REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102020013481-7

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102020013481-7

(22) Data do Depósito: 30/06/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 11/01/2022

(51) Classificação Internacional: A01N 63/22; C12N 1/20; C12P 1/04; A01P 3/00.

(52) Classificação CPC: A01N 63/22; C12N 1/20; C12P 1/04.

(54) Título: COMPOSIÇÃO BIOFUNGICIDA COMPREENDENDO BACILLUS VELEZENSIS

(73) Titular: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 78640489000153. Endereço: RODOVIA CELSO GARCIA CD, KM 380 S/N CAMPUS UNIVERSITARIO, Londrina, PR, BRASIL(BR), 86055-900

(72) Inventor: ADMILTON GONÇALVES DE OLIVEIRA JUNIOR; ALLAN YUKIO HIGASHI; GUSTAVO MANOEL TEIXEIRA; LEANDRO SIMÕES AZEREDO GONÇALVES; MARIA ISABEL BALBI PENA; MARIA LUIZA ABREU DE JESUS; MIRELA MOSELA; ROSIANA BERTÊ; ULISSES DE PADUA PEREIRA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 30/06/2020, observadas as condições legais

Expedida em: 06/12/2022

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

RELATÓRIO DESCRITIVO

COMPOSIÇÃO BIOFUNGICIDA COMPREENDENDO *BACILLUS VELEZENSIS*

CAMPO DE INVENÇÃO

[001] A presente invenção trata-se de composição biofungicida, referente à linhagem bacteriana *Bacillus velezensis*, e de sua aplicação em organismos vegetais, tais como, mas não se limitando: plantas, sementes, frutos, e o solo circundante aos mesmos. Esta composição pode ser utilizada em benefício do crescimento vegetal e no tratamento de doenças fúngicas, bem como para redução de inóculos fúngicos patogênicos em ambientes de cultivo, podendo atuar sozinha ou em combinação com outros agentes químicos sintéticos, ou biológicos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] Pragas fúngicas presentes em plantas podem representar sérios riscos aos diferentes setores do agronegócio, levando a perdas econômicas, uma vez que atingem negativamente a saúde vegetal. Neste contexto, agentes químicos sintéticos são usualmente utilizados para controle de fitopatógenos fúngicos, como *Botrytis cinérea, Fusarium oxisporum, Rhizoctonia solani, Macrophomina phaseolina* e *Phakopsora pachyrizi*. Porém o uso destes agentes apresenta desvantagens, como alto custo de mercado, falta de eficácia, desenvolvimento de resistência ao composto químico pelas cepas fúngicas, além de impactos ambientais.

[003] Alguns microrganismos presentes no solo têm efeitos benéficos sobre o crescimento e a saúde das plantas. Localizados mais especificamente na rizosfera, estes vivem em associação com as plantas, ou residem como endófitos dentro destas: são as chamadas rhizobactérias (PGPR). Suas propriedades proveitosas ao crescimento vegetal incluem fixação de nitrogênio, quelação de ferro, solubilização de fosfato, inibição de microrganismos maléficos, resistência a pragas, resistências sistêmicas induzida (ISR) e adquirida (SAR), além de decomposição de material vegetal do solo e aumento da matéria orgânica disponível neste.

[004] Assim, estes microrganismos melhoram a qualidade do solo, auxiliam no crescimento da planta e aprimoram o rendimento e a qualidade das safras.

Ademais, muitos deles possuem atividade biológica no sentido da produção de compostos que podem ser utilizados como biopesticidas, sendo mais seguros e biodegradáveis em comparação aos fertilizantes e pesticidas químicos sintéticos. Deste modo, microrganismos podem ser aplicados como biofertilizantes e/ou biopesticidas para controlar microrganismos patogênicos, melhorando a sustentabilidade agrícola.

[005] Alguns microrganismos possuem efeitos benéficos sobre o crescimento e sobre a saúde de plantas. Estes microrganismos estão presentes no solo, vivendo em associação com plantas especificamente na rizosfera, ou residindo como endófitos dentro da planta e são conhecidos como rhizobactérias promotoras de crescimento de planta (PGPR). Suas propriedades benéficas de promoção de crescimento de plantas incluem fixação de nitrogênio, quelação de ferro, solubilização de fosfato, inibição de microrganismos não benéficos, resistência a pragas, resistência sistêmica induzida (ISR), resistência sistêmica adquirida (SAR) decomposição do material vegetal no solo para aumentar a matéria orgânica disponível do solo. Estes microorganismos benéficos podem melhorar a qualidade do solo, crescimento de planta, rendimento e qualidade de safras. Vários microrganismos exibem atividade biológica tal como a de ser útil para controlar doenças de plantas. Tais biopesticidas (organismos vivos e os compostos naturalmente produzidos por estes organismos) são mais seguros e mais biodegradáveis do que fertilizantes e pesticidas químicos sintéticos. Neste contexto, microorganismos podem ser aplicados como biofertilizantes e/ou biopesticidas para controlar microrganismos patogênicos, melhorando a sustentabilidade agrícola.

[006] Tendo isto em vista, algumas espécies do gênero bacteriano *Bacillus* já foram descritas e utilizadas para o biocontrole de doenças em plantas (Joseph W. Kloeper, et al. 2004, Phytopathology Vol 94, No 11, 1259-1266). Alguns exemplos de aplicações comerciais de tais espécies incluem: cepa de *Bacillus pummilus* QST2808, utilizada como ingrediente ativo em SONATA® e BALLAD®-PLUS, (BAYER CROP SCIENCE); cepa de *Bacillus subtilis* QST713, utilizada como ingrediente ativo de SERENADE™(BAYER CROP SCIENCE); cepa de *Bacillus subtilis* GB03, utilizada como ingrediente ativo em KODIAK® e HEEM3® (HELENA CHEMICAL Company); cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, utilizada como ingrediente ativo no produto RHIZOVITAL®42 (ABiTEP GmbH).

[007] Frente ao exposto, a presente invenção compreende composição bacteriana da linhagem *Bacillus velezensis* e os compostos naturalmente produzidos por esta, bem como métodos para a sua utilização para tratamento de patógenos fúngicos vegetais e aprimoramento da resistência da planta a estes, como também redução da infecção causada.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[008] A invenção apresenta-se na forma de uma composição de esporos oriundos de cultura biologicamente pura de *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22 (depositada como CMRP4490 e compostos produzidos por esta, ou por suas variações mutantes.

[009] Ademais, descreve-se um método de controle de patógenos fúngicos vegetais, que compreende as formas de aplicação aérea, foliar e de forragem da composição em plantas, que, em quantidade adequada, aprimora o rendimento vegetal e aumenta a resistência a patógenos fúngicos, também reduzindo infecções causadas pelos mesmos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[010] **Figura 1.** Ensaio de antagonismo direto com a linhagem *Bacillus velezensis* LABIM22 (depositada como CMRP4490), em confronto direto com fungos fitopatogênicos.

[011] **Figura 2.** Ensaio de antagonismo direto com a linhagem *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22 (depositada como CMRP4490) contra fungos fitopatogênicos. As barras representam porcentagem de inibição do crescimento micelial do fitopatógeno. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 4 repetições por experimento.

[012] **Figura 3.** Imagem da atividade dos sobrenadantes da linhagem *Bacillus velezensis,* LABIM22 (depositada como CMRP4490) produzidos em três diferentes meios de cultivo (LB, Lúria Bertani; LB+M, Lúria Bertani acrescido de micronutrientes; MF, meio formulado) frente a *Sclerotinia sclerotiorum*.

[013] **Figura 4.** Porcentagem de inibição dos fungos fitopatógenos pelo sobredanadante da linhagem *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22 (depositada como CMRP4490), produzidos em três diferentes meios de cultivo (LB – Lúria Bertani; LB+M – Lúria Bertania acrescido de micronutrientes; MF – Meio formulado).

[014] **Figura 5.** Imagenns do teste de estabilidade a diferentes faixas de temperatura, luz e pH dos metabólitos produzidos pela linhagem *Bacillus velezensis,* LABIM22 (depositada como CMRP4490) em meio formulado frente a *S. sclerotiorum*. Aspectos morfológicos das hifas.

[015] **Figura 6.** Porcentagem de inibição nos testes de estabilidade dos metabólitos produzidos pela linhagem *Bacillus velezensis* LABIM22 (depositada como CMRP4490). A – Estabilidade térmica, B – Estabilidade a diferentes comprimentos de ondas de luz, C- Estabilidade a variações de pH.

[016] **Figura 7.** Tratamento de sementes com a composição em pó molhável compreendendo *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22 (depositada como CMRP4490) contra *S. sclerotiorum*. As colunas representam a porcentagem de sementes germinadas em cada tratamento.

[017] **Figura 8.** Tratamento de sementes com a composição em pó molhável compreendendo *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22 (depositada como CMRP4490) contra *S. sclerotiorum*. As colunas representam a porcentagem de sementes sadias cada tratamento.

[018] **Figura 9.** Tratamento de sementes com a composição em pó molhável compreendendo *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22 (depositada como CMRP4490) contra *S. sclerotiorum*. Elementos da figura 9:

A) tratamento tempo 1 (momento do tratamento), é possível observar o fragmento da semente de soja.

B) tratamento tempo 1, é possível observar em maior aumento a presença de uma matriz orgânica com esporos da linhagem *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22 (CMRP4490) presente na superfície da semente de soja.

C) tratamento tempo 7 (7 dias após o tratamento), é possível observar o fragmento de semente de soja.

D) tratamento tempo 7, é possível observar em maior aumento a presença de uma matriz de biofilme rico em células vegetativas da linhagem *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22 (CMRP4490) colonizando toda a semente.

E) tratamento tempo 7, é possível observar o fragmento de raiz principal da semente de soja.

F) tratamento tempo 7, é possível observar a colonização da raiz principal da soja com a linhagem *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22 (depositada como CMRP4490).

[019] **Figura 10.** Principais clusters de metabólitos secundários preditos pelo programa antiSMASH no genoma de *Bacillus velezensis* linhagem, LABIM22 (depositada como CMRP4490). comparado com outras cepas de *Bacillus* spp. As áreas destacadas indicam as diferenças encontradas entre os clusters representados.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[020] A linhagem *Bacillus velezensis* LABIM22 está depositada na coleção Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense em 9 de outubro de 2019 e foi dado o número de acesso CMRP4490.

[021] Em uma primeira possibilidade, a composição está na forma de um líquido contendo *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22 (deposidada como CMRP4490) presente em uma concentração de cerca de 1,0 x 10^8 CFU/ml a cerca de 5,0 x 10^{13} CFU/ml.

[022] Em uma segunda possibilidade, a composição está na forma de um pó umectável seco, um grânulo espalhável, ou um grânulo umectável a seco contendo *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22, (depositada como CMRP4490) presente em uma concentração de cerca de 1,0 x 10^8 CFU/ml a cerca de 5,0 x 10^{13} CFU/ml.

[023] Em uma terceira possibilidade, a composição está na forma de uma dispersão de óleo contendo *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22, (depositada como CMRP4490) presente em uma concentração de cerca de 1,0 x 10^8 CFU/ml a cerca de 5,0 x 10^{13} CFU/ml.

[024] A composição também pode compreender uma combinação de um agente microbiano, fungicida, ou um inseticida, fungicida, nematicida, bactericida, herbicida, extrato vegetal, regulador de crescimento de plantas, ou fertilizante presente em uma quantidade adequada para beneficiar o crescimento de planta e/ou conferir proteção contra uma infecção patogênica na planta.

[025] Nos métodos para controlar patógenos fúngicos vegetais, o patógeno fúngico pode incluir, por exemplo: *Botrytis* spp. (ex. *Botrytis cinerea*), *Fusarium* spp., (ex. *Fusarium oxisporum*), *Phytophthora s*pp., (ex. *Phytophthora capsici*), *Rhizoctonia* spp., (*Rhizoctonia solani*), *Macrophomona phaseolina*, *Pythium* spp., (ex. *Pythium aphanidus*) *Glomerella cingulata*, *Sclerotinia* spp., (*Sclerotinia sclerotium*), *Phakopsora pachyrhizi* e *Cercospora sojina*.

[026] Nos métodos para controlar patógenos fúngicos de plantas, a planta pode ser uma ampla variedade de plantas incluindo, por exemplo: monocotiledôneas, dicotiledôneas, cereais, milho, milho doce, pipoca, milho de semente, milho de silagem, milho de campo, arroz, trigo, cevada, sorgo, aspargos, baga, legumes do tipo brassica, brócolis, repolho, couveflor, couve de Bruxelas, couve, legumes do tipo cucurbita, pepino, melão, abóbora, melancia, berinjela, bulbo legumes, cebola, alho, cítricos, laranja, grapefruit, limão, tangerina, legumes do tipo frutificado, pimenta, tomate, cereja rasteira, tomatillo, quiabo, uva, ervas / temperos, legumes, alface, aipo, espinafre, salsa, legumes / vegetais (feijão suculento e seco e ervilhas), tipos de feijão, soja, grão de bico, culturas de sementes oleaginosas, canola, mamona, coco, algodão, linho, palmeira, azeitona, amendoim, gergelim, girassol, maçã, pera, raiz / tubérculo e legumes amiláceos, cenoura, batata, batata doce, beterraba, gengibre, rabanete, ginseng, nabo, frutas de pedra, cereja, nectarina, pêssego, ameixa, morango, kiwi, banana, grama, grama relvada, plantas ornamentais, estacas de madeira, castanhas, café ou cana de açúcar.

[027] Em formas de realização, é fornecido um uso de uma semente de planta em que a semente é ainda tratada com a composição compreendendo *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22 (CMRP4490) e ainda contendo a presença, mas não se limitando, de um fungicida ou um inseticida químico sintético; fungicida, nematicida e ou bactericida biológico, herbicida sintético ou biológico, extrato vegetal, regulador de crescimento de plantas, ou fertilizante presente em uma quantidade adequada para beneficiar o crescimento de planta e/ou conferir proteção contra uma infecção patogênica na planta.

Formulações

[028] Tratamento de Sementes com *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22 (CMRP4490) reduz a doença e aumenta o rendimento em soja e no milho. Várias formulações foram produzidas para teste de tratamento de sementes

homogeneizando os ingredientes listados em forma de pó molhável (PM). Uma mistura simples dos ingredientes por homogeneização. Três formulações são mostradas abaixo (Formulações PM1, PM2 e PM3).

Formulação PM1:

Material de partida	**Função**	**Concentração (%p/p)**	**Concentração (g/Kg)**
Bacillus velezensis linhagem LABIM22 (CMRP4490)	Ingrediente ativo	20,00	100,00
Carbonato de cálcio	veículo	10,00	100,00
Caulin	veículo	10,00	100,00
Soja micronizada	veículo	60,00	700,00
Total		100,00	1000,00

Formulação PM2:

Material de partida	**Função**	**Concentração (%p/p)**	**Concentração (g/Kg)**
Bacillus velezensis linhagem LABIM22 (CMRP4490)	Ingrediente ativo	30,00	200,00
Carbonato de cálcio	veículo	10,00	100,00
Caulin	veículo	10,00	100,00
Soja micronizada	veículo	50,00	600,00
Total		100,00	1000,00

Formulação PM3:

Material de partida	**Função**	**Concentração (%p/p)**	**Concentração (g/Kg)**
Bacillus velezensis linhagem LABIM22 (CMRP4490)	Ingrediente ativo	40,00	300,00
Carbonato de cálcio	veículo	10,00	100,00
Caulin	veículo	10,00	100,00
Soja micronizada	veículo	40,00	500,00
Total		100,00	1000,00

[029] Prepararam-se também formulações de suspensão concentradas (SC). Três formulações são mostradas abaixo (Formulações SC1, SC2 e SC3).

[030] Um recipiente equipado com um agitador foi carregado com a quantidade calculada de água para fornecer 1 kg da formulação total. Os ingredientes resumidos abaixo foram misturados como descrito abaixo para preparar um concentrado de suspensão.

Formulação SC1

Material de partida	**Concentração (g/L)**
Bacillus velezensis linhagem LABIM22 (CMRP4490)	200,00
Xantana	0,20
Ácido cítrico	4,00
Agua	795,80
Total	1000,00

Formulação SC2

Material de partida	**Concentração (g/L)**
Bacillus velezensis linhagem LABIM22 (CMRP4490)	300,00
Xantana	0,15
Ácido cítrico	4,00
Agua	695,85
Total	1000,00

Formulação SC3

Material de partida	**Concentração (g/L)**
Bacillus velezensis linhagem LABIM22 (CMRP4490)	400,00
Xantana	0,10
Ácido cítrico	4,00
Agua	595,90
Total	1000,00

Resultados e discussão

[031] Na presente invenção, a composição e métodos são providos para beneficiar o crescimento de planta e conferir proteção e/ou controle frente a, infecções patogênicas fúngicas. A composição compreendendo esporos de uma cultura biologicamente pura de *Bacillus velezensis,* linhagem LABIM22 (depositada como CMRP4490), e os compostos naturalmente produzidos por esta bactéria, ou por um mutante da mesma, que possua todas as características de identificação molecular e compostos naturalmente produzidos. O método é a aplicação da composição na planta pelas vias: tratamento de semente, aplicação no solo, e aplicação aérea. A composição descrita pode, ainda, compreender uma combinação de um veículo, um dispersante, um adjuvante, um imobilizante polimérico, ou um extrato de planta ou levedura.

[032] Quando apontado, "uma cultura biologicamente pura de *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22 (depositada como CMRP4490)" refere-se a: esporos obtidos por uma cultura de fermentação líquida, biologicamente pura, da linhagem bacteriana descrita; células vegetativas de uma cultura pura da linhagem bacteriana; uma ou mais composições de uma cultura de fermentação líquida biologicamente pura da linhagem bacteriana; sólido obtido de uma cultura de fermentação líquida biologicamente pura da linhagem bacteriana; sobrenadante de cultura de fermentação biologicamente pura da linhagem bacteriana; extrato de uma cultura de fermentação biologicamente pura da linhagem bacteriana.

[033] Identificou-se que a administração da linhagem *Bacillus velezensis*, LABIM22 (depositada como CMRP4490) no tratamento de semente de soja, proporcionou grande benefício no controle do Mofo Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), melhorou a germinação das sementes e aumentou a biomassa vegetal. Ressalta-se que a utilização do mofo não exclui outros patógenos fúngicos, visto que a cepa demonstrou atividade antagonística forte e muito forte contra os 13 patógenos testados, devido à produção de uma ampla faixa de metabólitos secundários, que se correlaciona bem com a atividade antifúngica muito forte observada para esta cepa.

[034] A atividade benéfica de *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22 (depositada como CMRP4490) para controlar uma infecção patogênica fúngica vegetal, colonização rizosférica, e aumento da biomassa é exemplificada pelos estudos *in*

vitro, *in silico* e *in vivo* (ensaios de tratamento de semente de soja) descritos nos exemplos 1-5.

[035] **O Exemplo 1** foi sobre avaliação da atividade antagonística da linhagem *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22 (depositada como CMRP4490). Para o ensaio de antagonismo direto, a linhagem LABIM22 foi ativada em placa de Petri contendo meio Luria Bertani agar por 24h, a 28°C, e fez-se um segundo cultivo nas mesmas condições. Após esta etapa, a linhagem *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22 (depositada como CMRP4490) foi inoculada em meio Batata Dextrose agar nas bordas da placa de forma equidistante, em seguida um disco micelial de 6 mm de diâmetro dos fungos fitopatogênicos foi inoculado no centro de cada placa teste e incubado a 25°C com fotoperíodo de 12h. A porcentagem de inibição do crescimento foi avaliada após 3-5 dias usando o seguinte cálculo:

$$\text{ICM}\ (\%) = \left[\frac{dc-dt}{dc}\right] \times 100$$

[036] Neste, 'ICM' representa a porcentagem de inibição do crescimento micelial, 'dc' o diâmetro médio da colônia fúngica no controle e 'dt' o diâmetro médio da colônia fúngica em cada tratamento, todos medidos em mm (Yahyazadeh *et al*., 2008). A figura 1 e 2 apresentam os resultados dos ensaios de antagonismo direto *in vitro*, onde é possível observar que a linhagem LABIM22 apresentou forte e muito forte efeito antagônico contra os fitopatógenos testados, evidenciando o seu potencial como agente de biocontrole.

[037] **O Exemplo 2** foi sobre ensaios de fermentação líquida onde foram elaborados 3 meios de cultura diferentes para crescimento bacteriano da linhagem LABIM22, produção de biomassa e produção de compostos antifúngicos, e sobre a atividade antifúngica dos compostos produzidos pela linhagem LABIM22 mesma contra fungos fitopatogênicos. Meio 1) ($g.L^{-1}$ Triptona – 5.0 a 10.0, Extrato de Levedura – 1.0 a 5.0, Cloreto de Sódio – 1.0 a 5.0); Meio 2 ($mg.L^{-1}$ Triptona – 5.0 a 10.0, Extrato de Levedura – 1.0 a 5.0, Cloreto de Sódio – 1.0 a 5.0, KH_2PO_4 - 100 a 2000, $CuSO_4$ - 0.01 a 2.0, $FeSO_4$ - 0.01 a 2.00, $NaMoO_4$ - 0.01 a 2.00, $MnSO_4 \cdot H2O$ - 0.01 a 2.00, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ - 100 a 500; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0.01 a 2.00, H_3Bo_3 - 0.01 a 2.00); Meio 3) ($g.L^{-1}$: glucose de 5.0 a 20.00, triptona de 5.0 a 20.0, NaCl de 2.0 a 10.0, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ de 1.00 a 5.00, $MnSO_4 \cdot H_2O$ de 0.01 a 1.00, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ de 1.00 a 5.00, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ de 1.00 a 5.00, pH 7.00–7.20). Para o ensaio de

atividade antifúngica dos compostos produzidos pela linhagem *Bacillus velezensis* LABIM22 (depositada como CMRP4490), os fermentados foram centrifugados a 9000rpm, a 4°C por 15 minutos (min) e esterilizados em membrana de celulose com poros de 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA). Para montagem do ensaio, um disco micelial de 6mm de diâmetro dos fitopatógenos foi inoculado ao centro da placa contendo Batata Dextrase agar simetricamente, a uma distância de 25 mm do centro da placa. Quatro poços receberam 200µl do sobrenadante livre de células (SLC). Este procedimento de montagem do experimento foi feito individualmente para cada meio testado. A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi avaliada após 3-5 dias (dependendo da velocidade de crescimento micelial de cada fungo) seguindo a mesma fórmula apresentada para o ensaio de antagonismo direto. Na figura 3 constam imagens do experimento para *Slerotinia sclerotiorum*. A figura 4 representa os dados deste experimento. Nota-se que, para todos os patógenos confrontados, o meio 3 obteve melhores índices de controle do crescimento micelial em comparação com os meios 1 e 2, sendo este, portanto, um ótimo meio de cultura para produção de biomassa e compostos de metabolismo com atividade antifúngica pela linhagem *Bacillus velezensis* LABIM22 (depositada como CMRP4490).

[038] **O Exemplo 3** foi sobre ensaios com o SLC obtido após a fermentação em estado líquido da linhagem LABIM22 (depositada como CMRP4490) no meio 3. Os ensaios foram: estabilidade a variação de temperatura (70°C por 30 min, 100°C por 30 min e 121°C por 15 min a 1 atm de pressão); estabilidade a variação de pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 por 24 h) depois todos ajustados para o pH 7, e estabilidade a luz (branca, luz UV 365 nm e UV 254 nm). Para todos os testes foram aplicados 200µl de SLC em cada poço e o fungo avaliado conforme a fórmula apresentada para o ensaio de antagonismo direto. As figuras 5 e 6 mostram os resultados das análises de estabilidade, revelando que os metabólitos produzidos pela cepa antagonista são altamente estáveis às variáveis testadas de luz, temperatura e pH.

[039] **O Exemplo 4** foi sobre ensaios com tratamento de sementes de soja infectadas, através do contato direto com micélios de *Sclerotinia sclerotiorum* por 24 horas. O tratamento de semente foi realizado com as formulações descritas abaixo. Neste exemplo, descreve-se os resultados das análises com as diferentes formulações. As formulações foram aplicadas em 600 sementes de soja infectadas com *Sclerotinia sclerotiorum*. Como controle positivo utilizou-se o fungicida Certeza

N da empresa IHARA®, que tem como princípio ativo o fluazinam e tiofanato metílico, sendo um produto comercial para tratamento de sementes de soja contra *Sclerotinia sclerotiorum*. As figuras 7 e 8 apresentam os resultados deste experimento, sendo possível observar que a linhagem LABIM22 foi tão eficiente quanto o produto químico sintético comercial utilizado como testemunha, indicando sua eficiência no tratamento de sementes infectadas além de apresentar alta taxa de germinação. A porcentagem de sementes sadia no controle com *S. sclerotiorum,* sem a presença de qualquer tratamento foi de 2,5%, enquanto as que receberam a maior dose de LABIM22 tiveram porcentagem de com 94%, não havendo diferença significativa quando comparado aos produtos químicos sintéticos utilizados, como demonstrado na figura 8.

[040] **O Exemplo 5** descreve ensaios com tratamento de sementes de soja infectadas, através do contato direto com micélios de *Sclerotinia sclerotiorum* por 24 horas e tratadas com as formulações contendo a linhagem *Bacillus velezensis,* linhagem LABIM22 (depositada como CMRP4490) e os compostos produzidos durante a fermentação, em 600 sementes de soja infectadas com *Sclerotinia sclerotiorum.* Após 7 dias, o material foi preparado para avaliação da colonização da semente de soja e da radícula. A avaliação foi realizada por microscopia eletrônica de varredura nos tempos 0h e 7 dias. A figura 9 demostra os resultados de colonização das sementes e da radícula.

[041] **O Exemplo 6** descreve análise *in silico* para identificar os clusters de biossíntese dos metabólitos secundários antimicrobianos presentes no genoma da linhagem LABIM22, demonstrado na figura 10. Os dados foram obtidos usando a plataforma de web-server antiSMASH para detectar e identificar hipoteticamente os clusters biossintéticos responsáveis pela produção de compostos de metabolismo secundários bioativos. Foram identificados clusters para produção de lipopeptídeos não ribossomicamente sintetizados, supostamente uma surfactina e uma fengicina. O AntiSMASH também identificou cluster do tipo bacilisina. As surfactinas demonstraram tanto atividade antimicrobiana como a colonização de bactérias produtoras. Mostrou-se que as fengicinas têm efeitos antagônicos contra fungos e ajudam a preparar as respostas ISR e SA em várias plantas, tais como feijão e tomate. A bacilisina demonstrou ter atividades antifúngicas e antibacterianas.

REIVINDICAÇÕES

1. **COMPOSIÇÃO BIOFUNGICIDA COMPREENDENDO *BACILLUS VELEZENSIS,*** caracterizada por apresentar-se sob forma líquida compreendendo uma cultura pura de *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22 (CMRP4490) em uma concentração de cerca de 1,0 x 10^8 CFU/ml a cerca de 5,0 x 10^{13} CFU/ml; porcentagem em peso: 0,5 - 50% de uma cultura biologicamente pura a partir de 1 x 10^8 CFU/g; de 0,01- 10% de Xantana; de 0,01 - 10% de Carboximetilcelulose; de 0,01 - 60% de Glicerina; de 0,01 - 40% de Soja micronizada ou qualquer mistura dos mesmos e ainda outros ingredientes tais como: um veículo líquido; um agente tensoativo; um adjuvante, biocidas, bioestáticos, macronutrientes, micronutrientes, corantes, dispersantes, antiespumantes, conservantes, modificadores de viscosidade, espessantes, inibidores de cristalização, antioxidantes, antiespumantes, auxiliadores de mistura, tampões, inibidores de corrosão e/ou plastificantes; Biocidas, bioestáticos, macronutrientes, micronutrientes, corantes, dispersantes, conservantes, antioxidantes, antiespumantes, auxiliadores de mistura, tampões e inibidores de corrosão;

2. **COMPOSIÇÃO BIOFUNGICIDA COMPREENDENDO *BACILLUS VELEZENSIS,*** de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por apresentar-se sob a forma de um pó, pó molhável, grânulo espalhável, grânulo molhável, ou imobilizada em micro ou nanopartículas poliméricas molháveis compreendendo uma cultura pura de *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22 (CMRP4490) em uma concentração de 1,0 x 10^8 CFU/ml a 5,0 x 10^{13} CFU/ml;

3. **COMPOSIÇÃO BIOFUNGICIDA COMPREENDENDO *BACILLUS VELEZENSIS,*** de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizada por compreender porcentagem em peso: 0,5 - 40% de uma cultura biologicamente

pura a partir de 1 x 10^8 CFU/g de *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22 (CMRP4490); podendo conter de 0,01- 30% de Carbonato de cálcio de 0,01 - 30% de Caulim; de 0,01 - 60% Soja micronizada, ou qualquer mistura dos mesmos e ainda outros ingredientes tais como: biocidas, bioestáticos, macronutrientes, micronutrientes, corantes, dispersantes, conservantes, antioxidantes, antiespumantes, auxiliadores de mistura, tampões e inibidores de corrosão;

4. **COMPOSIÇÃO BIOFUNGICIDA COMPREENDENDO *BACILLUS VELEZENSIS,*** de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizada por compreender na composição *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22 (CMRP4490) presente na forma de esporos e ou células vegetativas;

5. **COMPOSIÇÃO BIOFUNGICIDA COMPREENDENDO *BACILLUS VELEZENSIS,*** de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizada por compreender compostos produzidos durante o processo de fermentação líquida de *Bacillus velezensis* linhagem LABIM22 (CMRP4490);

DESENHOS

Figura 1.

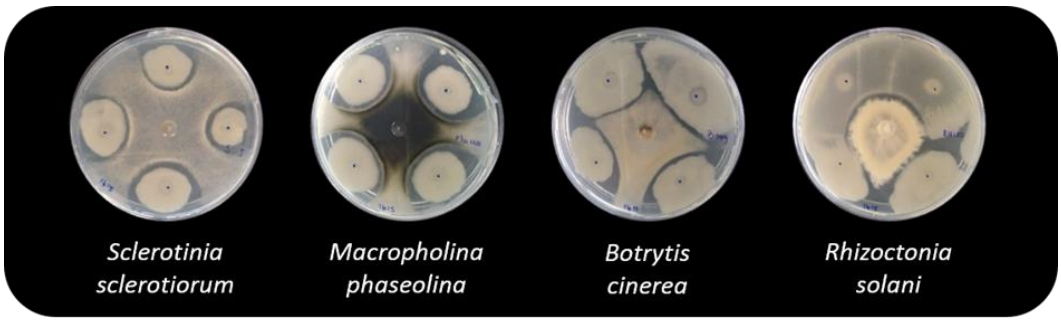


Figura 2.

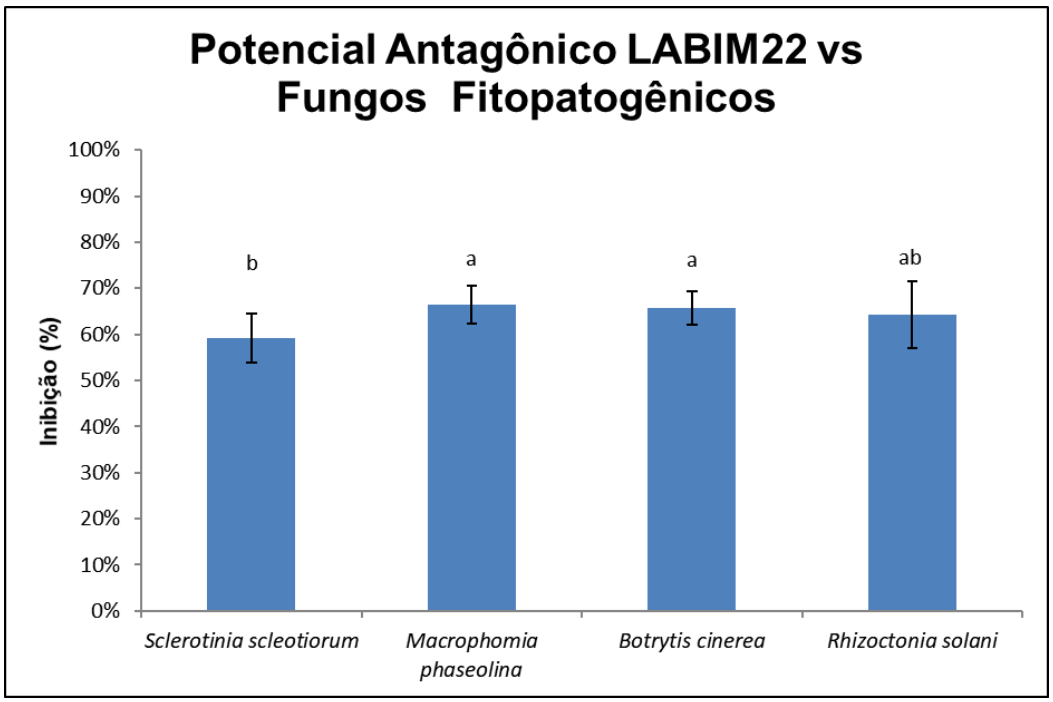


Figura 3.

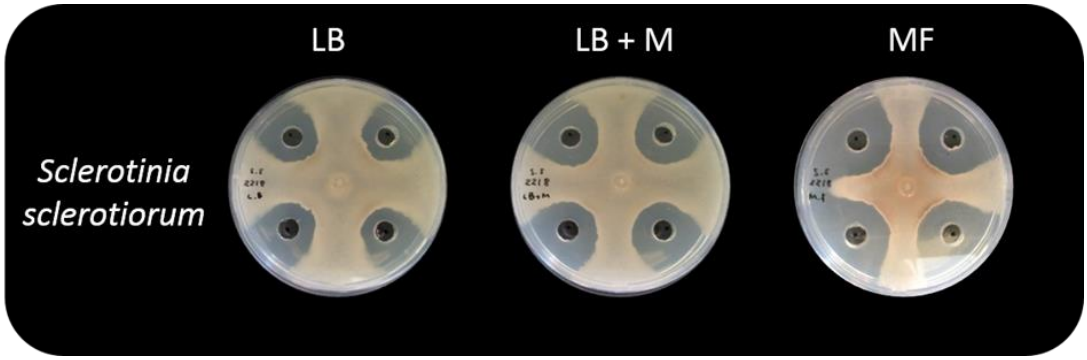


Figura 4.

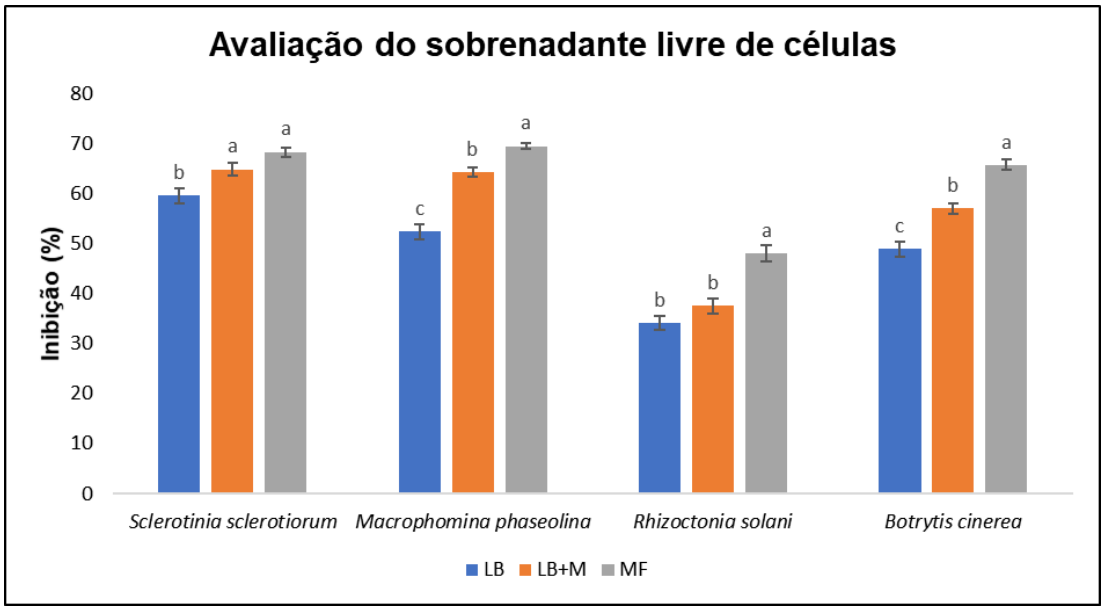


Figura 5.

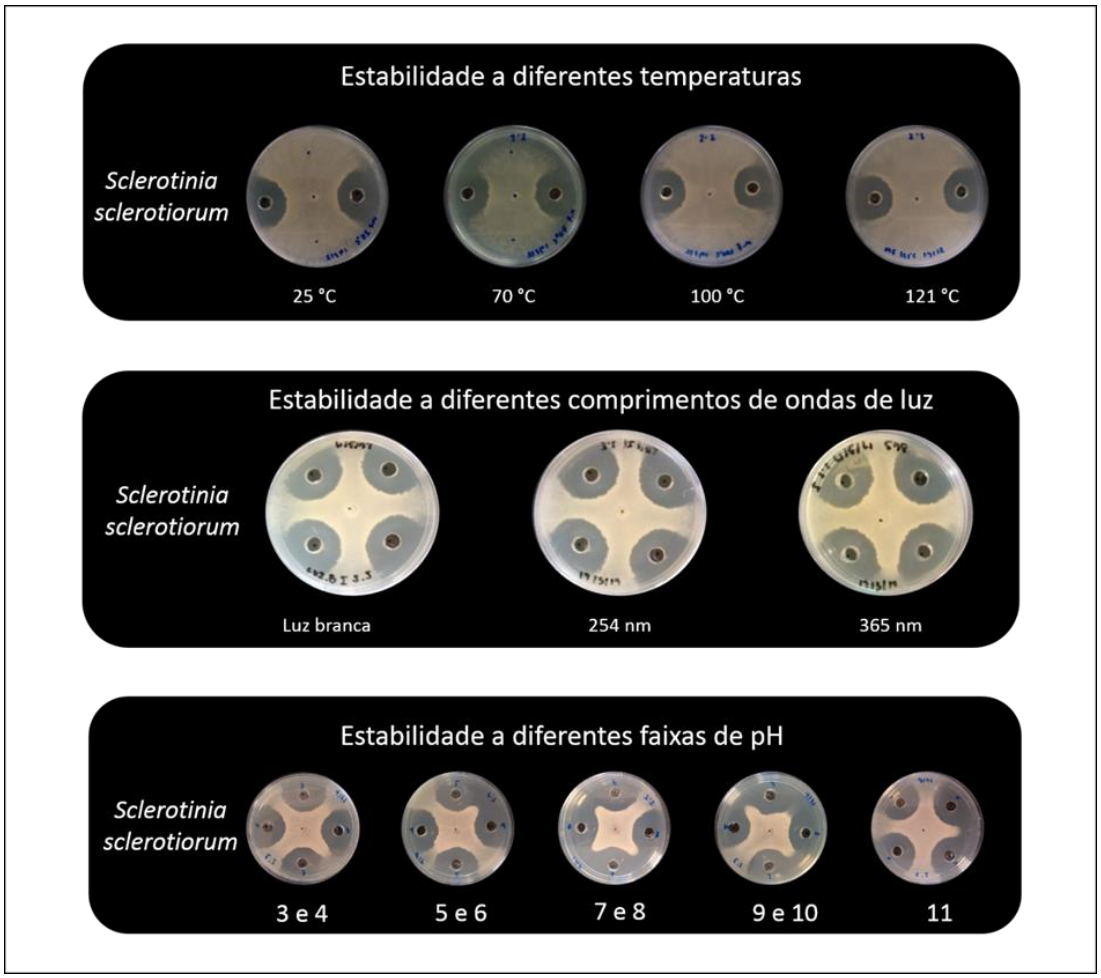


Figura 6.

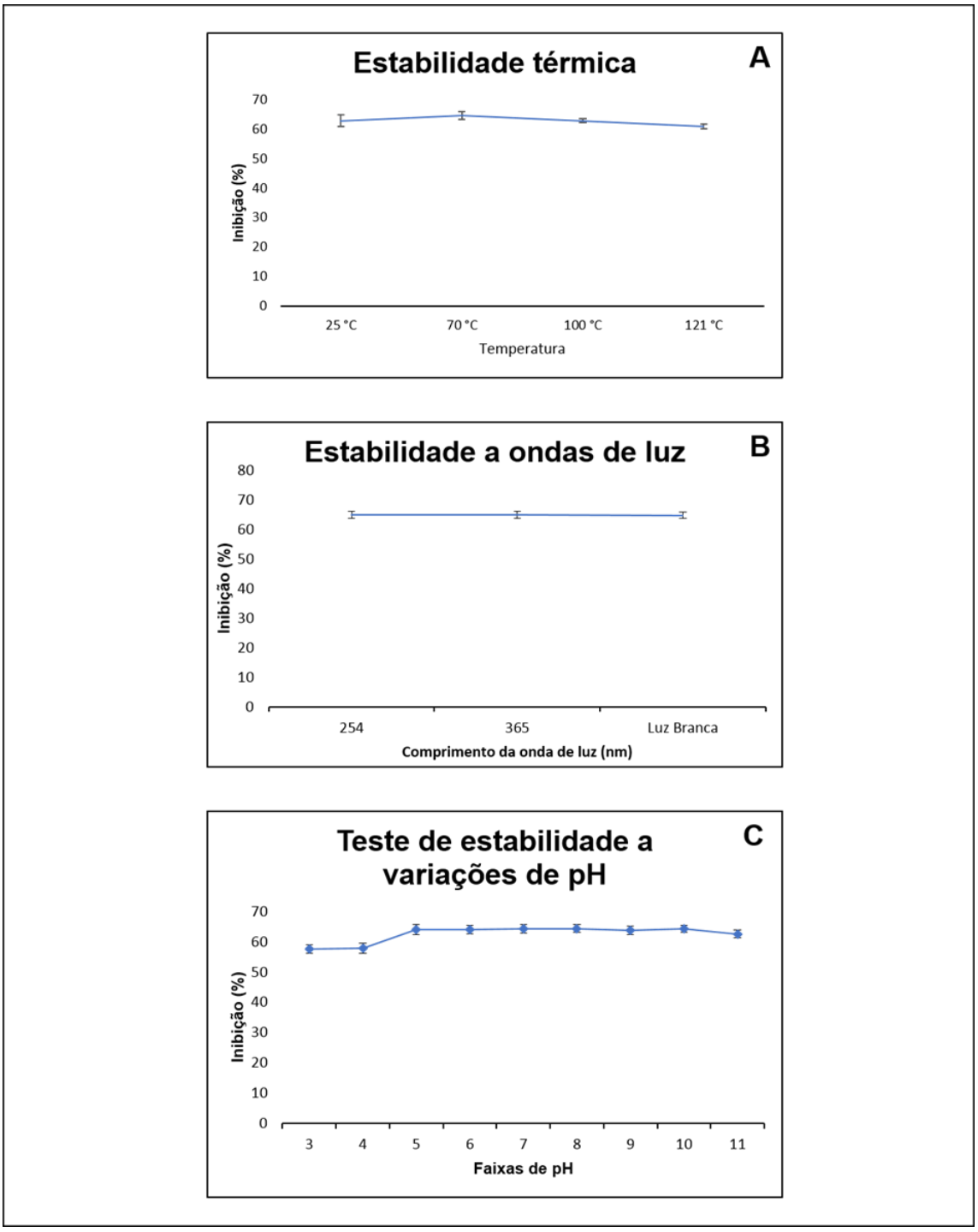

Estabilidade térmica
A
Inibição (%)
70
60
50
40
30
20
10
0
25 °C
70 °C
100 °C
121 °C
Temperatura
Estabilidade a ondas de luz
B
Inibição (%)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
254
365
Luz Branca
Comprimento da onda de luz (nm)
Teste de estabilidade a variações de pH
C
Inibição (%)
70
60
50
40
30
20
10
0
3
4
5
6
7
8
9
10
11
Faixas de pH

Figura 7.

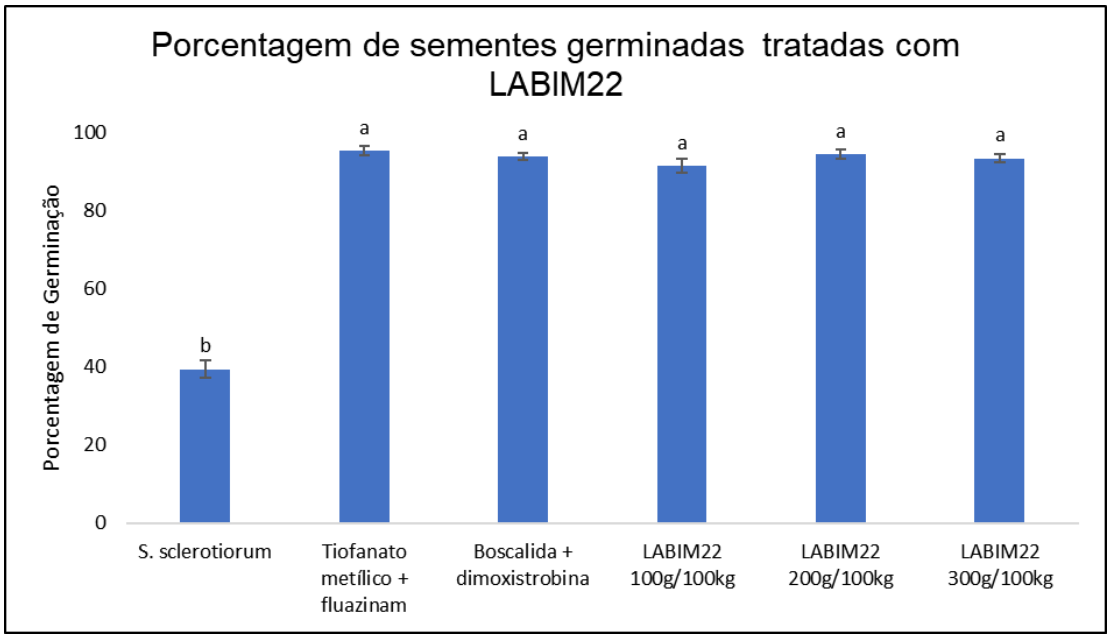


Figura 8.

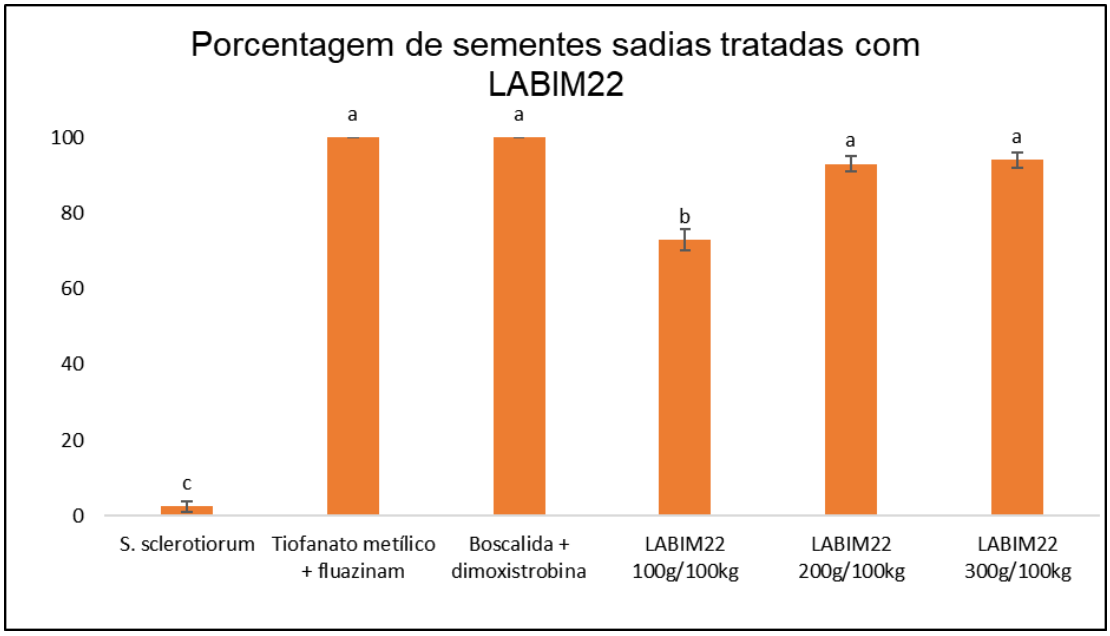


Figura 9.

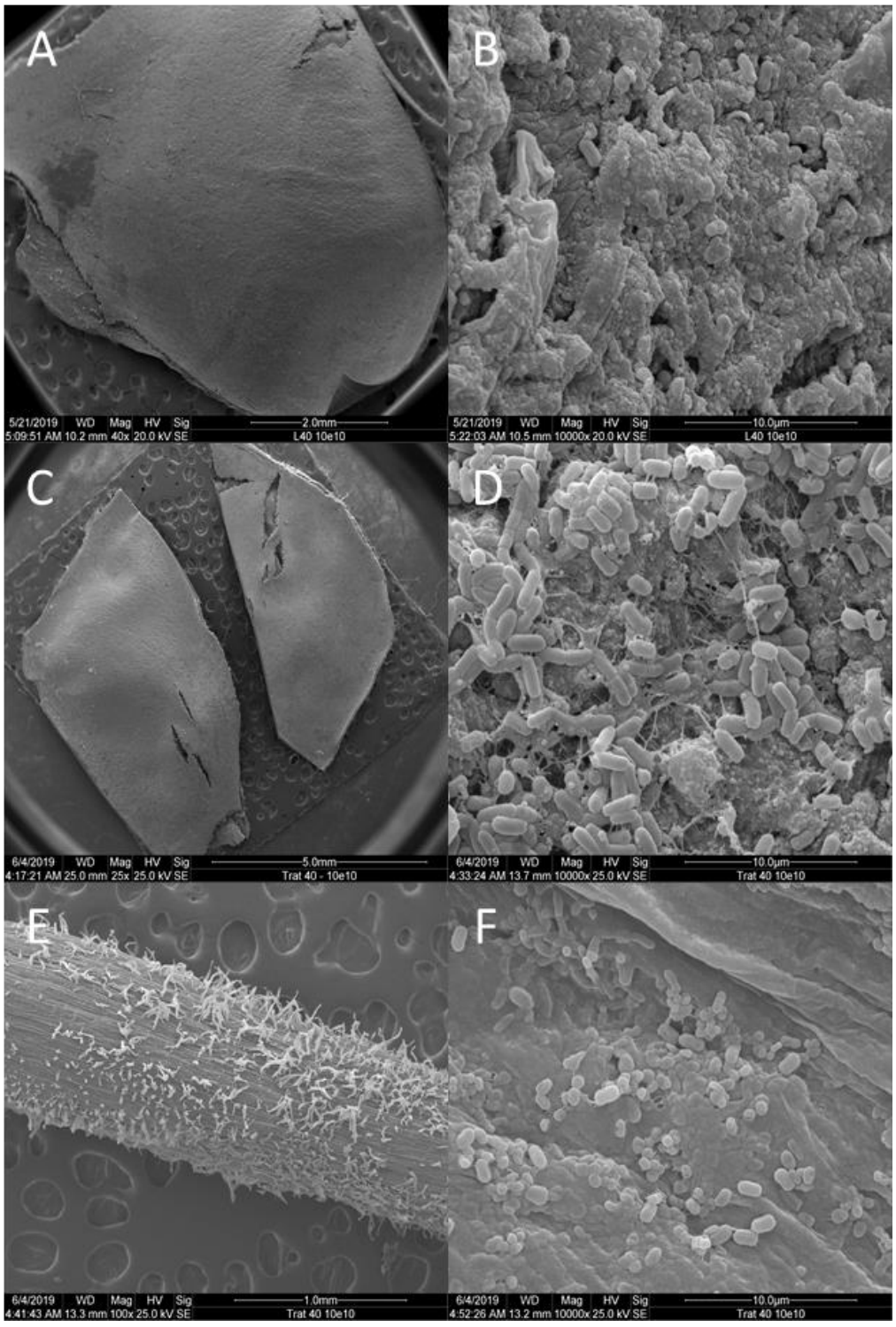
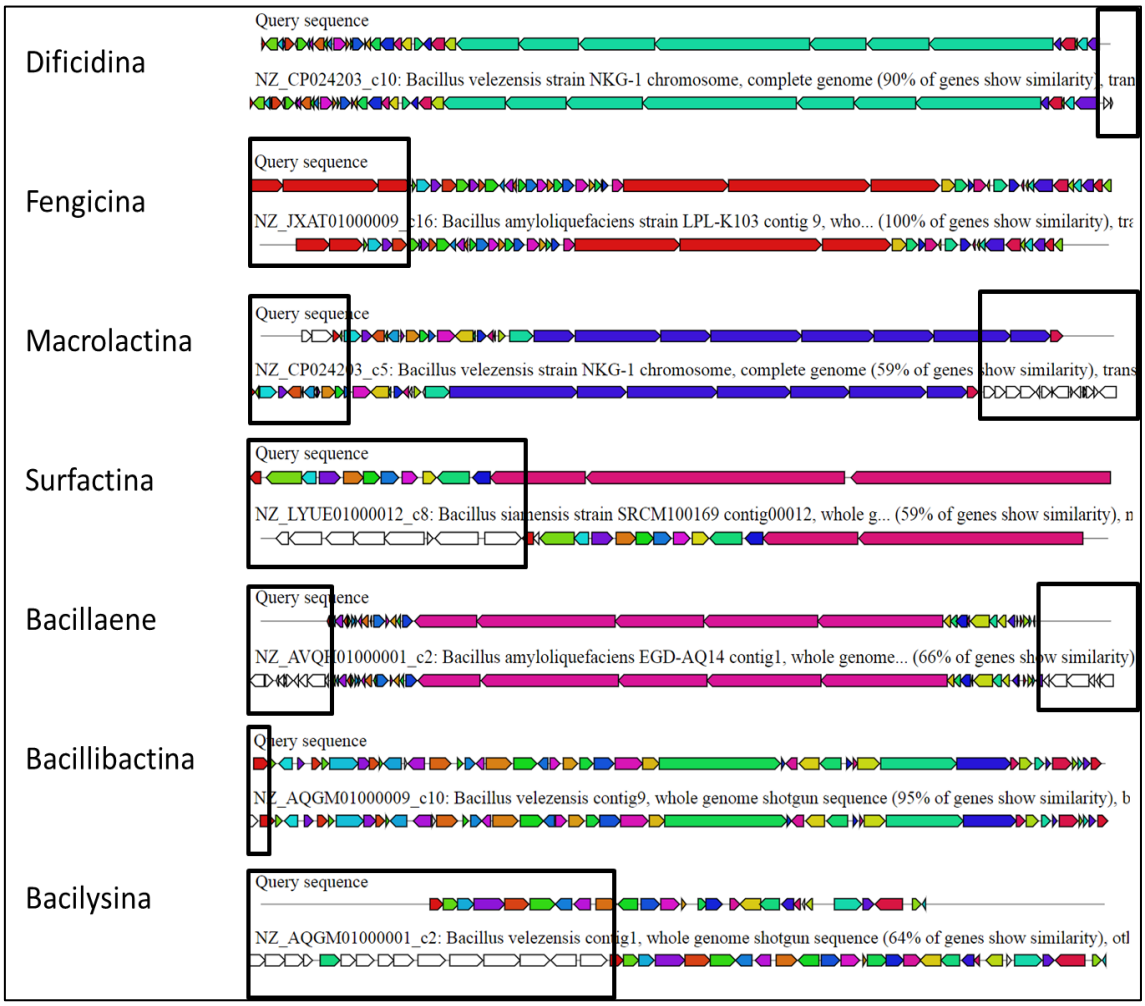

A
5/21/2019 WD Mag HV Sig 2.0mm
5:09:51 AM 10.2 mm 40x 20.0 kV SE L40 10e10
B
5/21/2019 WD Mag HV Sig 10.0µm
5:22:03 AM 10.5 mm 10000x 20.0 kV SE L40 10e10
C
6/4/2019 WD Mag HV Sig 5.0mm
4:17:21 AM 25.0 mm 25x 25.0 kV SE Trat 40 - 10e10
D
6/4/2019 WD Mag HV Sig 10.0µm
4:33:24 AM 13.7 mm 10000x 25.0 kV SE Trat 40 10e10
E
6/4/2019 WD Mag HV Sig 1.0mm
4:41:43 AM 13.3 mm 100x 25.0 kV SE Trat 40 10e10
F
6/4/2019 WD Mag HV Sig 10.0µm
4:52:26 AM 13.2 mm 10000x 25.0 kV SE Trat 40 10e10

Figura 10.


Dificidina
Query sequence
NZ_CP024203_c10: Bacillus velezensis strain NKG-1 chromosome, complete genome (90% of genes show similarity), tran
Fengicina
Query sequence
NZ_JXAT01000009_c16: Bacillus amyloliquefaciens strain LPL-K103 contig 9, who... (100% of genes show similarity), tra
Macrolactina
Query sequence
NZ_CP024203_c5: Bacillus velezensis strain NKG-1 chromosome, complete genome (59% of genes show similarity), trans
Surfactina
Query sequence
NZ_LYUE01000012_c8: Bacillus siamensis strain SRCM100169 contig00012, whole g... (59% of genes show similarity), n
Bacillaene
Query sequence
NZ_AVQB01000001_c2: Bacillus amyloliquefaciens EGD-AQ14 contig1, whole genome... (66% of genes show similarity)
Bacillibactina
Query sequence
NZ_AQGM01000009_c10: Bacillus velezensis contig9, whole genome shotgun sequence (95% of genes show similarity), b
Bacilysina
Query sequence
NZ_AQGM01000001_c2: Bacillus velezensis contig1, whole genome shotgun sequence (64% of genes show similarity), otl