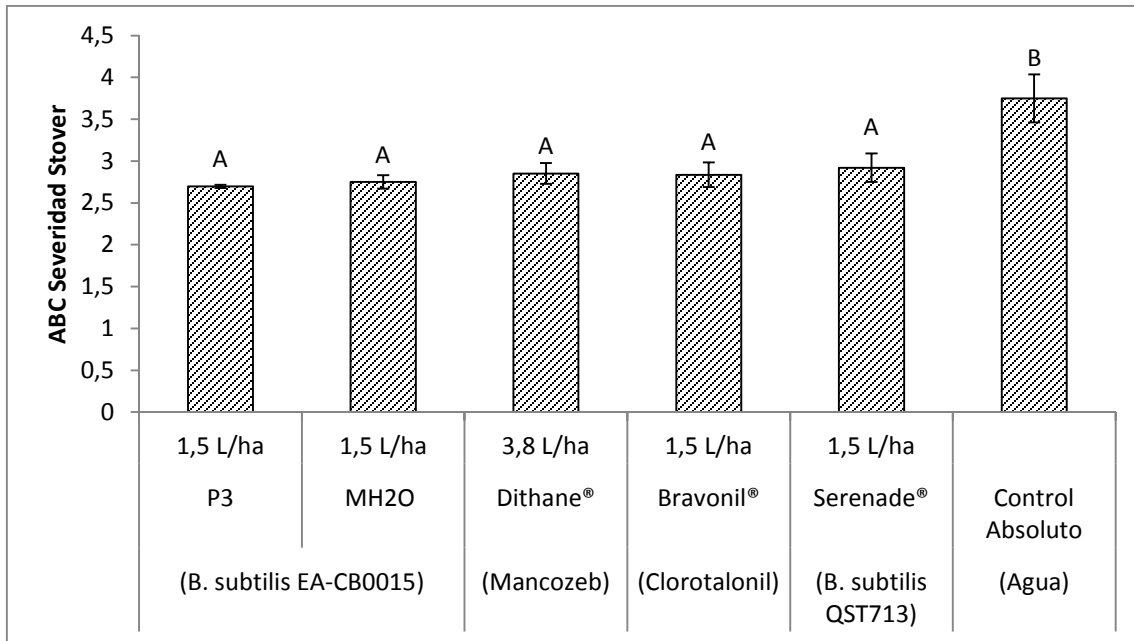


Letras diferentes denotan diferencias significativas (valor $P < 0.05$)

FIG. 15

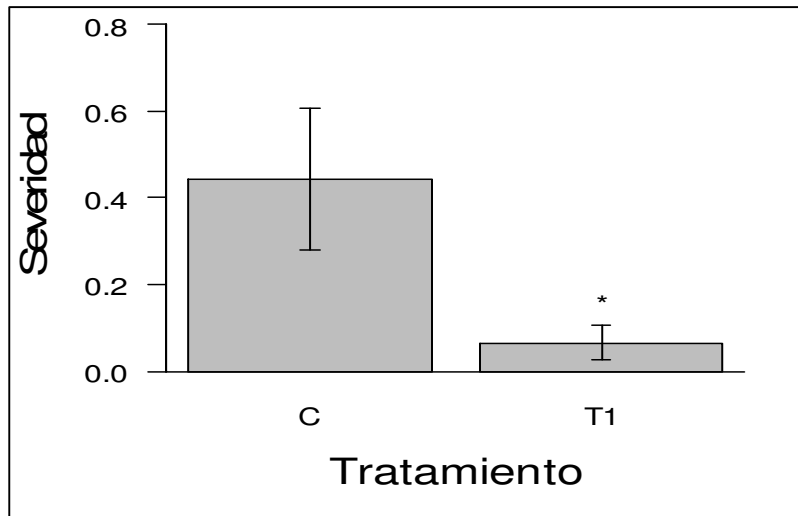


FIG. 16



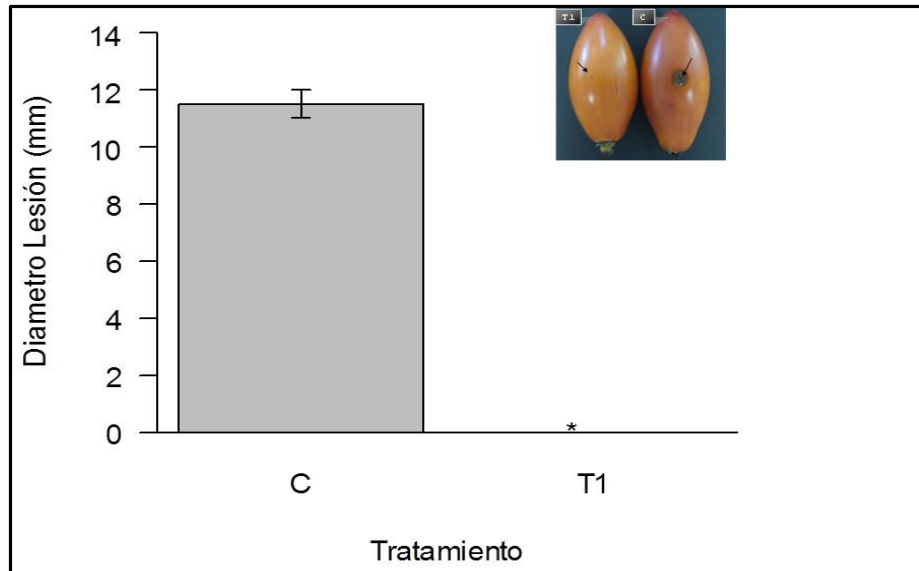
Letras diferentes denotan diferencias significativas (valor $P < 0.05$)

FIG. 17



* Denota diferencias significativas con relación al control (C) (valor $P < 0.05$)

FIG. 18



* Denota diferencias significativas con relación al control (C) (valor $P < 0.05$)

RESUMEN

La presente invención se refiere a un proceso para incrementar la producción de biomasa y metabolitos de microorganismos de la especie *Bacillus* sp. Los metabolitos obtenidos son compuestos tipo lipopeptidos de la familia de las fengicinas, surfactinas e iturinas, los cuales exhiben actividad antimicrobiana.

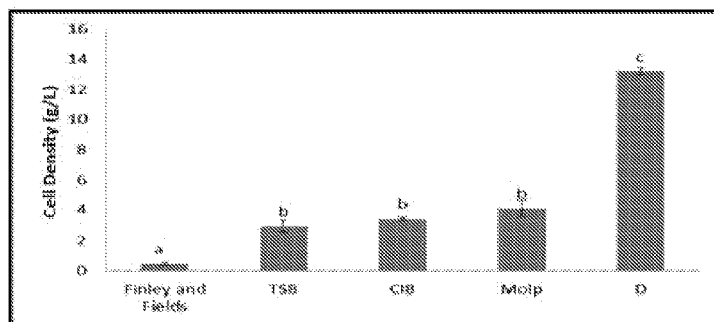
La invención comprende además composiciones biocidas que comprenden *Bacillus subtilis* EA-CB0015, *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 y/o sus metabolitos bien sea de manera individual o junto con otros agentes biocidas, así como el uso de estas composiciones para el tratamiento de enfermedades causadas por diversos agentes fitopatógenos, entre ellos *Mycosphaerella fijiensis*, en una gran variedad de cultivos.



- (51) **International Patent Classification:**
A01N 63/02 (2006.01) C07K 14/32 (2006.01)
- (21) **International Application Number:**
PCT/IB2014/061167
- (22) **International Filing Date:**
2 May 2014 (02.05.2014)
- (25) **Filing Language:** English
- (26) **Publication Language:** English
- (30) **Priority Data:**
61/819,258 3 May 2013 (03.05.2013) US
- (71) **Applicants:** UNIVERSIDAD EAFIT [CO/CO]; Carrera 49 No 7 Sur 50, Medellín (CO). ASOCIACIÓN DE BANANEROS DE COLOMBIA (AUGURA) [CO/CO]; Calle 3 Sur No. 41-65. Piso 9, Medellín (CO).
- (72) **Inventors:** CEBALLOS ROJAS, Isabel Cristina; Calle 56 # 35A 22 Apt 501, Medellín (CO). VILLEGAS ESCOBAR, Valeska; Calle 7 No. 22 -31 apto 9804, Medellín (CO). MOSQUERA LÓPEZ, Sandra; av37#75-35 apto 1210, Medellín (CO). MIRA CASTILLO, John Jairo; Calle 3 Sur No. 41-65. Piso 9, Medellín (CO). GUTIERREZ MONSALVE, Jaime Andrés; Calle 40D Sur No 39-98 Barrio el Dorado Manzana 6 Apto 307, Envigado (CO). ARROYAVE TORO, Juan José; Calle 6 #25-112. Apto 402., Medellín (CO). POSADA URIBE, Luisa Fernanda; Calle 30a # 71-23 Belén Rosales, Medellín (CO).
- (74) **Agent:** OLARTE, Carlos R.; Carrera 5 No. 34-03, La Merced, Bogotá, 110311 (CO).
- (81) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, 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, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
- with international search report (Art. 21(3))
 - before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))

(54) **Title:** PRODUCTION PROCESS FOR BIOMASS AND FENGYCIN METABOLITES OF BACILLUS SPECIES AND COMPOSITIONS THEREOF FOR BIOLOGICAL PEST CONTROL

FIG. 2



Different letters denote significant differences (P value <0.05).

(57) **Abstract:** The present invention refers to a process for increasing the production of biomass and metabolites of microorganisms of Bacillus sp. species. Obtained metabolites are lipopeptide compounds of the fengycin, surfactin, and iturin families, which exhibit antimicrobial activity. The invention further includes biocidal compositions comprising Bacillus subtilis EA- CB0015, Bacillus amyloliquefaciens EA-CB0959, and/or metabolites thereof, either alone or together with other biocidal agents, and the use of these compositions for the treatment of diseases caused by various phytopathogenic agents, including Mycosphaerella fijiensis, in a variety of crops.

**PRODUCTION PROCESS FOR BIOMASS AND METABOLITES OF *Bacillus*
SPECIES AND COMPOSITIONS THEREOF FOR BIOLOGICAL PEST
CONTROL**

5 **FIELD OF THE INVENTION**

The present invention refers to a process for increasing the production of biomass and metabolites of *Bacillus* species, including *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. The process includes a suitable culture medium and specific
10 environmental conditions, allowing for the production of large amounts of biomass and metabolites of the fengycin, surfactin, and iturin families, which exhibit antifungal and antibacterial activity against various phytopathogenic agents.

PRIOR ART

15 Among the microorganisms for biological control, bacteria of *Bacillus* sp. genus have received much attention due to the wide variety of antibiotic compounds they produce, their long shelf life, their fast growth in culture, and their ability to colonize leaf surfaces [1, 2, 3, 4]. In particular, certain species of *Bacillus* such as *Bacillus subtilis*,
20 *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thurigiensis* show antimicrobial activity [4].

The antimicrobial activity of these bacteria is due to their ability to produce lipopeptides of the surfactin, iturin, and fengycin families, which differ in the amino acid sequence
25 and the branching of the fatty acid chain. Surfactins exhibit high antibacterial activity, whereas iturins and fengycins are recognized for their antifungal activity [4].

The prior art describes the use of *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens* to control various disease-causing microorganisms in a wide variety of crops, including fruit and vegetable
30 crops such as blackberry, grape, raspberry, strawberry, tomato, cucumber, black pepper, orange, melon, apple, peach, custard apple, banana, papaya, mango, and kiwi.

EP2311936 discloses a *B. subtilis* strain KS1 (NITE BP-569) as a biological control agent to counteract several phytopathogenic microorganisms in vine crops. WO 98/21968 discloses an antibiotic produced by *B. subtilis* AQ153 (ATCC 55614) effective against bacterial and fungal infections and also as method for protecting plants that comprises the application of these antibiotic compounds.

WO9850422 and WO0029426 disclose other antibiotic compounds produced by the *B. subtilis* strain AQ713 (NRRL B21661) and its mutants, which exhibit insecticidal, antifungal, and antibacterial activity. WO9909819 discloses antibiotics of a *B. subtilis* strain AQ 713 (NRRL No. 21665), which produces metabolites with pesticidal activity and a high-molecular-weight metabolite, soluble in water, which exhibits insecticidal and nematocidal activity against corn rootworm and other nematodes.

US2011/0318386 describes methods for inducing systemic resistance against various pathogens through the use of biological controllers of the *Bacillus* genus, specifically of the isolated *B. mojavensis* 203-7 and isolated *B. mycoides* species. In turn, ES 2345969 describes a phytostrengtheners for application on banana and plantain pseudostems, which includes *B. subtilis*, *Trichoderma viride*, and *B. megaterium* var *phosphaticum*.

US2012/00031999 discloses a control strategy for various fungal diseases, including Black Sigatoka in banana, based on the application of synthetic fungicides with some biocontrol microorganisms and their metabolites (specifically *B. subtilis* strain QST 713, corresponding to the strain of the commercial product Serenade®).

In the production processes of microorganisms of *Bacillus* species disclosed in the prior art, the amount of biomass produced is very low, given the obtained cell density is not generally greater than 5.0 g/L [8, 9]. Thus, it is necessary to develop new processes to increase the production of biomass and its active metabolites.

Similarly, it is necessary to develop biocide compositions from these microorganisms and/or their biologically active metabolites with a greater efficiency and selectivity for controlling different phytopathogenic agents on a variety of crops.

5 **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

FIG. 1 Structure of the fengycins C produced by *Bacillus subtilis* EA-CB0015

FIG. 2 Cell density of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 in different culture media.

10

FIG. 3 HPLC chromatogram of the compounds of *Bacillus subtilis* EA-CB0015

FIG. 4 MS/MS spectrum of the P5 purified lipopeptide (m/z 1429.9) of *Bacillus subtilis* EA-CB0015.

15

FIG. 5 MS/MS spectrum of the P5 purified lipopeptide (m/z 1447.8) after alkaline hydrolysis of the lactone ring of *Bacillus subtilis* EA-CB0015.

FIG. 6 Area under the curve of the lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* EA-CB0015 in various culture media.

20

FIG. 7 Percentages of inhibition generated by *Bacillus subtilis* EA-CB0015 on various phytopathogenic microorganisms.

FIG. 8 Growth inhibition percentages of *Mycosphaerella fijiensis* generated by *Bacillus subtilis* EA-CB0015 CFS obtained in various culture media.

25

FIG. 9 Viability of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 contained in various compositions of the invention.

30

FIG. 10 Degree of severity of Black Sigatoka in banana plants treated with different compositions of the invention at a greenhouse level.

FIG. 11 Percentage of necrotic area caused by Black Sigatoka in banana leaves treated with different compositions of the invention.

5 **FIG. 12** Effect of various adjuvant UV protectors on the viability of *Bacillus subtilis* EA-CB0015.

FIG. 13 Effect of various adjuvants on the adhesion of the compositions (MH2O and P2) based on *Bacillus subtilis* EA-CB0015.

10

FIG. 14 Effect of the water-based mixture composition based on *Bacillus subtilis* EA-CB0015 on the percentage of necrotic area of banana leaves at greenhouse level.

FIG. 15 Photographs of banana leaves affected by Black Sigatoka disease after treatment with various products.

15

FIG. 16 Effect of water-based composition of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 on the severity of Black Sigatoka in banana at field level.

20 **FIG. 17** Effect of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 on the severity of the disease caused by *Botrytis cinerea* EAHP-009 in pompons.

FIG. 18 Effect of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 on *Colletotrichum* sp. in tree tomato (*Cyphomandra betacea*).

BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention allows solving these and other disadvantages as it comprises a process for increasing the production of biomass of microorganisms of the *Bacillus* genus, including *Bacillus subtilis* EA-CB0015 and *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959, as well as their biologically active metabolites, such as lipopeptides of the surfactin, iturin, and fengycin families.

Additionally, the present invention includes agrochemical compositions that comprise microorganisms of different *Bacillus* species, including *Bacillus subtilis* EA-CB0015, *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 and/or active metabolites thereof, either alone or in combination with biocidal agents for the control of phytopathogenic agents such as *Mycosphaerella fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* sp., *Monilia* sp. *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*.

The present invention is also directed towards the use of microorganisms of *Bacillus* species, including *B. subtilis* EA-CB0015, *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959, and/or active metabolites thereof and agrochemical compositions containing them, for inhibiting the growth of phytopathogenic microorganisms such as *Mycosphaerella fijiensis* in agricultural crops.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In order to increase the production of biomass of microorganisms of *Bacillus* sp. and their metabolites (lipopeptides), the microorganism must be cultured in a suitable medium and under the environmental conditions necessary to increase the production of biomass and its metabolites. To do this, a culture medium is prepared (hereinafter medium D) comprising one or more components selected from the group consisting of carbohydrates, yeast extract, ammonium sulfate, peptone, salts containing magnesium, sulfur, manganese, chlorine, potassium, phosphorus, calcium, and sodium either in a solid, semisolid, or liquid matrix.

Environmental conditions necessary for carrying out the process of the invention include temperature, pH, stirring speed, fermentation time, and aeration. The process of the present invention can be performed on a small scale in a laboratory or at large scale
5 in a bioreactor.

In a preferred embodiment, medium D comprises, in w/v percentages, between 3.2% and 3.4% glucose, between 3.1% and 3.3% yeast extract, between $2.5 \times 10^{-3}\%$ and $4.5 \times 10^{-3}\%$ manganese sulfate, between $2 \times 10^{-3}\%$ and $4 \times 10^{-3}\%$ calcium chloride, between
10 0.08% and 0.12% ammonium sulfate, between 0.35% and 0.45% magnesium sulfate, between 0.04% and 0.12% disodium phosphate and between 0.04% y 0.12% monosodium potassium phosphate.

In another even more preferred embodiment of the invention, culture medium D
15 comprises, in w/v percentages, 3.34% glucose, 3.25% yeast extract, $4.2 \times 10^{-3}\%$ manganese sulfate, $3.1 \times 10^{-3}\%$ calcium chloride, 0.1% ammonium sulfate, 0.4% magnesium sulfate, 0.05% disodium potassium phosphate, 0.05% monosodium potassium phosphate.

20 In a preferred embodiment of the process of the invention, the microorganism is incubated for a period between 24 and 96 hours with a stirring speed of 400 to 600 rpm, aeration of 1 to 5 vvm, at a temperature between 20°C and 40°C, and pH between 5.5 and 7.5. Strong acids such as sulfuric acid and/or strong bases such as sodium hydroxide can be used to control and/or adjust the pH. Surfactants and antifoams may
25 also be added to control foam formation.

The process carried out under the above conditions allows increasing the production of biomass and active metabolites of microorganisms of *Bacillus* sp.. The biomass obtained by the process of the present invention can be separated from the culture
30 medium using conventional methods of centrifugation or microfiltration, whereas the active metabolites can be obtained by extraction with solvents, precipitation, adsorption, or chromatography.

In a preferred embodiment of the invention, the amount of biomass of microorganisms of *Bacillus* sp. obtained can range between 3.0 and 20.0 g/L, preferably between 7.0 and 18.0 g/L, while the concentration of metabolites can range between 200 and 1500 mg/L, preferably between 500 and 1000 mg/L.

5

In a preferred embodiment, the process of the invention allows increasing the production of biomass and active metabolites of *B. subtilis* EA-CB0015 and *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959. Identification by 16S rDNA analysis established that *B. subtilis* EA-CB0015 corresponds to SEQ ID NO: 1 sequence, which is deposited in GenBank under accession number KC006063.

10

Metabolites of *B. subtilis* EA-CB0015 and *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 obtained by the process of the invention include lipopeptides of the surfactins, iturins, and fengycins types. Analysis by mass spectrometry and chromatographic techniques identified a new fengycin isoform produced by *B. subtilis* EA-CB0015, called fengycins C, whose amino acid sequence is (Glu1-Orn2-Tyr3-THR4-Glu5-Val6-Pro7-Gln8-Thr9-Ile10), which differs from the fengycin B sequence at position 9 and from the fengycin A sequence at positions 6 and 9.

15

Additionally, following the procedure of the invention for *B. subtilis* EA-CB0015, this strain can produce 14 different fengycin C homologues with general formula R-Glu1-Orn2-Tyr3-Thr4-Glu5-Val6-Pro7-Gln8-Thr9-Ile10, which vary according to the size of the saturated or unsaturated hydrocarbon chain (R) of 14 to 18 carbons. FIG 1. illustrates the structures of the various fengycins produced by *B. subtilis* EA-CB0015 by the process of the invention.

20

25

The various homologues of fengycins C, as well as the surfactins and iturins, can be separated by conventional techniques such as high performance liquid chromatography (HPLC). Produced surfactins correspond to different homologues with hydrocarbon chain length between 13 and 16 carbons; iturins correspond to iturins A of 14 and 15 carbons.

30

In the case of *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959, metabolites produced by the process of the invention correspond to various surfactin homologues (C12 to C15), two iturin A homologues (C14 and C15), and two fengycin isoforms (A and B) with 4 fengycin A homologues (C14, C15, C16, and C17) and 2 fengycin B homologues (C16 and C17).

5

In a further aspect of the invention, biomass of *B. subtilis* EA-CB0015 or biomass of *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 obtained by the process of the present invention inhibits the growth of various plant pathogens such as *Mycosphaerella fijiensis*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, and *Colletotrichum* sp. This inhibition can be determined using techniques such as dual plates, which involves comparing the growth of plant pathogens when cultured in a medium with and without the presence of the active substances to be assessed. Determined *in vitro* inhibition percentages are always higher than 50%.

10

After carrying out the process of the present invention, different compositions or formulations can be prepared from the obtain biomass and/or the metabolites in order to produce physicochemically stable biocidal compositions that ensure the viability of the microorganism and the activity of the metabolites in the composition for long periods.

15

These compositions can be prepared in a suitable sealed container to avoid contamination. Biomass and/or its metabolites, adjuvants and other ingredients are added to obtain a homogeneous mixture. The final product thus obtained can be collected in suitable containers and stored at room temperature.

20

In a further aspect, the present invention refers to biocidal compositions comprising *B. subtilis* EA-CB0015, *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959, and/or their active metabolites, either alone, combined or in association with other active agents to enhance biological activity. The biocidal compositions of the present invention may contain one or more adjuvants and an agrochemically acceptable carrier.

25

30

In a preferred embodiment, the biocidal compositions of the present invention comprise between 80.0 and 99.9% w/w of an aqueous suspension of *B. subtilis* EA-CB0015 at a

concentration of 1×10^7 a 1×10^{11} CFU/mL together with a mixture composed of 2.0% to 4.0% w/v sodium carboxymethyl cellulose (CMC), 1.0% to 5.0% v/v 3M phosphate buffer (pH 5.0), 1.0% to 4.0% v/v glycerol, 0.25% to 0.75% v/v tween 20[®], 0.25% to 0.5% v/v Triton X-100[®], 0.01% to 1.0% v/v potassium sorbate, 0.05% a 0.15% /v
5 xanthan gum, 0.2% to 1.5 % w/v skimmed milk, and 0.028% to 1.0% w/v TiO₂. This composition is of white color, has a pH of 4.0 to 6.5, and a viscosity of 20 to 80 cp.

In a further preferred embodiment, the biocidal compositions of the invention also comprise chemical pesticides such as anilinopyrimidines, bitartenols, sterols,
10 difeconazole, tebuconazole, epoxiconazole, mancozeb, chlorothalonil and other agents for the biological control of pests, together with one or more adjuvants in an agrochemically acceptable carrier.

In a further aspect, the present invention is directed to the use of microorganisms of
15 *Bacillus* sp. particularly of *B. subtilis* EA-CB0015, *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 and/or their metabolites, as well as their biocidal compositions, to inhibit the growth of phytopathogenic microorganisms such as *Mycosphaerella fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* sp., *Monilia* sp. *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium solani* in agricultural crops.

20 In a further aspect, the present invention is directed to a method for treating plants against infections caused by various phytopathogens, which comprises applying an effective amount of a microorganism of *Bacillus* sp. to the plant, particularly *B. subtilis* EA-CB0015 and *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 and/or their metabolites, or applying
25 biocide compositions containing them, either alone or in combination with other biocidal agents.

The application can be done by spraying at a dose ranging from 0.1 to 10 liters per hectare (L/ha) in admixture with an appropriate carrier or mixed with other
30 compositions containing one or more pesticides.

The following examples further illustrate the invention, although the inventive concept is not restricted thereto.

5 **EXAMPLES**

EXAMPLE 1. Obtaining *Bacillus* sp.

10 Strains of *Bacillus* sp. were obtained from cv. Gran enano and cv. Valery cultivars, both of bananas, and cv. Harton of plantain. A plantation was selected for each cultivar and five points were established to collect composite samples of three plants before flowering using random probability sampling without replacement. Sampling was performed on leaves number 2, 5, and 10 of each plant and each leaf was split to select an area of the apex and an area of the base.

15 Bacterial isolation was carried out by washing with a sodium phosphate buffer and Tween 80[®] and performing sonication of the samples. Serial dilutions were made and plated on TSA surface (Trypticase Soy Agar, Merck at 10%). Gram positive cells were purified, cultured in Finley and Field's medium (150 rpm, 4 days, 30°C) and subjected to heat shock (80°C, 20 min). All AEFBs (Aerobic Endospore-Forming Bacteria) were stored in TSB (Tryptic Soy Broth, Merck) and glycerol (20% v/v) at -80°C, and activated in TSA at 50% prior to any experimental use.

25 **EXAMPLE 2. Obtaining biomass of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 and *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959**

B. subtilis EA-CB0015 strain was replicated in TSA 50% and incubated for 48 hours at 30°C. A colony of the strain was inoculated in culture medium D and incubated for 12 hours at 30°C and 200 rpm. This culture was used as pre-inoculum. Fermentation was carried out in 50-mL flasks with 10 mL of culture medium D at a temperature of 30°C and 200 rpm in an orbital shaker. Each Erlenmeyer was inoculated with 1 mL of a

bacterial suspension adjusted to an OD₆₀₀ of 1 and obtained after 12 hours of growth. Cell densities of up to 13.2 ± 1.7 g/L of *B. subtilis* EA-CB0015 were obtained.

In order to assess the performance of the process in obtaining biomass of *B. subtilis* EA-CB0015, the amount of biomass obtained using the culture medium of the invention (medium D) was compared with the amount of biomass obtained using CIB, MOLP, Finley and Field's, and TSB culture media.

Cell density obtained in the culture medium of the invention was 29.3 times greater than that obtained in Finley and Field's medium (0.6 ± 0.1 g/L), 4.5 times greater than that obtained in TSB medium (2.95 ± 0.4 g/L), 3.6 times greater than that obtained in the CIB medium (3.65 ± 0.8 g/L), and 3.2 times greater than that obtained in the MOLP medium (4.1 ± 0.6 g/L), as illustrated in FIG 2.

Following the same procedure, biomass of *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 was obtained. As for *B. subtilis* EA-CB0015, the amount of biomass obtained using the culture medium of the invention (medium D) was higher than that obtained in the MOLP and TSB media. Cell densities obtained with the medium of the invention range between 8.0 and 10.0 g/L.

EXAMPLE 3. Extracting and determining active metabolites of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 and *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959

From *B. subtilis* EA-CB0015 culture obtained according to Example 2, an extraction process of their active metabolites was performed with methanol. Subsequently, a solid phase extraction (SPE) was carried out with methanol as the organic solvent and active fractions were purified by reverse phase HPLC with an UV detector at a wavelength of 214 nm.

FIG. 3 illustrates the respective chromatograms. Eluted peaks between minute 16 and 19 correspond to iturins A (FIG. 3A), peaks P1 to P14 (FIG. 3B) correspond to fengycins C, and peaks P15 to P19 (FIG. 3B) correspond to surfactins. Some of the

active metabolites were also identified by ESI-MS/MS (electrospray mass spectrometry), as shown in FIGS 4 and 5:

In order to assess the performance of the process in obtaining the two groups of active metabolites of *B. subtilis* EA-CB0015, the amount of metabolites obtained using the culture medium of the invention (medium D) was compared with the amount of metabolites obtained using CIB, MOLP, Finley and Field's, and TSB culture media. Peak areas and thus the amount of metabolites obtained were greater when using culture medium D of the invention in the process, as shown in FIG. 6.

Following the same extraction and HPLC purification procedure previously mentioned, metabolites produced by *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 were identified, corresponding to various surfactin homologues (C12 to C15), two iturin A homologues (C14 and C15), and two fengycin isoforms (A and B) with 4 fengycin A homologues (C14, C15, C16, and C17) and 2 fengycin B homologues (C16 and C17).

EXAMPLE 4. Evaluating the activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 and *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 against phytopathogenic microorganisms

Evaluation of antifungal activity was performed using the ring method. Briefly, a circular print (6 cm of diameter) of *B. subtilis* EA-CB0015 was made in a Petri dish (9 cm of diameter) with PDA, and then a disk (5 mm of diameter) of the fungus (grown for 10 days) was placed in the center thereof. Petri dishes inoculated only with disks of the fungus were used as absolute control, and the radial mycelial growth was measured when the fungus reached a growth equal to the diameter of the circle formed by the bacteria.

The experiments had a completely randomized univariate design with three replicates per treatment. The established response variable was the percentage of mycelial growth inhibition, which was calculated considering growth of the absolute control as 100%. As FIG. 7 shows, the percentage of inhibition generated by *B. subtilis* EA-CB0015 was approximately 20% on *Pestalotia* sp. and 80% on *Moniliophthora roreri*.

In addition, *B. subtilis* EA-CB0015 exhibits antibacterial activity against various microorganisms, including *Ralstonia solanacearum*, generating inhibition zones of up to 6 millimeters in BGTA culture medium. Quantitative antagonism tests against *R. solanacearum* were performed by surface seeding 100 μ L of a *R. solanacearum* suspension adjusted to 10^6 CFU/mL in BGTA agar. Then, TSA discs (5 mm) of *B. subtilis* EA-CB0015 were incubated for 48 hours at 30°C. Finally, the generated inhibition zone was determined after 72 hours.

With the same methodology described above, the activity of *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 against *F. oxysporum*, *M. fijiensis* and *R. solanacearum* was evaluated, with inhibition percentages of 58.5% and 76.0%, and an inhibition radius of 10.9 mm, respectively.

EXAMPLE 5. Evaluating *Bacillus subtilis* EA-CB0015 and *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 against *Mycosphaerella fijiensis*

To select the antagonistic bacteria, an initial screening was performed using the microplate technique with the modified methodology of Peláez 2006 [10]. It was quickly established which cell-free supernatants (CFS) of the isolated AEFBs generated mycelial growth inhibition on *Mycosphaerella fijiensis* when incubated in liquid medium.

For the evaluation, strains of *M. fijiensis* EASGK09, *M. fijiensis* EASGK10, *M. fijiensis* EASGK11, and *M. fijiensis* EASGK14 fungi were used, isolated from cv. Gran enano banana leaves and following the methodology of Dupont, 1982[11]. CFS of *B. subtilis* UA321 were used as positive control and fresh sterile broth was used as absolute control.

A dual plates test was conducted with the modified methodology of Riveros [12]. Growth inhibition percentages of fungus colonies were evaluated on PDA (Merck, supplemented with chloramphenicol: 200 ppm and ampicillin: 250 ppm). Inhibition

tests were conducted on the germ tube using the modified varnish technique described Talavera [13].

Growth inhibition was evaluated on the germ tube of fungal ascospores discharged on leaf discs of cv. Gran enano banana previously submerged in CFS. The inhibition percentage on the germ tube was determined considering spore germination of the absolute control as 100%.

Bacteria selected as antagonists were those whose CFS showed *M. fijiensis* growth inhibition percentages higher than those of *B. subtilis* UA321 positive control. This initial selection process was carried out with 648 AEFBs. AEFBs selected as antagonists of *M. fijiensis* were tested again using the microplate technique and subjected to dual plates and ascospores inhibition tests using the CFS obtained from fermentation in MOLP culture media [14]. These tests used *M. fijiensis* EASGK14 strain and the same controls of the initial screening.

Finally, AEFBs selected as antagonists of *M. fijiensis* were subjected to three additional tests against the fungus: microplates with MOLP culture medium, dual plates, and ascospores inhibition. Then, a weighted average of the three tests was calculated, resulting in values of 60%, 20%, and 20% for the ascospores, dual plates, and microplates tests respectively.

The higher weight associated with the ascospores test relates to the importance of attacking the fungus before it enters leaf stomata. Inhibition percentages of mycelial growth and ascospores germination of *M. fijiensis* generated by *B. subtilis* EA-CB0015 and *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 *in vitro* are shown in Table 1.

Table 1. Inhibition percentages generated by *Bacillus* sp. against *M. fijiensis*

Microorganism	Mycelial growth inhibition/Technique:		Inhibition of ascospores growth ^c	Weighted average of the three tests ^d
	Microplates in MOLP (%) ^a	Dual plates (%) ^b		

<i>Bacillus subtilis</i> EA-CB0015	89 ± 1	78 ± 1	98 ± 1	92
<i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i> EA-CB0959	89 ± 0	62 ± 2	77 ± 0	76

^a Mycelial growth inhibition of *M. fijiensis* using the microplate technique with MOLP broth; 2 replicates and 4 repetitions per treatment of the experiment performed 2 times over time.

^b Mycelial growth inhibition of *M. fijiensis* using the dual plates in PDA technique; 2 replicates and 30 repetitions per treatment of the experiment performed 2 times over time.

^c Germination inhibition of *M. fijiensis* ascospores with two replications for treatment.

^d Average of the three antagonism tests: ascospores (60%), microplates (20%), and dual plates (20%).

The growth inhibition percentage of *M. fijiensis* obtained with *B. subtilis* EA-CB0015 CFS in medium D was 1.5 higher than that obtained in CIB medium (53.0 ± 4.0 %), 80.9 times higher than that obtained in Finley and Field's medium (1.0 ± 1.6 %) (FIG. 7). Growth inhibition percentages of *M. fijiensis* obtained using the CFS in MOLP and TBS media were statistically similar to that obtained in medium D.

In vitro growth inhibition of *M. fijiensis* by the CFS of the isolated AEFBs suggests they have an impact on the cellular structures of the fungus. For this reason, the presence of morphological changes in the mycelium and ascospores of *M. fijiensis* was evaluated by light microscopy.

It was observed that the CFS of all antagonist bacteria produced morphological changes, manifested by masses on mycelial hyphae and inhibitions in the germination of the ascospores tube when compared with the absolute control.

EXAMPLE 6. Biocidal compositions comprising *Bacillus subtilis* EA-CB0015

For the development of the biocidal compositions of the invention, a pre-selection of the adjuvants was carried out and the combinations that generate the most stable mixtures and the ratios of each component in the mixture were established by evaluating such

aspects as the occurrence of phases and the presence of precipitates. Selected adjuvants and their roles are shown in Table 2.

Table 2. Adjuvants of the various compositions.

Adjuvant ^a	Product ^b	Formulation ^c	Role ^d
Oil	Sunflower oil	EM; OB	Provides substance to the formulation. Preventing microorganism desiccation.
	Soybean oil	EM; OB	
	Canola oil	EM; OB	
Surfactant	Tween 20	EM; MH ₂ O	Improving coverage of the hydrophobic surface of the plant. Helping the mixture of hydrophobic spores with water. Helping the mixture of hydrophobic spores with water.
	Tween 80	EM; MH ₂ O	
	Triton x-100	EM; MH ₂ O	
Adherent	Xanthan gum	MH ₂ O; EM	Improving adherence of the microorganism to the surface of the leaf. Stabilizing the mixture.
Dispersant	Sodium alginate	MH ₂ O	Neutralizing interactions between similar particles to achieve a uniform suspension. Ensuring release of the microorganism after application.
	Veguum	MH ₂ O	
	Sodium carboxymethyl cellulose (CMC)	MH ₂ O	
Humectant	Glycerol	MH ₂ O	Increasing moisture content of the product by absorbing water in the air. Preventing microorganism desiccation.
Antimicrobial agent	Propionic acid	MH ₂ O; EM	Preventing product degradation due to contamination

^a Group of adjuvants required for the mixture.

^b Adjuvants selected for the evaluation.

^c Composition of which they make part. EM: Emulsion, OB: Oil-based composition, MH₂O: Water-based mixture.

^d Role of each adjuvant in the mixture.

For the composition in emulsion form, the best combination of surfactant and oil was established using a factorial 3 x 2 designed (factors: type of oil and type of emulsion, with three levels each) was used. A constant ratio was used to evaluate the components: 20 mL oil, 1 µmol surfactant, and 80 mL water.

After selecting the type of oil and surfactant, a ternary mixture with center point design was carried out in order to determine the ratios of sunflower oil, surfactant, and dispersant (xanthan gum) that should be added to obtain a highly stable emulsion.

Evaluated ranges were 0.3 to 1.0%, 0.0 to 5.0%, and 14.0 to 19.6% for xanthan gum, oil, and surfactant, respectively. Ratios were selected as reported by Burges (1998) and Brar et al (2006) [15, 16]. In addition to the evaluated components, to the mixtures was added a 3M phosphate buffer of pH 5.0 (3%) to offset drastic changes in pH when

adding the adjuvants, propionic acid (0.5%) as an antimicrobial agent, and q.s. water 100%.

As for the water-based mixture, the most stable combination of dispersant, surfactant, and adherent was determined using a fractional factorial design that produced eight mixtures. These mixtures were then evaluated in the fractional design to select the water-based mixture adjuvants shown in Table 3. The remainder was completed with water.

Table 3. Evaluated mixtures using a fractional design for selecting water-based mixture adjuvants (MH₂O)

Mixture	X gum	(CMC)	(veggum)	(alginate)	(tween 20)	(tween 80)	(triton X-100)
1	-	-	-	+	+	+	-
2	+	-	-	-	-	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	-	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	+
6	+	-	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+
- ^a	0,1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
+ ^b	0,5%	1,25%	1,25%	1,25%	2,50%	2,50%	2,50%

^a Minimum level for the evaluation of each factor.

^b Maximum level for the evaluation of each factor

^{*} The + y – signs denote the level for the evaluation of each factor in the mixture.

Mixture 3 was selected as the most stable and subjected to a ternary mixture with center point design in order to determine the ratios of CMC, Tween 20[®], and Triton X-100[®].

Evaluated ranges were 0.5% to 3.5% for the three components tested. These ranges were determined as reported by Burges (1998) and Brar et al (2006) [16, 15].

The concentration of xanthan gum remained constant at the lowest level (0.1%) evaluated in the fractional factorial design since all stable mixtures contained this additive at this concentration. In addition to the evaluated components, to the design mixtures was added a 3M phosphate buffer of pH 5.0 (3%) to offset drastic changes in

pH when adding the adjuvants, propionic acid (0.5%) as an antimicrobial agent, and q.s. water 100%.

Mixtures with improved stability over time for the emulsion and the water-based mixture were selected. Water was replaced with bacterial culture *B. subtilis* EA-CB0015, and its final bacterial concentration was adjusted to $2 \pm \times 10^8$ CFU/mL.

In addition to the two above mentioned compositions, bacterial suspensions (SB) consisting solely of the bacterial culture obtained after 72 hours of fermentation and conditioned with a 3M phosphate buffer of pH5 (3M K_2HPO_4 , 3M KH_2PO_4) (3%) and propionic (0.5%) were evaluated. Table 4 illustrates the compositions of the various formulations evaluated with *B. subtilis* EA-CB0015.

Table 4. Compositions of various formulations based on *Bacillus subtilis* EA-CB0015.

FORMULATION	ACRONYM	COMPOSITION
Bacterial suspension	BS	Bacterial culture (94.25% v/v - 98.75% v/v), 3M phosphate buffer of pH 5 (1% v/v - 5% v/v), and propionic acid (0.25% v/v - 0.75% v/v)
Composition water base	MH ₂ O	Bacterial culture (86.6% v/v - 93, 2% v/v) sodium carboxymethyl cellulose (2% w/v - 4% w/v), 3M phosphate buffer of pH 5 (1% v/v - 5% v/v), glycerol (1% v/v - 4% v/v) Tween 20® (0.25% v/v - 0,75% v/v) Triton X-100 (0.25% v/v - 0,75% v/v), propionic acid (0.25% v/v - 0,75% v/v), and xanthan gum (0.05% w/v - 0,15% w/v).
Composition emulsion base	EM	Bacterial culture (71.4% w/v - 83,6% v/v), sunflower oil (14% v/v - 18% v/v), 3M phosphate buffer of pH 5 (1% v/v - 5%

		v/v), Tween 80 ® (1% v/v - 4% v/v), xanthan gum (0.2% w/v – 0.9% w/v), and propionic acid (0.25% v/v – 0.75% v/v).
--	--	--

EXAMPLE 7. Evaluation of the biocidal compositions of the invention

The compositions obtained in Example 6 were used to evaluate their antagonistic capacity against ascospores of *M. fijiensis* and the viability of *B. subtilis* EA-CB0015 in the formulation for a given storage time (180 days).

Regarding the evaluation of the viability of the bacteria over time, FIG. 9 shows a gradual decrease in CFU over time for all treatments, with a more marked decrease for the emulsion from the third month. The water-based mixture and the bacterial suspension showed very similar decreases, although the former showed the lowest value.

According to the above, the best compositions in relation to the viability of *B. subtilis* EA-CB0015 in the formulation during the evaluated time period are those based on water or with a bacterial suspension.

In order to evaluate the effect of the compositions on the development of Black Sigatoka in banana plants, an experiment was conducted to assess the emulsion, the water-based mixture, and the bacterial suspension of *B. subtilis* EA-CB0015. The compositions were diluted to a concentration of 1.0×10^8 CFU/mL and applied by spraying 30 drops/cm² on the first leaf completely unfolded after the flag leaf (leaf number one), on which the evaluation was conducted.

Inoculation of the pathogen was performed through artificial inoculation by adding 20 mL of a mycelial suspension of 10-day old *M. fijiensis* on leaf number one. Inoculation of the pathogen was done 24 hours before applying the compositions of the AEFBs. The degree of severity of the disease was determined 30 days after applying the

compositions using the Fouré scale (1982)[17] and the percentage of necrotic leaf area was determined using photos of leaves and the Assess 1.0 image analysis software.

For both measurements, the results of applying sterile water were used as negative control and the data reported for the chemical fungicide Dithane® and the biological fungicide Rhapsody®, employed according to the provider's recommendations, were used as positive control. Results are illustrated in FIGS. 10 and 11, which show the differences in the degree of severity and in the percentage of necrotic area for the various treatments evaluated by analysis of variance ($p < 0.05$).

It is noteworthy that the water-based mixture composition was the only biological treatment that showed significant disease control equal to the chemical control of Dithane® for the two analyzed response variables. This bioformulation reduced the degree of severity to 97.1% and reported a necrotic area of 2.3%, a percentage similar to that obtained by chemical control (1.0%). The degree of severity and the percentage of necrotic area of the negative control was 4.2 and 16.3%, respectively.

Other evaluated treatments showed no disease control, that is, they did not show significant differences when compared with the negative control for any of the analyzed two variables.

EXAMPLE 8. Evaluating the physicochemical properties, adhesion, resistance to UV radiation, and characteristics of the compositions of the invention.

Adhesion and resistance to UV radiation of the compositions of Example 6 were lower when compared with other chemicals in the market. To improve these properties, an initial selection of adjuvants was carried out. Table 5 shows the adjuvants used to improve adhesion and UV protection, and the range used for their evaluation.

Table 5. Adjuvants evaluated to improve adhesion and UV protection of the compositions of the present invention.

Role	Adjuvant Type	Concentration (% w/v)
UV Protector	TiO ₂ (Technical)	0,5 - 1,5
UV Protector	ZnO ₂ (Technical)	0,5 - 1,5
UV Protector	Polyvinyl alcohol (PVA)	0.1 – 1.0
Adherent	Skimmed milk	0,1 - 1,5
Adherent	Pegal®	0,01 - 0,1
Adherent	Sodium caseinate (CaNa)	0.1 - 1.0

The adjuvants were appraised using cost, market availability, and compatibility with the composition of the invention as criteria. Then, an evaluation of the pre-selected adjuvants was carried out using a multifactorial experimental design where top performers were identified for each evaluation criteria in a specific concentration range (FIGS 12 and 13).

According to FIG. 12, the water-based bacterial composition (MH₂O) of the invention, supplemented with the adjuvant TiO₂ at 0.5% w/v, improved UV resistance, reducing cell death of *B. subtilis* EA-CB0015 from 55% to 21.5% after being exposed to UV radiation for 120 minutes. With this finding a new water-based composition was developed, incorporating TiO₂ at 0.5% and replacing propionic acid with potassium sorbate in a composition called P2.

FIG. 13 shows that the addition of sodium caseinate and skimmed milk significantly improved the adhesion of the product to hydrophobic surfaces. Therefore, skimmed milk was added to the water-based composition P2, forming a new composition named P3.

In order to determine whether the composition of *B. subtilis* EA-CB0015 can act in combination with the chemical fungicide mixtures, the viability of *B. subtilis* EA-CB0015 was determined before and after subjecting the composition to tank mixtures used for the control of Black Sigatoka in commercial plantations. For this purpose, a sample of 10 mL of the composition was taken and subjected to the various tank mixtures described in Table 6.

Table 6. Mixtures of the water-based composition based on *Bacillus subtilis* EA-CB005
with various chemical fungicides.

Compound/ Treatment	Water (%V/V)	Agricultural Oil (%V/V)	Dithane® (%V/V)	Pegal® (%V/V)	Chlorothalon il® (%V/V)	Formulation (%V/V)	SICO® (%V/V)	SIGANEX® (%V/V)	Baycor® (%V/V)	Impulse® (%V/V)	OPUS® (%V/V)	Atlas® (%V/V)	Calixin® (%V/V)
Mixture 1	72,53	0	0	0	7,47	20	0	0	0	0	0	0	0
Mixture 2	38,86	40,88	8,79	0,41	0	9,31	1,76	0	0	0	0	0	0
Mixture 3	38,51	40,88	8,79	0,41	0	9,22	0	2,2	0	0	0	0	0
Mixture 4	38,51	40,88	8,79	0,41	0	9,22	0	0	2,2	0	0	0	0
Mixture 5	38,86	40,88	8,79	0,41	0	9,31	0	0	0	1,76	0	0	0
Mixture 6	36,75	40,88	8,79	0,41	0	8,78	0	0	0	0	4,4	0	0
Mixture 7	38,86	40,88	8,79	0,41	0	9,31	0	0	0	0	0	1,76	0
Mixture 8	38,51	40,88	8,79	0,41	0	9,21	0		0	0	0	0	2,2

5

For this evaluation, an 8 x 8 multifactorial design was used, wherein the first factor assessed was the type of tank mixtures with 8 levels, and the second factor was the exposure to the mixtures or the viability evaluation time with eight levels (0.0, 0.5, 1.5, 3.0, 6.0, 12.0, and 25.0 hours). The results were compared with the Rhapsody® biological control and two replicates were used per treatment.

The evaluated response variable was the number of CFU/mL in each of the evaluation times. Additionally, t_{d50} was determined, corresponding to the time when 50% of the biomass of *B. subtilis* EA-CB0015 loses its viability due to the exposure to each of the mixtures, using an univariate design for data analysis, wherein the factor is the percentage (%) of cell death.

The percentage of cell death after three and twenty-five hours was also determined, (3 hours is the average time it takes to apply a composition after it has been prepared and 25 hours is the maximum time that a composition remains in the mixing tanks before being applied).

Table 7 shows t_{d50} (the time when 50% of the *B. subtilis* EA-CB0015 spores lose viability) and the percentage of cell death after 3 and 25 hours for the composition of *B. subtilis* EA-CB0015 in each fungicide mixture. For its production, the culture was taken to a stirred tank and mixed with the respective composition adjuvants. M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, and M8 denote the various fungicide mixtures to which the formulations were subjected.

Table 7. Cell death percentage and t_{d50} of *B. subtilis* EA-CB0015 after mixing with various chemical fungicide mixtures.

Mixture	t_{d50} MH_2O (hours)	% cell death after 3 hours	% cell death after 25 hours
M1	>25	3,7	24,6
M2	>25	18,6	10.6
M3	>25	32.1	25.4
M4	>25	25,9	22,0
M5	>25	16,3	36,4
M6	>25	7,2	28,1
M7	>25	17,0	17.4
M8	>25	6,0	6.5

The above table indicates that the composition of *B. subtilis* EA-CB0015 showed a t_{d50} greater than 25 hours for all mixtures, reaching average viability reductions of only 20.1%. Furthermore, given that viability reductions in the composition were lower than 50%, the composition of the present invention most likely will provide extra protection to *B. subtilis* EA-CB0015, allowing to maintain viability for long periods of exposure to fungicide mixtures.

Regarding the percentage of viability loss, it was observed that in ordinary conditions, (3 hours) M2 (SICO®), M3 (Siganex®), and M4 (Baycor®) mixtures showed the highest bacterial viability reduction rates in the composition, whereas in extraordinary

conditions (25 hours), M1 (Bravonil®), M3 (Siganex®), M5 (Bumper®), and M6 (Opus®) showed the highest reduction rates.

EXAMPLE 9. Evaluating the effect of the compositions of the invention on the severity of Black Sigatoka. Greenhouse and field tests.

An evaluation of the effect of the bacterial water-based composition of *B. subtilis* EA-CB0015 on Black Sigatoka in greenhouse conditions was performed. To this end, 4-month old c.v. Williams banana plants were used and pathogen inoculation was made artificially by applying a mycelial suspension of the *M. fijiensis* fungus to leaf number one of the plant. The ascospore discharge methodology used by Cenibanano was employed to obtain the mycelium of *M. fijiensis* for the inoculation of the plants [11].

The compositions were applied one day after the inoculation of the plants with the pathogen. The compositions were diluted to a concentration of $1.0 \times 10^8 \pm 0.1$ CFU/mL and applied using a *Mini Spray gun with cup K-3®* airbrush with fan sprayer connected to a 30-psi compressor and calibrated for spraying 50 drops/cm² at a distance of 30 cm. The top and underside of the infected leaves were fumigated only once at a distance of 30 cm, ensuring a minimum concentration of 50 drops/cm².

A single-factor design was used for this experiment to evaluate the water-based composition (MH₂O y P3), a chemical control: Bravonil® in water, a biological control: Serenade® ($1 \times 10^8 \pm 0.1$ CFU/ml), and sterile water as absolute control.

Disease development was measured one month after the plants were infected. The degree of infection was determined using the Fouré scale(1982) [17] and the necrotic area was determined using a 8 Mega-pixel Samsung camera and Zeiss®'s Axio Visio® 4.2 image processing software.

The analysis of variance (ANOVA) indicated that there are statistically significant differences among the treatments. To determine these differences, a multiple range test

was conducted using the Turkey method. The percentages of necrotic area for the various treatments are shown in FIG. 14.

As shown in FIG. 14, the water-based mixture composition (MH₂O and P3) of *B. subtilis* EA-CB0015 according to the present invention and the Bravonil 720® positive control significantly reduced the percentage of necrotic area of banana leaves with percentages of 1.67% and 1.26%, respectively. FIG. 15 includes photographs of leaves subjected to each of the treatments, which visually show the difference in appearance of post-treatment leaves. The photographs were selected from portions of average leaves.

To determine the effectiveness of the water-based mixture composition of *B. subtilis* EA-CB0015, the product was evaluated at field level in a lot of 1.5 ha, with three plots per treatment. Each plot of 220 m² contained 42 plants; six central plants were taken per plot in order to evaluate the disease. Treatments were applied every 11 days with a motor sprayer (Stihl® SR-420) of 15 L capacity, spraying 60 drops per cm² of leaf.

The evaluation of Black Sigatoka disease was performed using two methodologies: biological warning and severity by Stover. FIG. 16 shows the area under the curve (AUC) for the severity of Black Sigatoka obtained during 14 weeks of evaluation. This figure shows that both water-based compositions of *B. subtilis* EA-CB0015 (MH₂O y P3) reduced disease severity with no significant differences when compared with chemical controls (Bravonil®, Dithane®) and biological control (Serenade®).

EXAMPLE 10. Effect of *B. subtilis* EA-CB0015 on *Botrytis cinerea* in pompoms

The effect of *B. subtilis* EA-CB0015 on *Botrytis Cinerea* in pom poms was evaluated. The pompoms were disinfected for 1 min in sodium hypochlorite 1%, washed with sterile distilled water, and finally allowed to dry. Then, each flower was placed in a disposable cup and each treatment was sprayed with an airbrush. After 24 hours of applying the treatments, the pathogen (*B. cinerea*) at a concentration of 5×10^3

spores/mL using an atomizer (2 mL) was applied and incubated at an average temperature of 20°C and a relative humidity above 90%.

Disease measurement was performed after 7 days according to the percentage of affected petals and the severity. FIG. 17 shows that the spore suspension of *B. subtilis* EA-CB0015 (T1) decreased the severity of the disease by 84% when compared with the untreated control (C).

EXAMPLE 11. Effect of *B. subtilis* EA-CB0015 on *Colletotrichum* sp. in tree tomato (*Cyphomandra betacea*).

The effect of *B. subtilis* EA-CB0015 on *Colletotrichum* sp. in tomato tree was evaluated. To this end, tomatoes were disinfected for 2 minutes in 70% ethanol, washed with sterile distilled water, and finally allowed to dry.

Then, a puncture of less than 2 mm in depth was made in the halfway region of the fruit and 25 µL of water (C) or spores of *B. subtilis* EA-CB0015 (T1, concentration 1×10^7 CFU/mL) were applied. After 24 hours, the puncture was inoculated with 15 µL of *Colletotrichum* sp. EAHP-007 at a concentration of 400,000 spores/mL.

FIG. 18 shows the effects of the suspension of spores of *B. subtilis* EA-CB0015 on the diameter of the puncture generated by *Colletotrichum* sp. EAHP-007 in the fruit, achieving effective control of the disease.

REFERENCES

- [1] M. Shoda, «Bacterial Control of Plant Disease,» *Journal of Bioscience and Bioengineering*, pp. 515-521, 200.
- [2] H. P. Bais, R. Fall and J. M. Vivanco, «Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production,» *Plant Physiology*, vol. 134, pp. 307-319, 2004.
- [3] T. Stein, «*Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions,» *Molecular Microbiology*, vol. 56, pp. 854-857, 2005.
- [4] M. Ongena and P. Jacques, «*Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 16, No. 3, pp. 115-125, 2008.
- [5] G. Winkelmann, R. Allgaier and G. Jung, «Iturin AL A New Chain Iturin A possessing an unusual high content of C16 - β - amino acids,» *Journal of Antibiotics*, vol. 16, pp. 1451-1457, 1983.
- [6] N. Vanittanakon y W. Loeffler, «Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3,» n° 7, pp. 888-901, 1986.
- [7] F. Peypoux, J. M. Bonmatin and J. Wallach, «Recent trends in the biochemistry of surfactin,» vol. 51, pp. 553-563, 1999.
- [8] Y. H. Wei, L. F. Wang , J. S. Changy and S. S. Kung, «Identification of induced acidification in in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation,» *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 96, No. 2, pp. 174-178, 2003.
- [9] X. J. Tang , G. Q. He, Q. H. Chen, X. Y. Zhang and M. Ali, «Medium optimization for the production of thermal stable beta-glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology,» *Bioresource Technology*, vol. 93, No. 2, pp. 175-181, 2004.
- [10] J. Pelaez, L. E. Vasquez, T. J. Diaz, D. A. Castañeda, E. Rodríguez and R. E. Arango, «Use of a micro title plate dilution assay to measure activity of antifungal compounds against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, *Revista Facultad Nacional de Agronomia*, vol. 59, n° 2,

- pp. 4325-3433, 2006.
- [11] Dupont, «Técnicas mejoradas para el manejo e identificación,» Boletín Técnico E55786, 1982.
- [12] A. G. C. I. and G. A. Riveros, «Microbiological control of black leaf streak disease,» de *Mycosphaerella leaf spot disease of bananas: present status and outlook*, Montpellier, INIBAP, 2003, pp. 287-295.
- [13] S. Talavera, E. Bustamante, R. González and V. Sánchez, «Selección y evaluación en laboratorio y campo de microorganismos glucanólíticos antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis*,» *Manejo Integrado de Plagas*, vol. 47, pp. 24-30, 1998.
- [14] P. Jacques, C. Hbid, J. Destain, H. Razafindralambo, M. Paquot, E. De Pauw and P. Thonart, «Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman Design,» *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vols. %1 de %277-79, pp. 223-233, 1999.
- [15] S. K. Brar, M. Verma , R. D. Tyagy, J. R. Valero and R. Y. Surampalli, «Screening of different Adjuvants for Waste/water sludge-based *Bacillus thuringiensis* formulation,» *Microbial Control*, vol. 99, n° 4, pp. 1065-1079, 2006.
- [16] H. Burges, Formulation of microbial biopesticidas, beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments, USA: Kluwer Academic Publishers, 1998.
- [17] E. Foure, «Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Comportement des variétés. Etude de la sensibilité varietale des bananiers et plantains e *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Gabon (maladie desreies noires). I-Incubation et evolution de la maladie,» *Fruits*, vol. 37, pp. 749-771, 1982.
- [18] G. Holz, S. Coertze and B. Williamson, «The Ecology of Botrytis on Plant Surfaces,» de *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Netherlands, Springer, 2007, pp. 9-27.
- [19] AgraQuest, «Serenade,» 2009. [Online]. Available at: www.agraquest.com. [Last accessed on: 17 03 2010].

[20] P. Tudzynski and L. Kokkelink, «). Botrytis cinerea: Molecular Aspects of a Necrotrophic Life Style,» de *Plant Relationships*, Berlin, Springer, 2009, pp. 29-50.

It should be understood that the present invention is not limited to the embodiments described and illustrated herein. As it will be apparent to one skilled in the art, there are
5 potential variations and modifications that do not depart from the spirit of the invention, which is only defined by the following claims:

10

15

20

25

30

CLAIMS

- 1) A procedure for increasing the production of biomass and metabolites of microorganisms of *Bacillus* sp. species, comprising the culture of the microorganism in a suitable culture medium under specific environmental conditions.
- 2) A procedure according to Claim 1, wherein the microorganism is selected from the group consisting of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*.
- 3) A procedure according to Claim 1, wherein the microorganism is *Bacillus subtilis* EA-CB0015 or *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959.
- 4) A procedure according to Claim 1, wherein the suitable culture medium comprises one or more components selected from the group consisting of carbohydrates, yeast extract, ammonium sulfate, peptone, salts containing magnesium, sulfur, manganese, chlorine, potassium, phosphorus, calcium, and sodium either in a solid, semisolid, or liquid matrix.
- 5) A procedure according to Claim 4, wherein the suitable culture medium has the following composition:

COMPONENT	Concentration (g/L)
Glucose	30,0 - 35,0
Yeast extract	30,0 - 35,0
MnSO ₄	0,025 - 0,05
Calcium chloride	0,02 - 0,04
Ammonium sulfate	0,80 - 1,20
MgSO ₄	3,50 - 5,00
HPO ₄	0.40 - 0.60
KH ₂ PO ₄	0.40 - 0.60

6) A procedure according to Claim 1, wherein the specific environmental conditions include pH, temperature, stirring speed, fermentation time, and aeration.

7) A procedure according to Claim 6, wherein the specific environmental conditions of culture are:

Stirring speed	400-600 rpm
Aeration	1-5 vvm
pH	5,5 - 7,5
Temperature	20 - 40°C
Fermentation time	10-100 hours

8) A procedure according to Claim 1, wherein the obtained biomass is additionally separated by centrifugation and/or microfiltration.

9) A procedure according to Claim 1, wherein the metabolites are additionally extracted by solvent extraction, precipitation, adsorption, or chromatography.

10) Biomass of *Bacillus subtilis* or *Bacillus amyloliquefaciens* obtained by a procedure according to Claims 1 to 8.

11) Biomass of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 obtained by a procedure according to Claims 1 to 8.

12) Biomass of *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 obtained by a procedure according to Claims 1 to 8.

13) Metabolites of *Bacillus subtilis* and/or metabolites of *Bacillus amyloliquefaciens*, obtained by a procedure according to Claims 1 to 9.

14) Metabolites of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 and/or metabolites of *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959, obtained by a procedure according to Claims 1 to 9.

15) Metabolites of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 and/or *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 according to Claim 14, characterized by being lipopeptides of the surfactin, iturin, and fengycin families.

5 16) Metabolites of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 according to Claim 15, wherein the lipopeptides of the fengycin family correspond to fengycin C having the general formula:



10 wherein R corresponds to a saturated or unsaturated hydrocarbon chain of 14 to 18 carbons.

17) Metabolites of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 and/or metabolites of *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 according to Claims 13 to 16, with antimicrobial activity.

15

18) A composition comprising biomass of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 according to Claim 11 and/or metabolites thereof, together with an agrochemically acceptable carrier.

20 19) A composition comprising biomass of *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 according to Claim 12 and/or its metabolites, together with an agrochemically acceptable carrier.

25 20) A composition comprising metabolites of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 and/or metabolites of *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 according to Claim 14, together with an agrochemically acceptable carrier.

30 21) A composition according to any of Claims 18 to 20, further comprising one or more biocidal agents selected from the group consisting of anilinopyrimidines, bitartenols, sterols, difeconazole, tebuconazole, epoxiconazole, mancozeb, and cloratolonil.

22) A composition according to any of Claims 18 to 21, comprising:

COMPONENT	CONCENTRATION
Culture of <i>Bacillus</i> sp.at a concentration of 7.0 to 18.0 g/L	86.6% - 93.2% v/v
Sodium carboxymethyl cellulose	2.0 - 4.0 w/v
phosphate buffer 3M pH 5	1.0 - 5.0 v/v
Glycerol	1.0 - 4.0 v/v
Tween 20	0.25 - 0.75 v/v
Triton X100	0.25 - 0.75 v/v
Potassium sorbate	0.01 - 0.1 v/v
Xanthan gum	0.05 - 0.15 w/v
Skimmed milk	0.20 - 1.50 w/v
Titanium dioxide	0.03 - 1.00 w/v

- 23) Use of biomass of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 and/or biomass of *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 according to Claims 11 and 12 for controlling plant pathogens such as *Mycosphaerella fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* sp., *Monilia* sp., *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*.
- 24) Use of biomass of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 and/or *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 according to Claims 14 for controlling plant pathogens such as *Mycosphaerella fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* sp., *Monilia* sp. *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*.
- 25) Use of a composition according to Claims 18 to 22 for controlling plant pathogens such as *Mycosphaerella fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* sp., *Monilia* sp., *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*.
- 26) A method for the treatment of crops against phytopathogenic agents that comprises the application of an effective biomass amount of *Bacillus subtilis* EA-

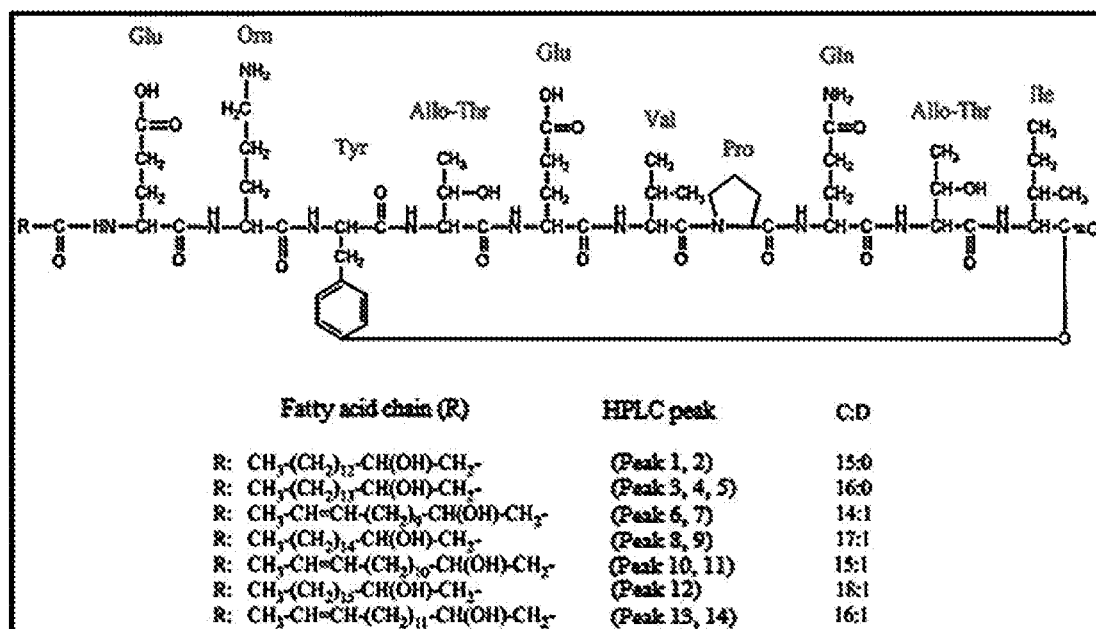
CB0015 and/or biomass of *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 according to Claims 11 and 12.

27) A method for the treatment of crops against phytopathogenic agents that
5 comprises the application of an effective amount of metabolites of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 and/or *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 according to Claim 14.

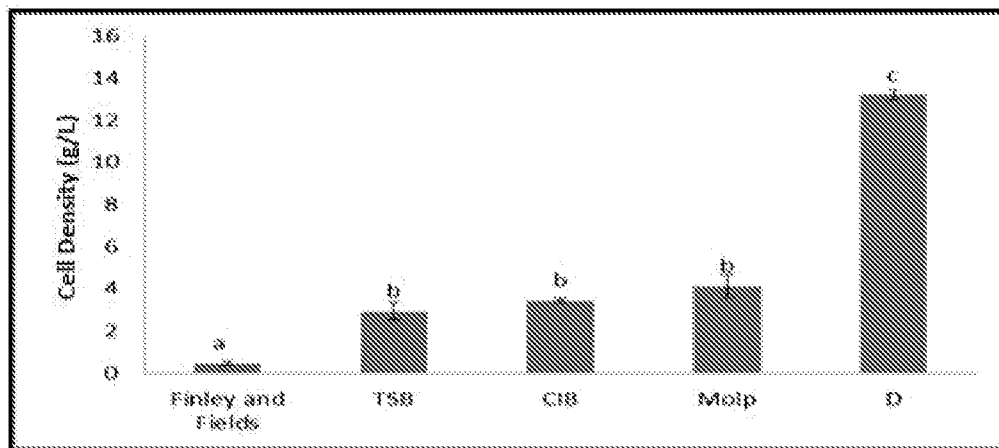
28) A method for the treatment of crops against phytopathogenic agents such as
10 *Mycosphaerella fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* sp., *Monilia* sp., *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*, comprising the application of an effective amount of a composition according to Claims 18 to 22.

15

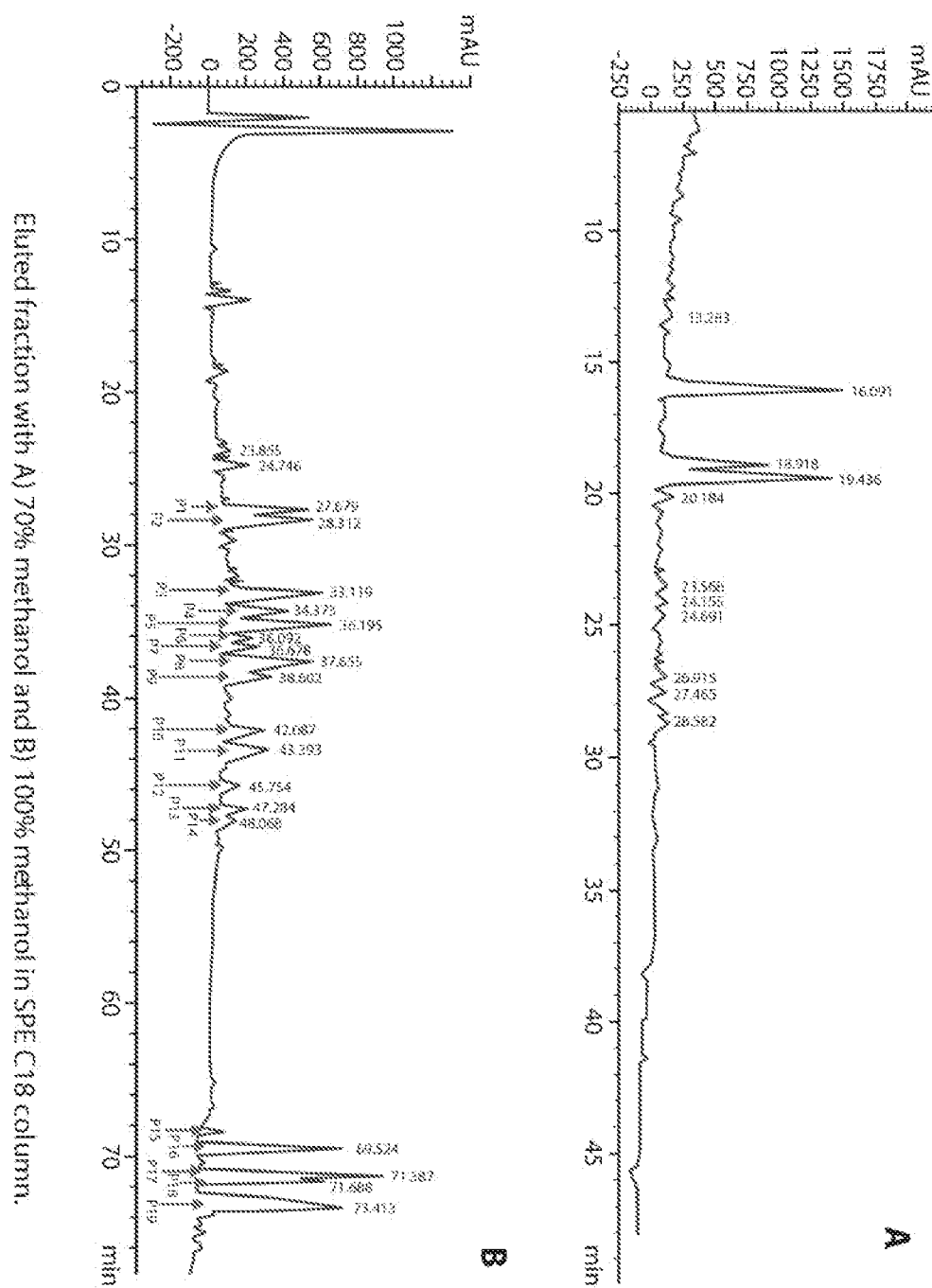
FIG 1.



(C:D: C denotes the number of carbons and D denotes the number of unsaturations)

FIG. 2

Different letters denote significant differences (P value <0.05).

FIG. 3

Eluted fraction with A) 70% methanol and B) 100% methanol in SPE C18 column.

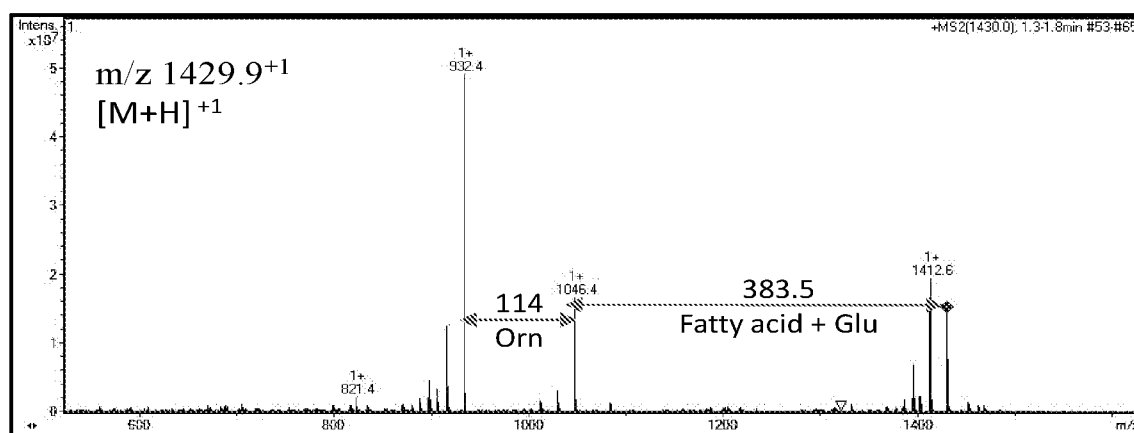
FIG. 4

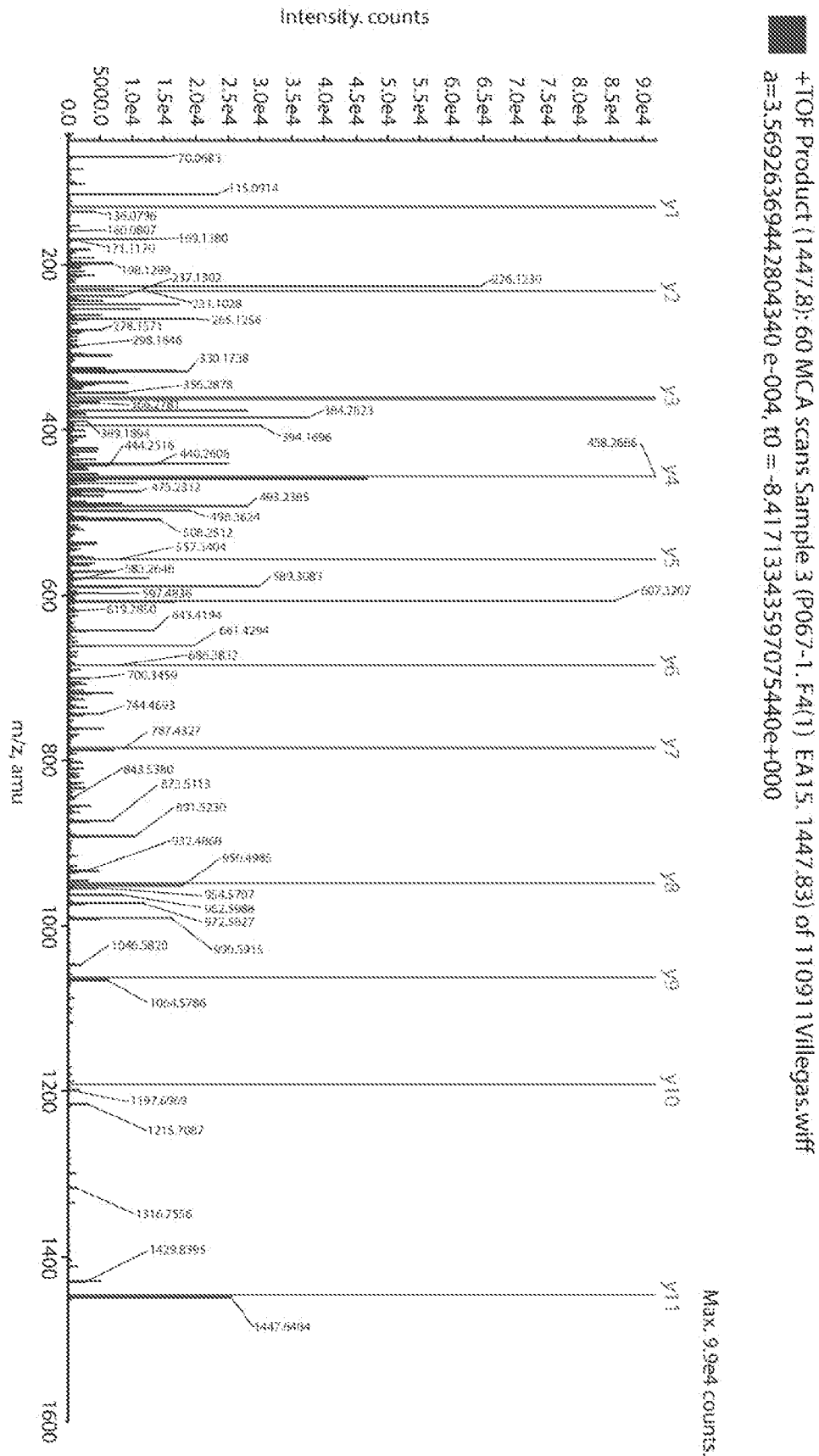
FIG. 5.

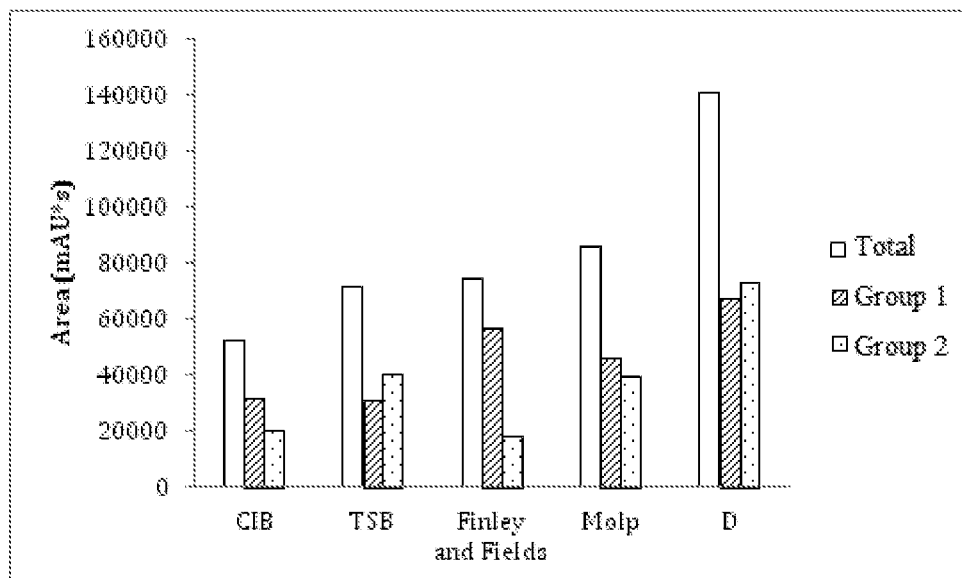
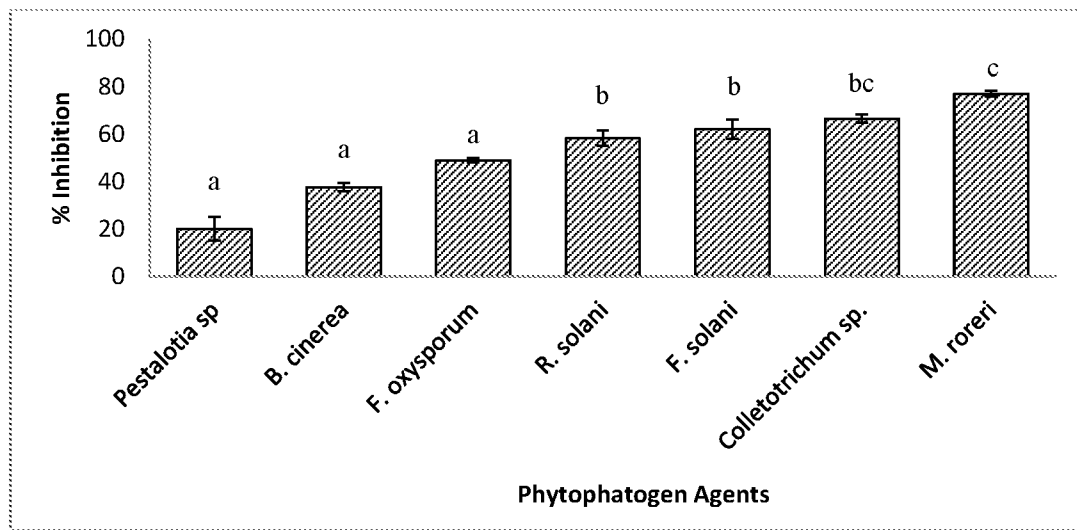
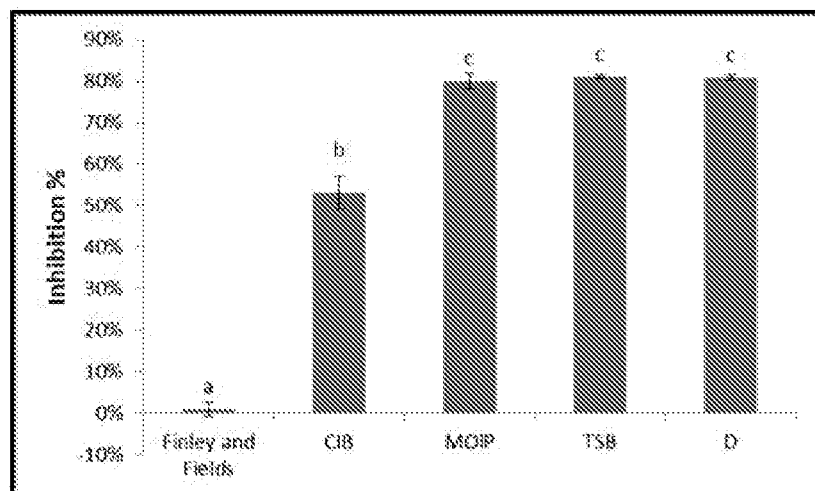
FIG. 6

FIG. 7

Different letters denote significant differences (P value <0.05).

FIG. 8

Different letters denote significant differences (P value <0.05).

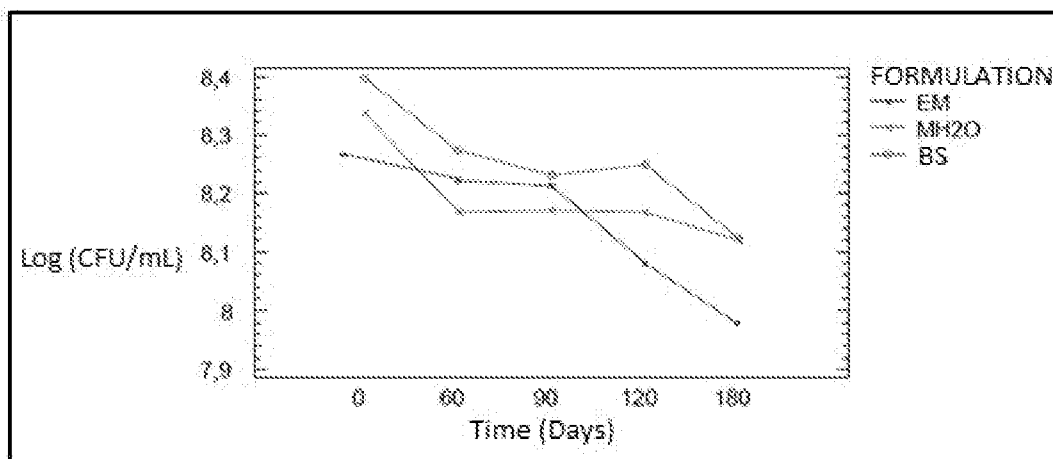
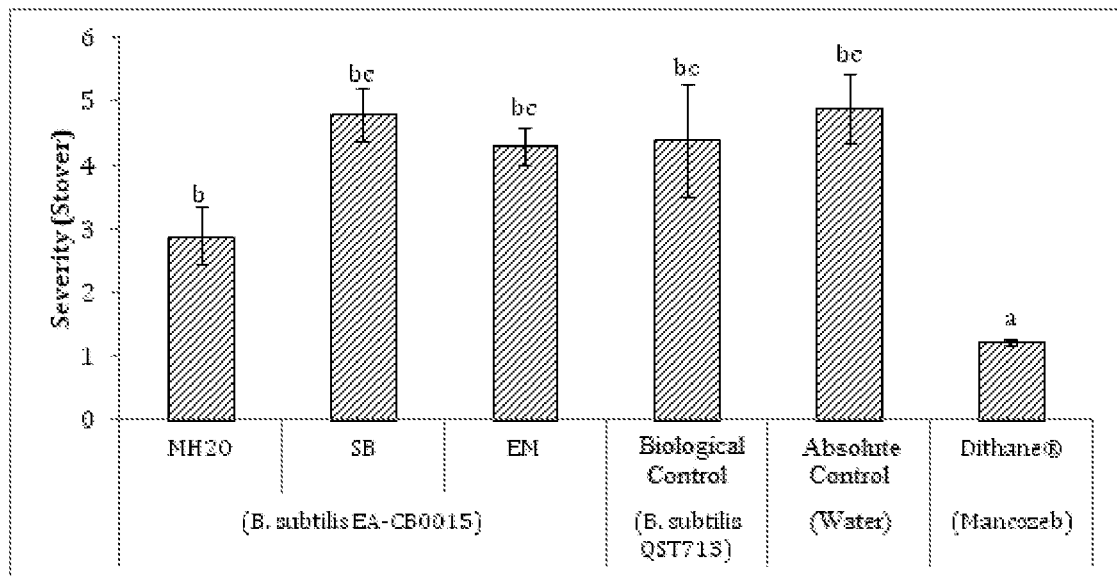
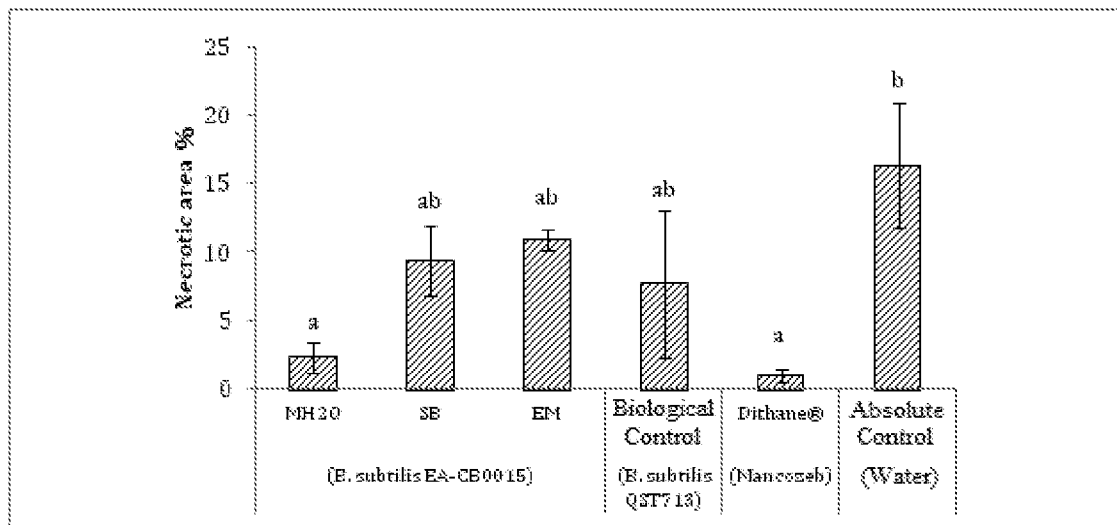
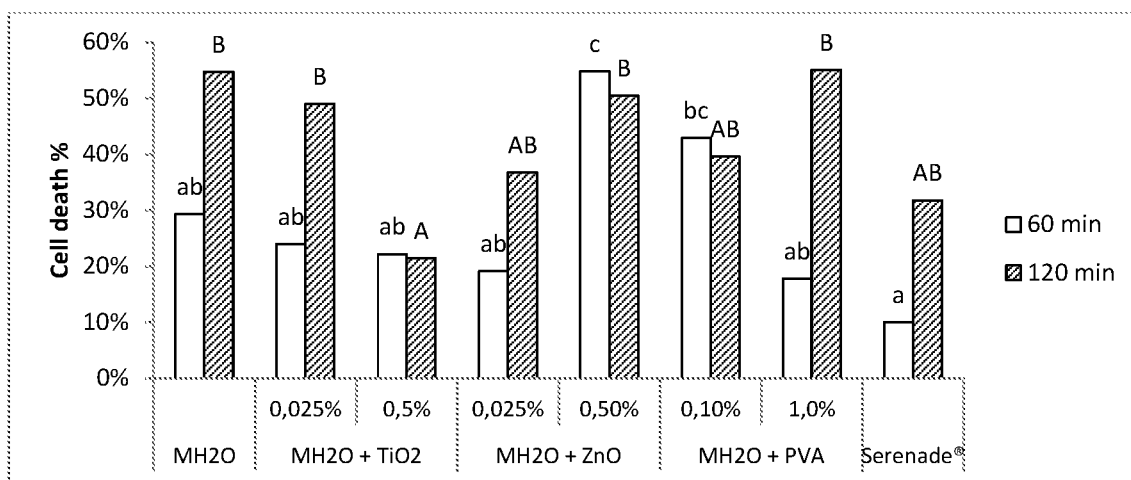
FIG. 9

FIG. 10

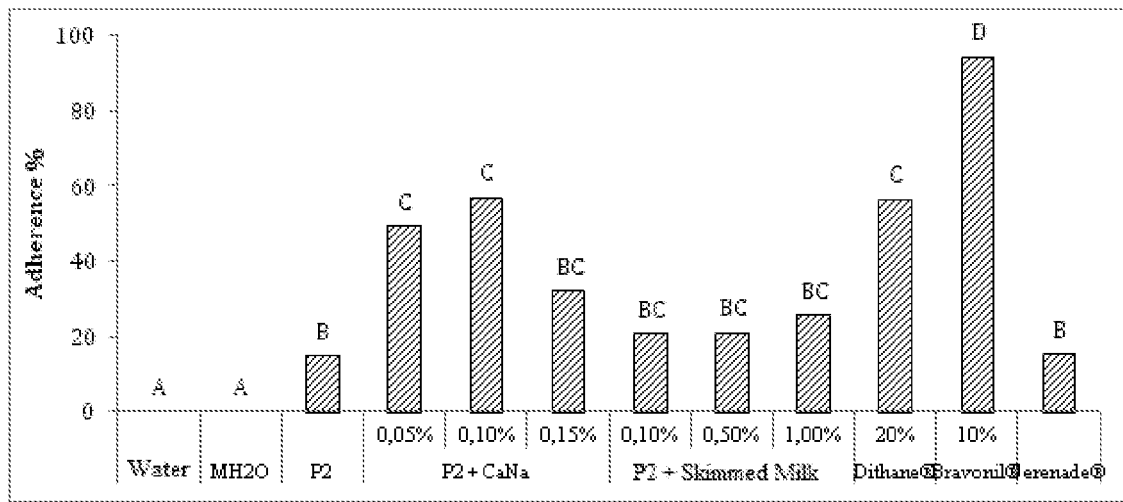
Different letters denote significant differences (P value < 0.05).

FIG. 11

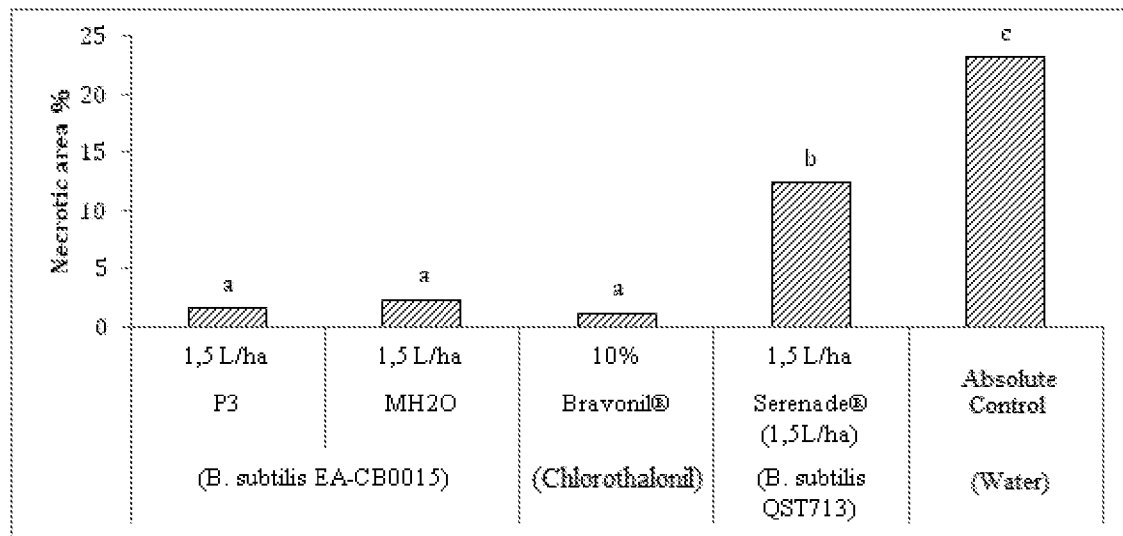
Different letters denote significant differences (P value <0.05).

FIG. 12

Different letters denote significant differences (P value < 0.05).

FIG. 13

Different letters denote significant differences (P value < 0.05).

FIG. 14

Different letters denote significant differences (P value <0.05).

FIG. 15

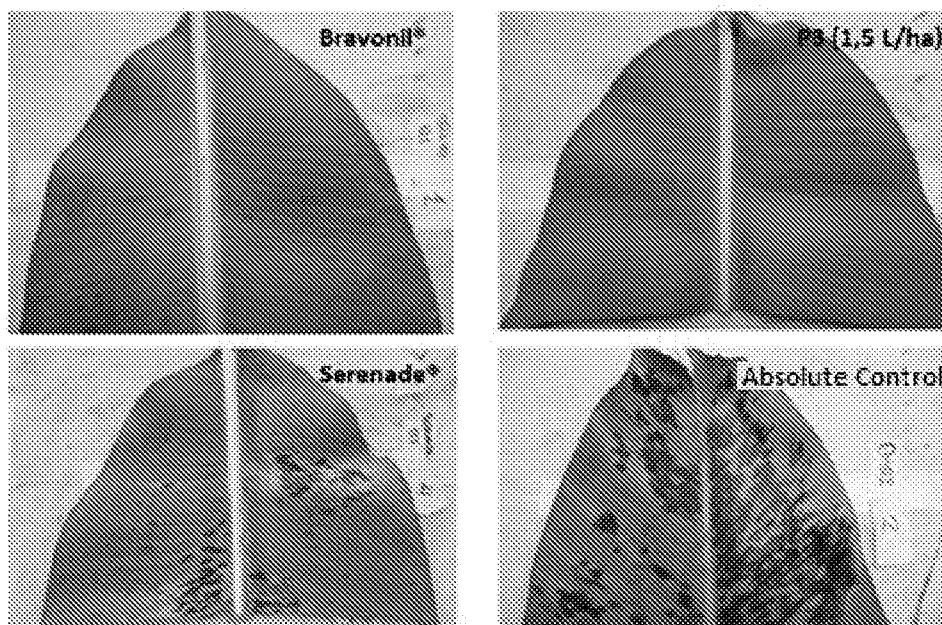
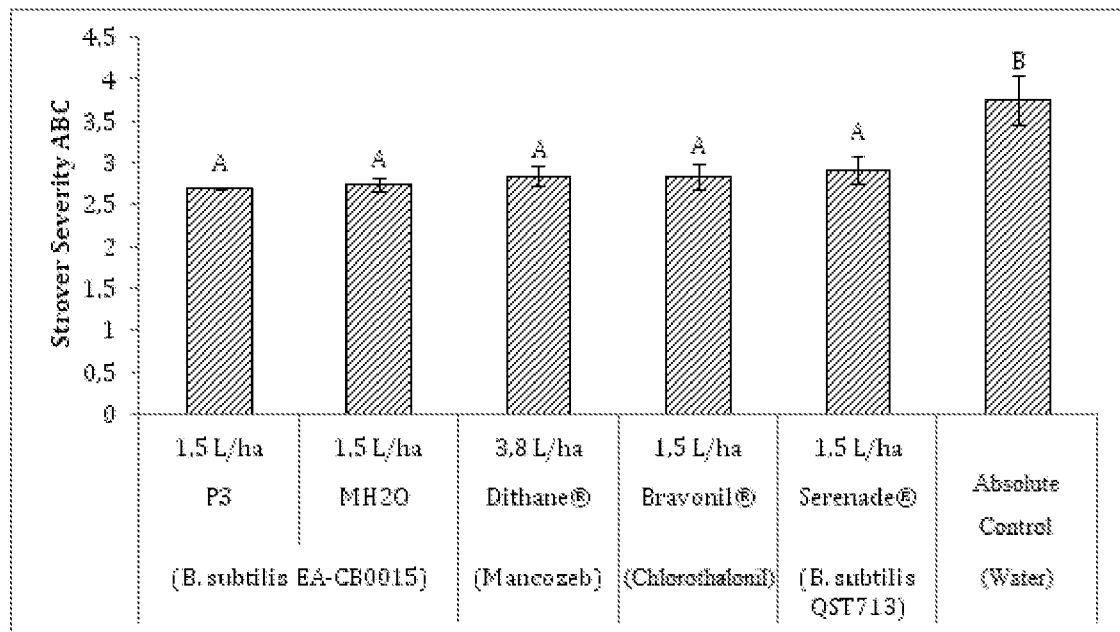
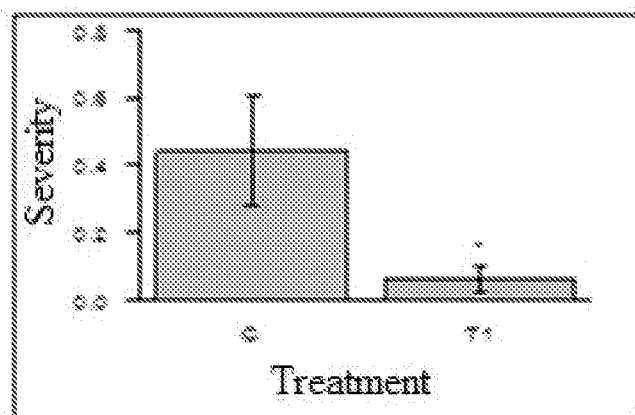
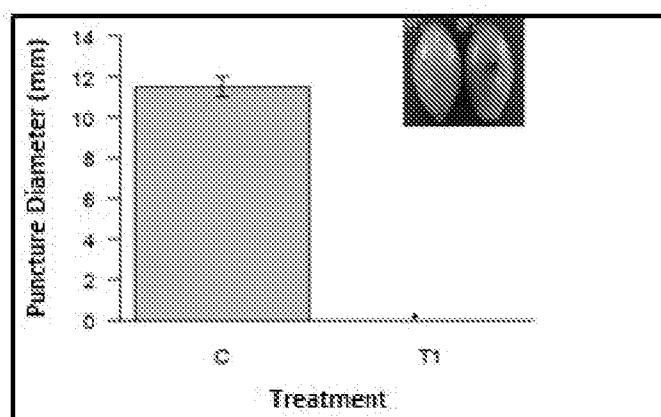


FIG. 16

Different letters denote significant differences (P value <0.05).

FIG. 17

* Denotes significant differences in relation to the control (C)
(P value <0.05)

FIG. 18

* Denotes significant differences in relation to the control (C)
(P value <0.05)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2014/061167

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A01N63/02 C07K14/32
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A01N C07K

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

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

EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VALESKA VILLEGAS-ESCOBAR ET AL: "Fengycin C Produced by Bacillus subtilis EA-CB0015", JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS, vol. 76, no. 4, 5 March 2013 (2013-03-05), pages 503-509, XP055142706, ISSN: 0163-3864, DOI: 10.1021/np300574v	1-4,6, 8-11, 13-20, 23-28
Y	abstract page 507 - page 508; figure 4 ----- -/--	5,7,21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

"E" earlier 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

30 September 2014

Date of mailing of the international search report

07/10/2014

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Gurdjian, Didier

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2014/061167

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ISABEL CEBALLOS ET AL: "Cultivable Bacteria Populations Associated with Leaves of Banana and Plantain Plants and Their Antagonistic Activity Against", MICROBIAL ECOLOGY, SPRINGER-VERLAG, NE, vol. 64, no. 3, 5 May 2012 (2012-05-05), pages 641-653, XP035116074, ISSN: 1432-184X, DOI: 10.1007/S00248-012-0052-8	1-4,6,8, 10, 12-15, 18,20, 23-28
Y	abstract	5,7,21
X	----- WO 2013/050700 A2 (UNIV LILLE 1 SCIENCES ET TECHNOLOGIES USTL [FR]; COUTTE FRANCOIS [FR];) 11 April 2013 (2013-04-11)	1,2,4, 13-15
Y	page 6, line 16 - line 18 page 6, line 26 - page 7, line 10; examples 2,3	5,7,21
Y	----- WO 2010/108973 A2 (BASF SE [DE]; SCHERER MARIA [DE]; KLAPPACH KRISTIN [DE]; HADEN EGON [D]) 30 September 2010 (2010-09-30)	21
	page 7, line 37 page 8, line 12 - line 14 page 9, line 27 page 24; claims 1,10-12 page 26 - page 28	
X	----- EEMAN M ET AL: "Influence of environmental conditions on the interfacial organisation of fengycin, a bioactive lipopeptide produced by Bacillus subtilis", JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE, ACADEMIC PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 329, no. 2, 15 January 2009 (2009-01-15), pages 253-264, XP025677564, ISSN: 0021-9797, DOI: 10.1016/J.JCIS.2008.10.017 [retrieved on 2008-10-14]	13-15
A	abstract	1,2,10, 18,23,26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2014/061167

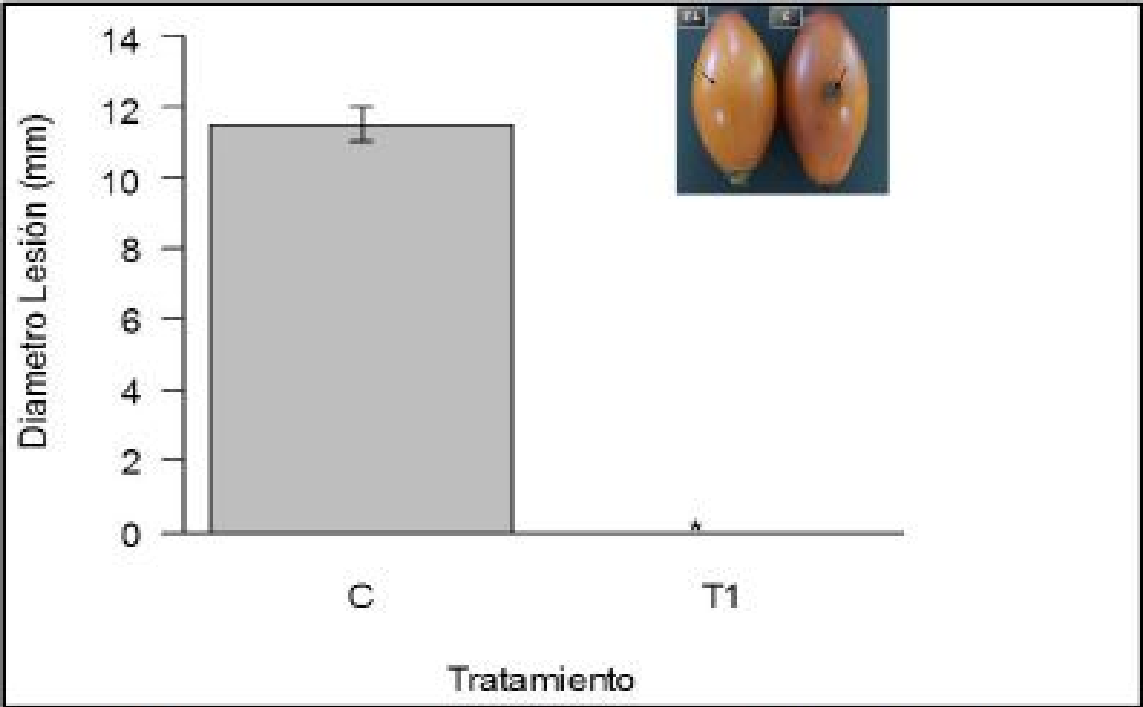
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013050700 A2	11-04-2013	AU 2012320330 A1 CA 2851033 A1 EP 2764126 A2 FR 2980802 A1 WO 2013050700 A2	01-05-2014 11-04-2013 13-08-2014 05-04-2013 11-04-2013
WO 2010108973 A2	30-09-2010	AR 076150 A1 AU 2010227493 A1 CA 2753150 A1 CN 102361551 A CR 20110460 A EA 201101333 A1 EC SP11011349 A EP 2410840 A2 JP 2012521390 A KR 20110132461 A NZ 594887 A PE 05362012 A1 US 2012003199 A1 US 2014212401 A1 WO 2010108973 A2	18-05-2011 20-10-2011 30-09-2010 22-02-2012 24-10-2011 30-05-2012 31-10-2011 01-02-2012 13-09-2012 07-12-2011 29-11-2013 05-05-2012 05-01-2012 31-07-2014 30-09-2010

RESUMEN

La presente invención se refiere a un proceso para incrementar la producción de biomasa y metabolitos de microorganismos de la especie *Bacillus* sp. Los metabolitos obtenidos son compuestos tipo lipopeptidos de la familia de las fengicinas, surfactinas e iturinas, los cuales exhiben actividad antimicrobiana.

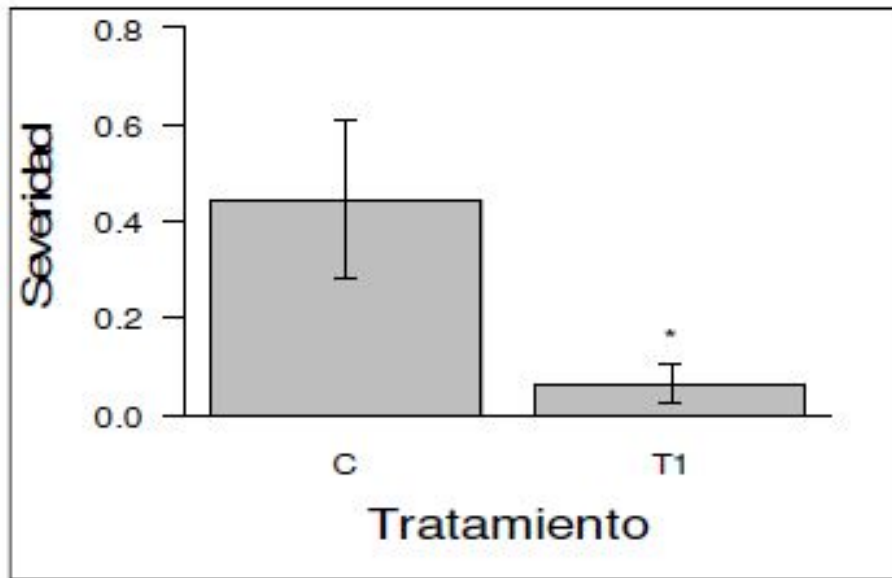
La invención comprende además composiciones biocidas que comprenden *Bacillus subtilis* EA-CB0015, *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 y/o sus metabolitos bien sea de manera individual o junto con otros agentes biocidas, así como el uso de estas composiciones para el tratamiento de enfermedades causadas por diversos agentes fitopatógenos, entre ellos *Mycosphaerella fijiensis*, en una gran variedad de cultivos.

FIG. 18



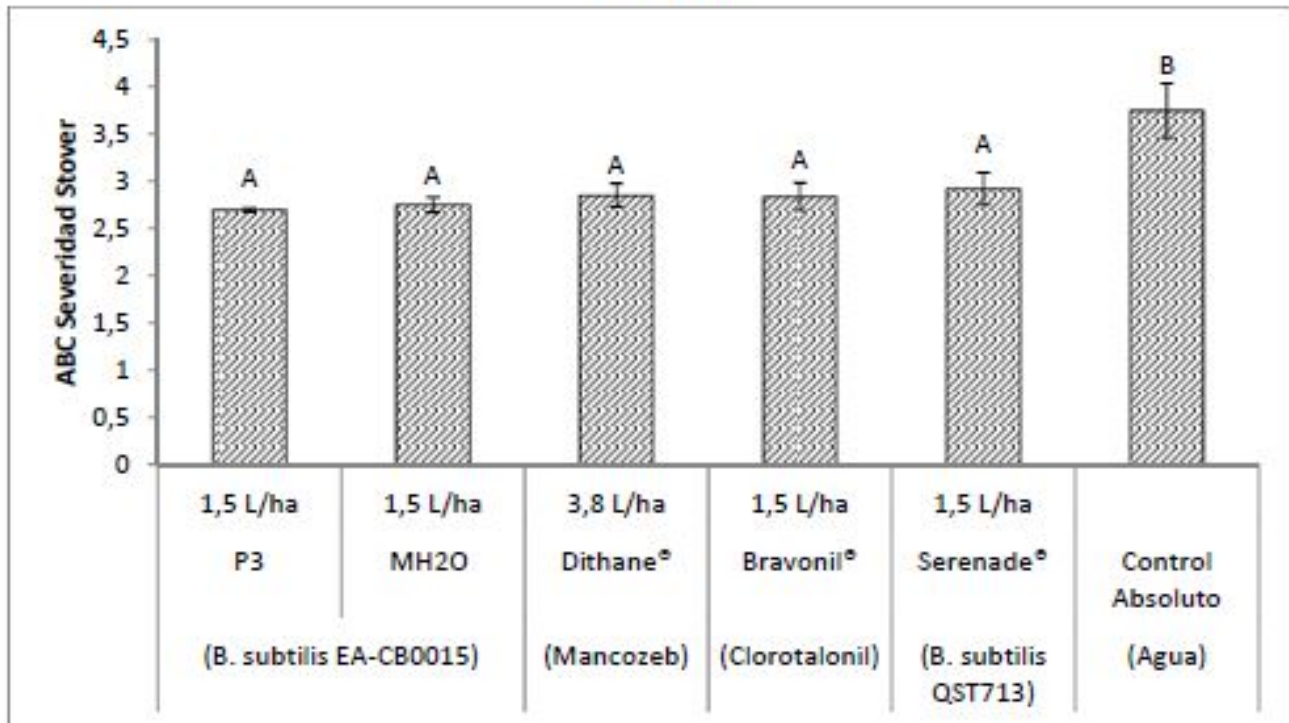
* Denota diferencias significativas con relación al control (C) (valor $P < 0.05$)

FIG. 17



* Denota diferencias significativas con relación al control (C) (valor $P < 0.05$)

FIG. 16



Letras diferentes denotan diferencias significativas (valor $P < 0.05$)

FIG. 15

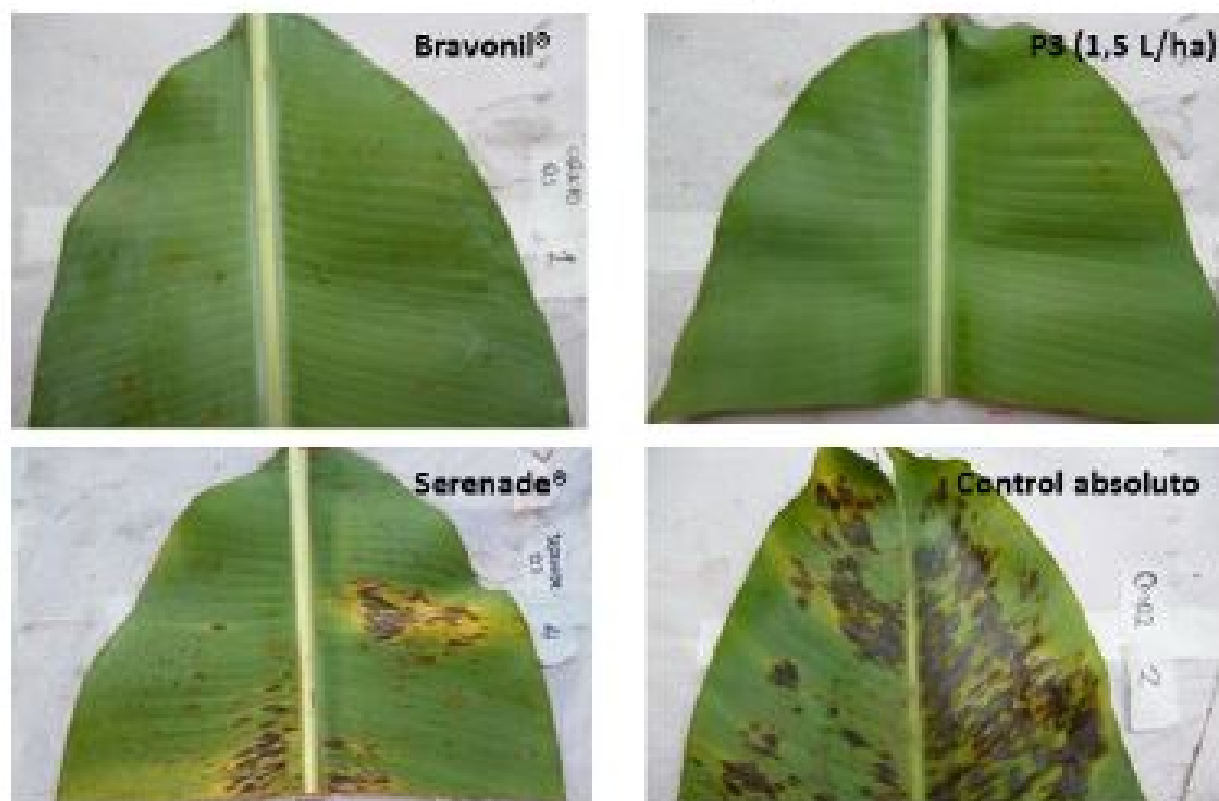
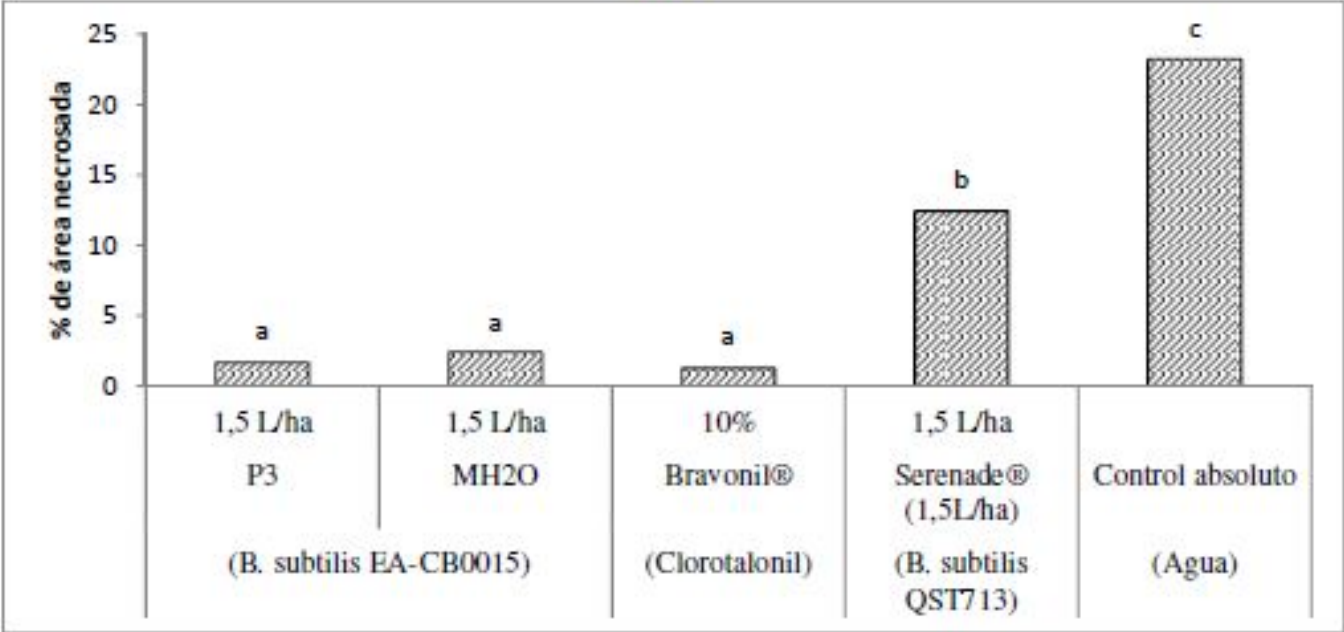
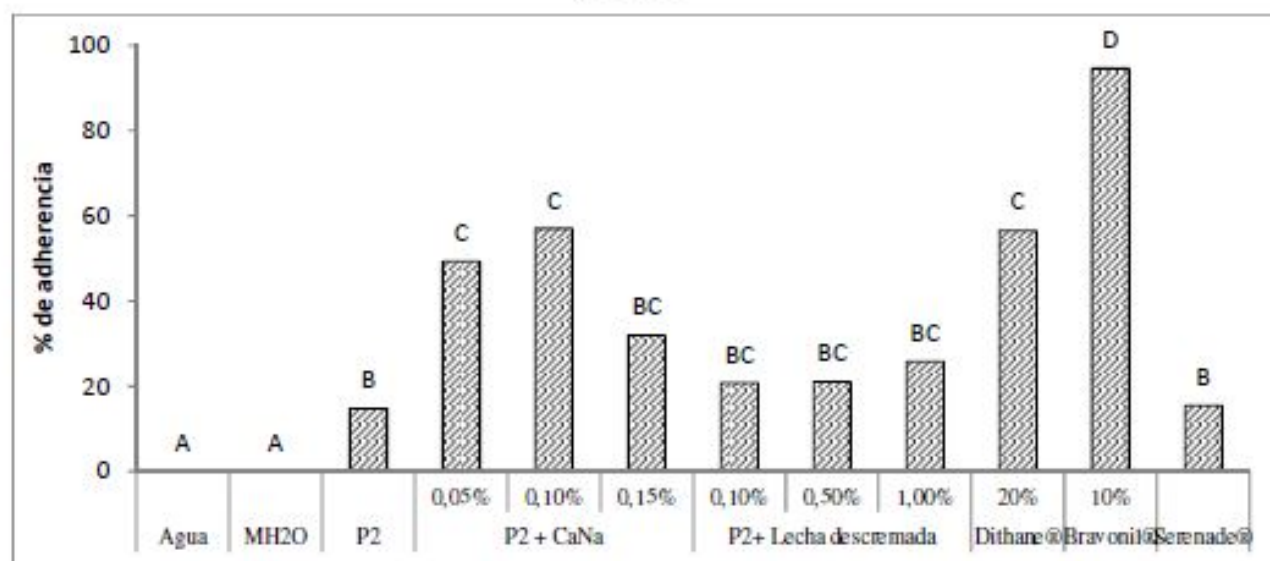


FIG. 14



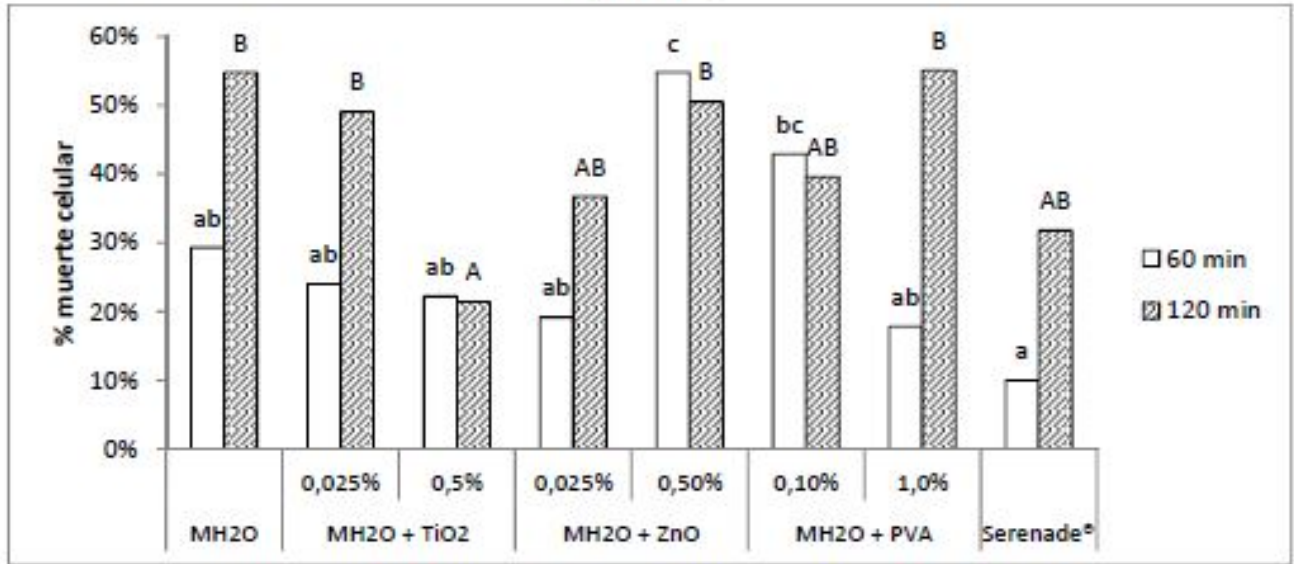
Letras diferentes denotan diferencias significativas (valor $P < 0.05$)

FIG. 13



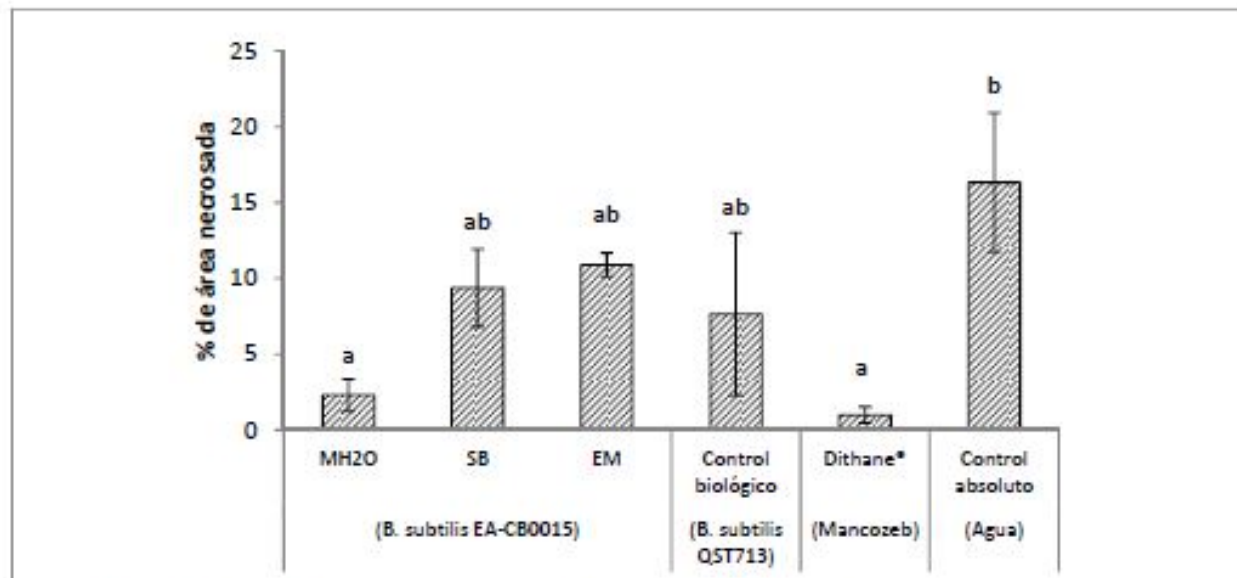
Letras diferentes denotan diferencias significativas (valor $P < 0.05$)

FIG. 12



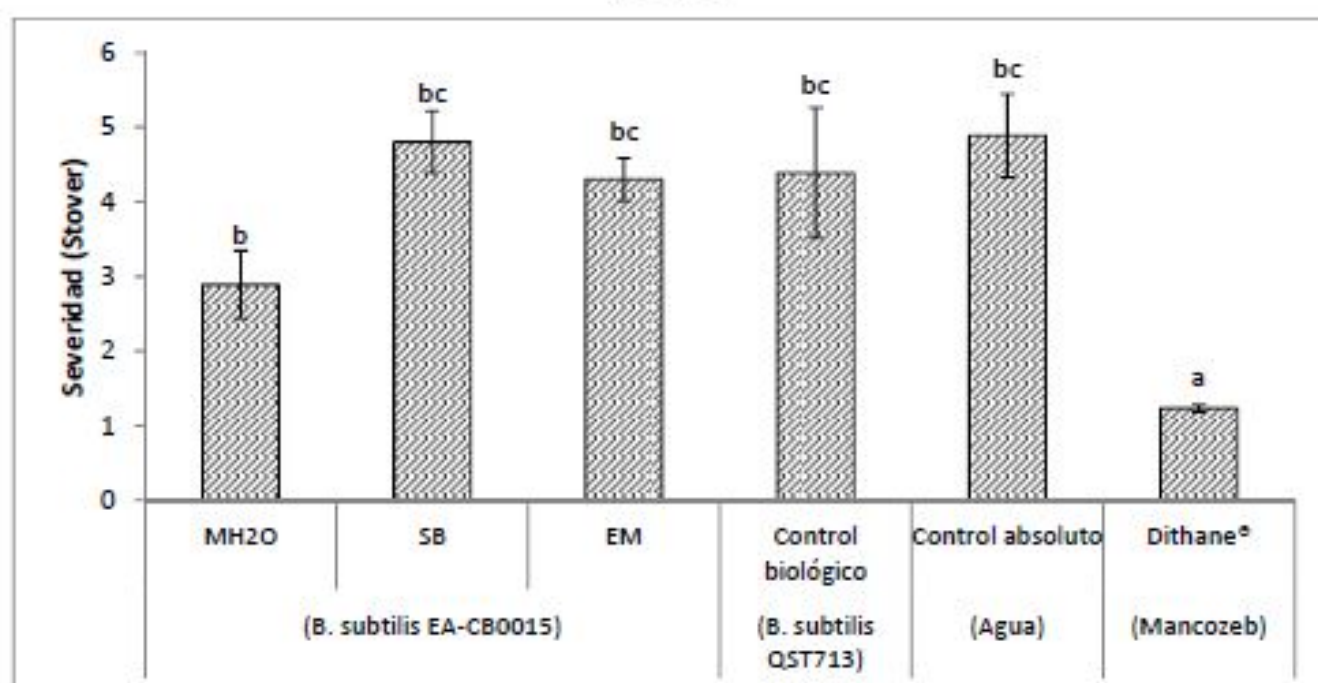
Letras diferentes denotan diferencias significativas (valor $P < 0.05$)

FIG. 11



Letras diferentes denotan diferencias significativas (valor $P < 0.05$)

FIG. 10



Letras diferentes denotan diferencias significativas (valor $P < 0.05$)

FIG. 9

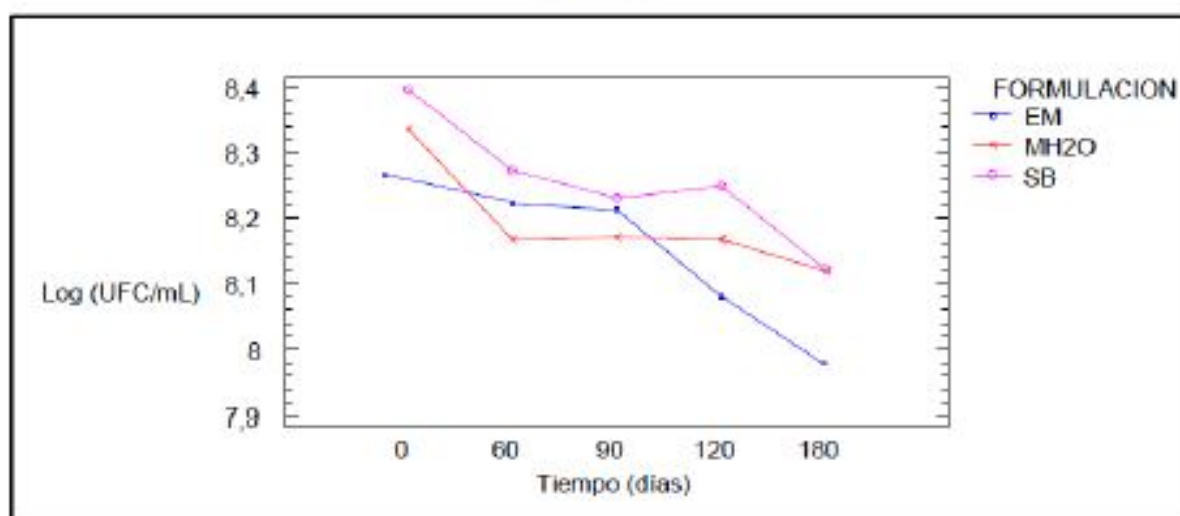
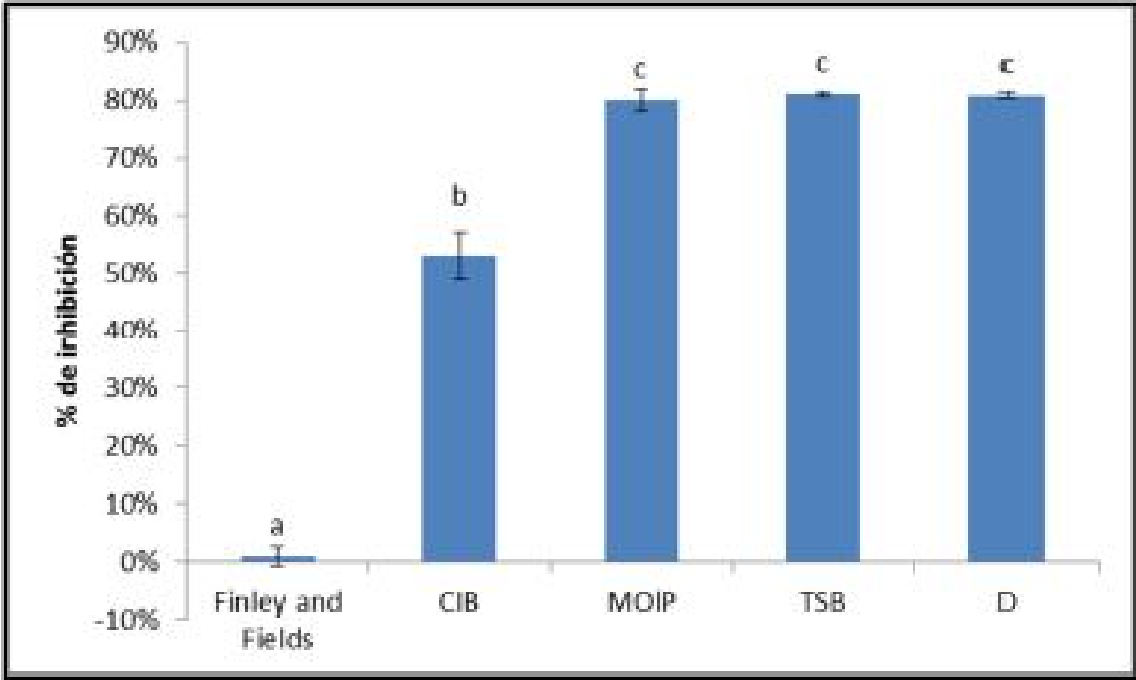
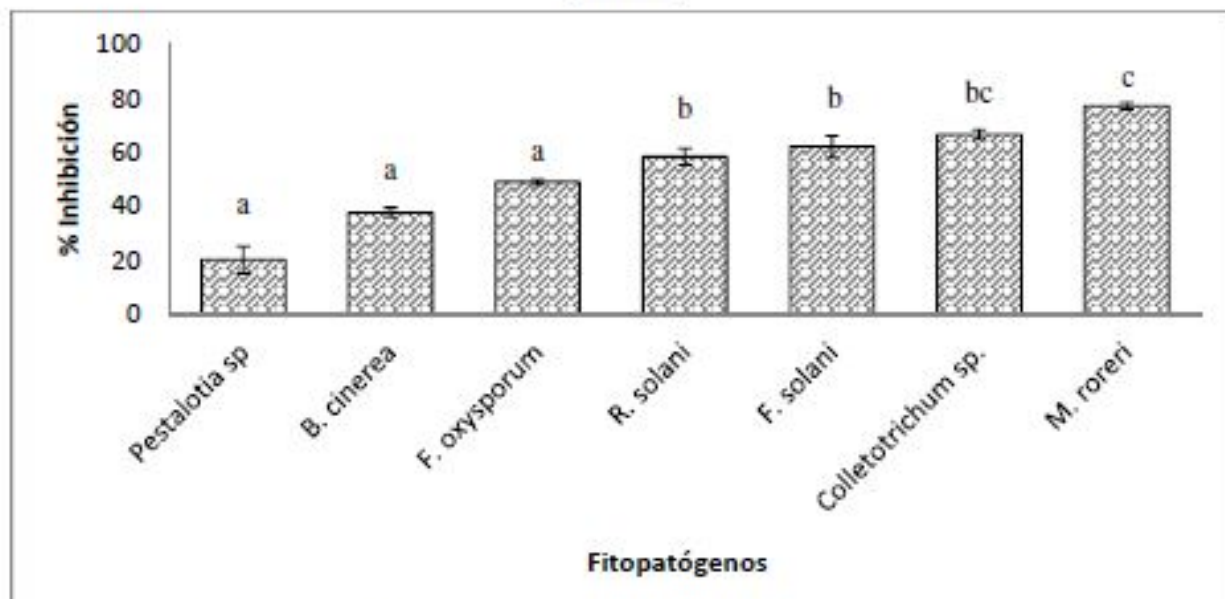


FIG. 8



Letras diferentes denotan diferencias significativas (valor $P < 0.05$)

FIG. 7



Letras diferentes denotan diferencias significativas (valor $P < 0.05$)

FIG. 6

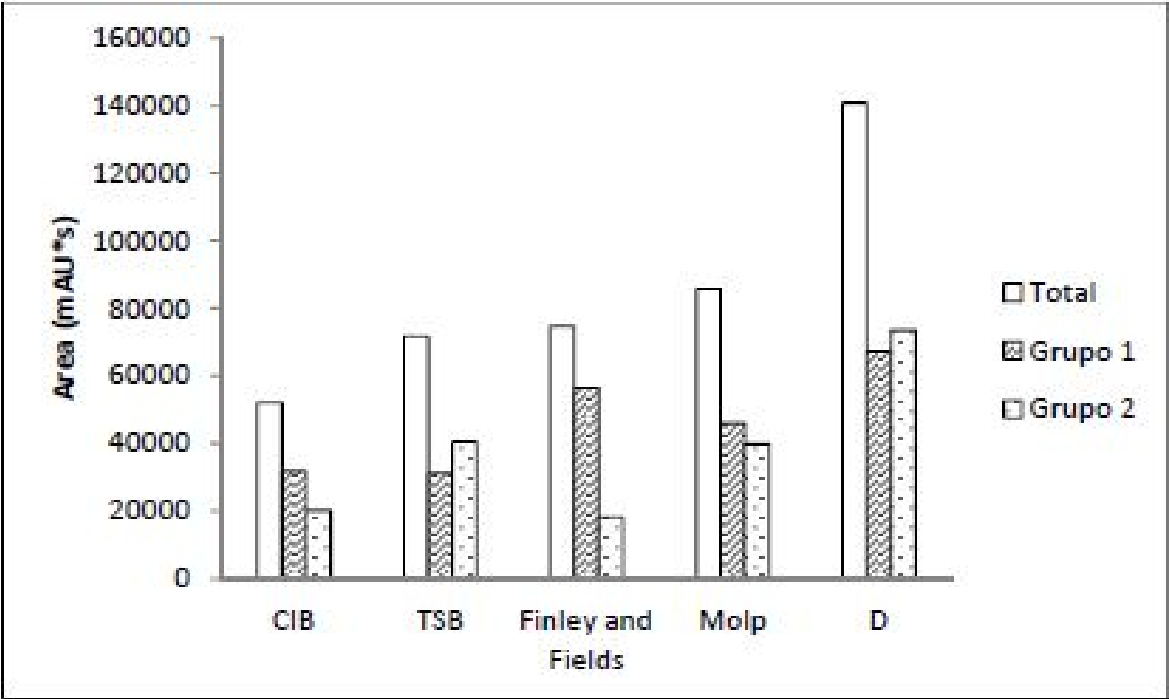


FIG. 4

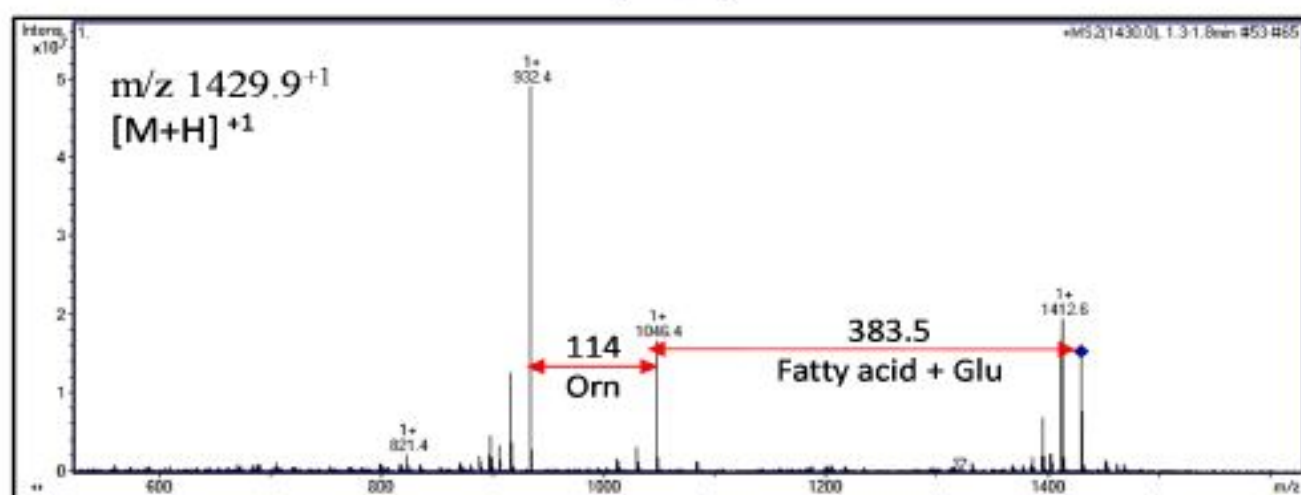
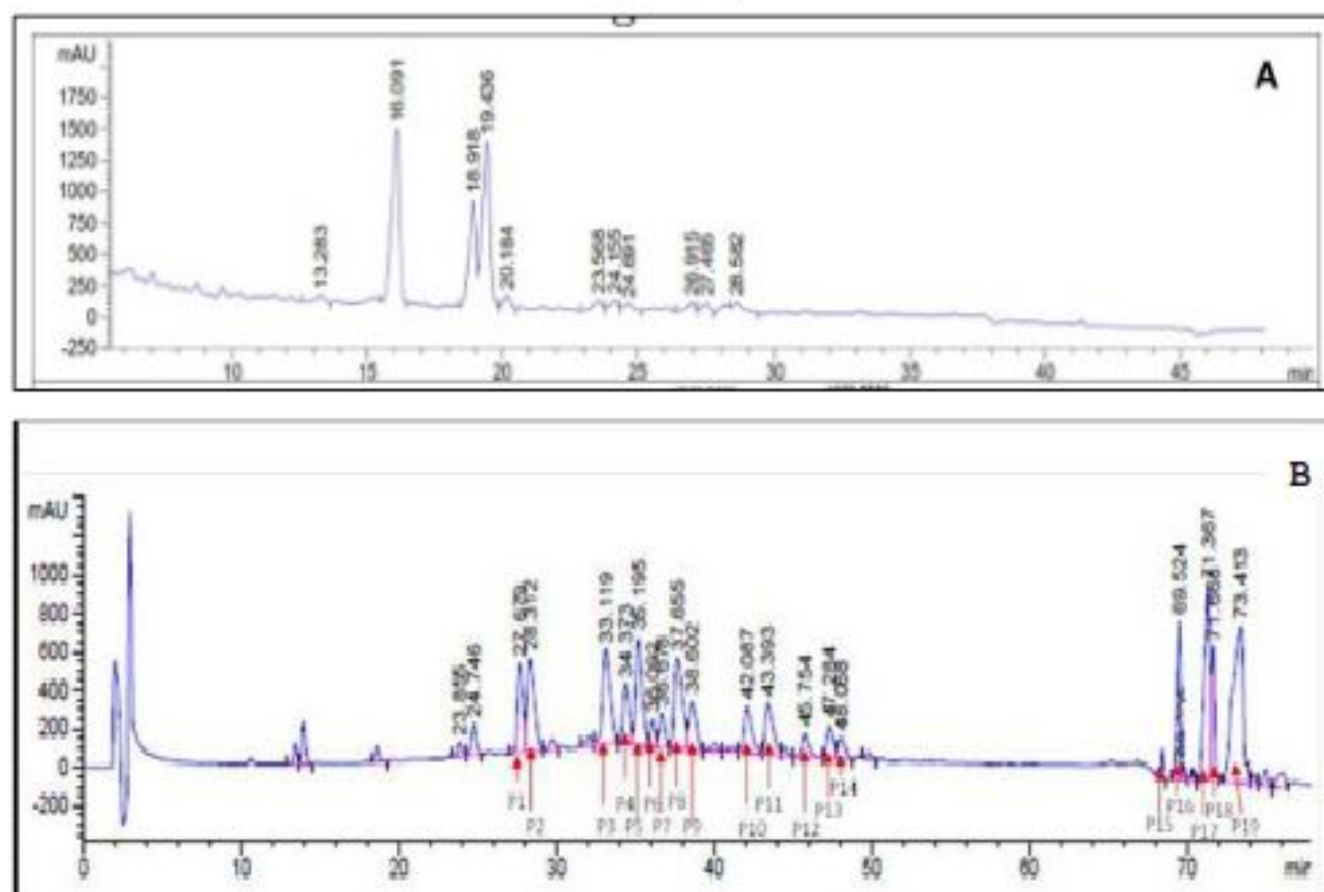
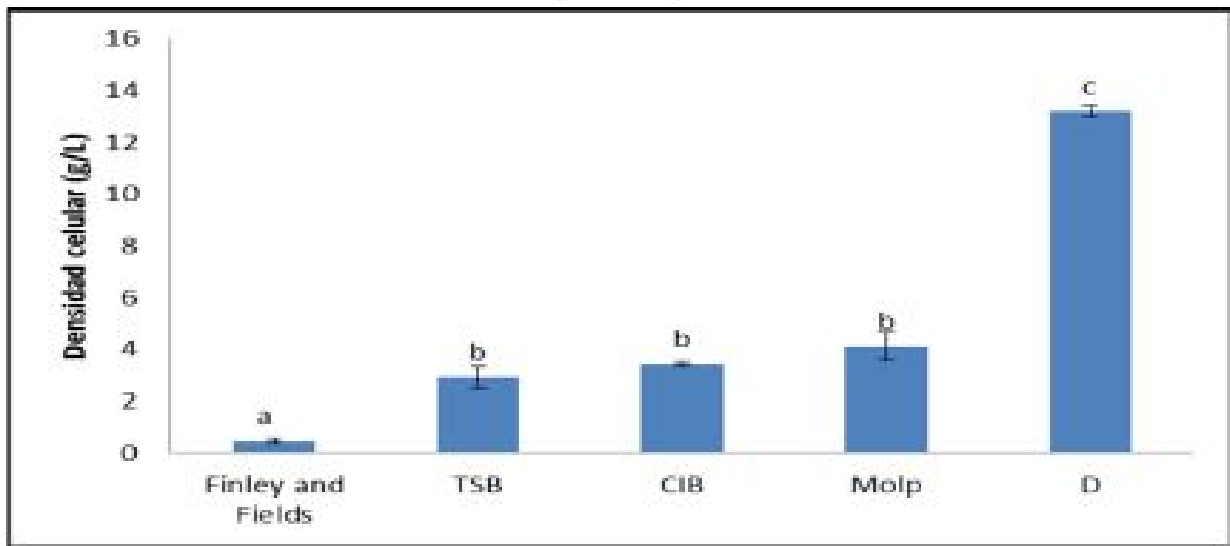


FIG. 3



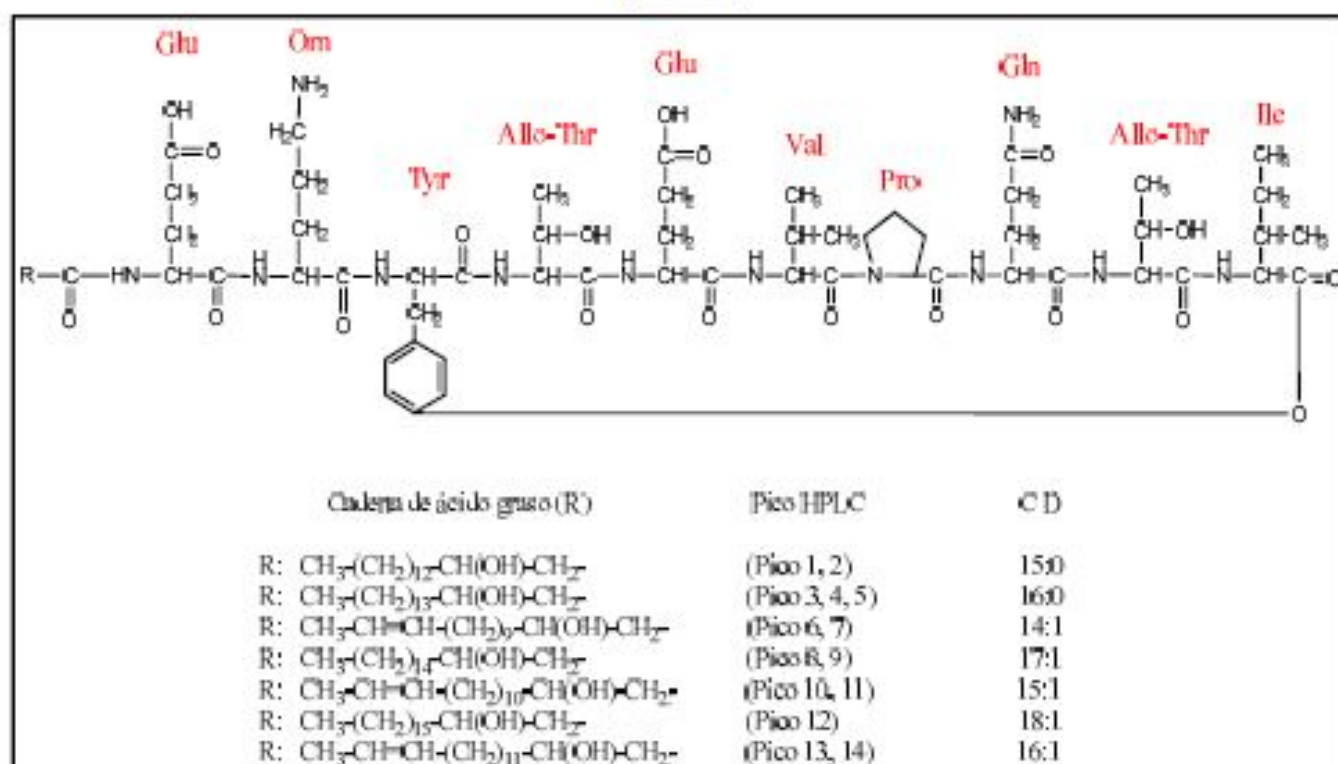
Fración eluida con A) 70% de metanol y B) 100% de metanol en columna SPE C18.

FIG. 2



Letras diferentes denotan diferencias significativas (valor $P < 0.05$)

FIG. 1



(C:D: C denota el número de carbonos y D el número de insaturaciones)