

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 503 619**

51 Int. Cl.:

C02F 3/34 (2006.01)

C11D 3/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2008** **E 12172287 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014** **EP 2500325**

54 Título: **Prevención y reducción de la formación de biopelícula y proliferación planctónica**

30 Prioridad:

23.03.2007 US 896693 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

07.10.2014

73 Titular/es:

**NOVOZYMES BIOLOGICALS, INC. (100.0%)
5600 Corporate Circle
Salem, VA 24156, US**

72 Inventor/es:

**MCHATTON, SARAH;
WILLIAMS, IRENE MICHELLE y
DRAHOS, DAVID**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 503 619 T3

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

DESCRIPCIÓN

Prevención y reducción de la formación de biopelícula y proliferación planctónica

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención proporciona métodos y composiciones para evitar y/o reducir la formación de biopelícula en superficies y/o proliferación planctónica en ambientes acuosos, especialmente en entornos industriales y domésticos/caseros.

10

Antecedentes de las invenciones

15 [0002] La formación de biopelícula y la proliferación planctónica por microorganismos son fenómenos no deseados conocidos en entornos domésticos al igual que industriales. Por ejemplo, los inodoros albergan bacterias indeseables en superficies y en la solución que pueden contribuir a una apariencia evidentemente sucia de la taza. Además, la presencia de microorganismos no deseados en la taza pueden causar dispersión de aerosoles en la descarga. La formación de biopelícula masiva y la proliferación planctónica en los sistemas de agua, por ejemplo, tuberías, bombas y vasos, es conocida por causar riesgos del cuidado de salud, corrosión, y problemas estéticos.

20 [0003] La prevención o reducción de la formación de biopelícula y/o proliferación planctónica por microorganismos indeseables requiere generalmente el uso de dispersantes, tensioactivos, enzimas, microbios, agentes antimicrobianos, biocidas, procedimientos de ebullición, y/o productos químicos.

25 [0004] Patente EE. UU. n.º. 5,171,591 concierne el control o eliminación de bacterias no deseadas en o sobre alimentos determinados o en superficies en contacto con comida usando bacterias parasitarias del género *Bdellovibrio*.

[0005] Patente EE. UU. n.º. 5,242,593 concierne un método para reducir la acumulación de lodo y/o película en los sistemas de circulación de agua añadiendo microbios sin sésil en forma única al agua circulante.

30 [0006] Patente EE. UU. n.º. 5,360,517 divulga un proceso de regulación del crecimiento de la flora microbiana/bacteriana existente en una corriente acuosa de un circuito/proceso de fabricación de papel que comprende introducir una cantidad eficaz de desinfectante de bacterias de la especie *Staphylococcus carnosus*.

35 [0007] Patente EE. UU. n.º. 5,863,882 concierne formulaciones de limpieza y desinfección líquida que comprenden una composición de desinfección, esporas de *Bacillus* viables, y tensioactivos capaces de reducir cuatro microorganismos patógenos.

40 [0008] Patente Australiana n.º. 719544 concierne un método de control del número de bacterias patógenas en un cuerpo de agua añadiendo bacterias gram positivas no patógenas.

[0009] WO 2006/031554 revela un método de prevención, eliminación, reducción o alteración de biopelículas en superficies mediante la puesta en contacto de dicha superficie con una alfa-amilasa derivada de una bacteria.

45 [0010] Aunque métodos de reducción y prevención de la formación de biopelícula y proliferación planctónica de microorganismos no deseados se conocen en la técnica, sigue habiendo una necesidad de métodos y composiciones para hacer esto.

Breve descripción del dibujo

50 [0011]

Fig. 1 muestra una proliferación planctónica reducida de población de *Pseudomonas* en presencia de mezcla de *Bacillus* (6BB) en proporciones de *Bacillus:Pseudomonas* diferentes.

55 Fig. 2 muestra poblaciones de biopelícula de *Pseudomonas* reducidas en presencia de mezcla de *Bacillus* (6BB) a diferente proporciones de *Bacillus : Pseudomonas*.

Fig. 3 muestra una proliferación planctónica reducida de *Pseudomonas* en presencia de mezcla de *Bacillus* (6BB) en diferentes proporciones de *Bacillus:Pseudomonas*.

Descripción de la invención

60

[0012] La presente invención se refiere a métodos para la reducción o prevención de la proliferación en ambientes acuosos.

5 [0013] Los inventores han aislado y evaluado un número significativo de cepas de bacterias por su capacidad para reducir o prevenir la proliferación de biopelícula en ambientes acuosos. Ellos han encontrado que un número pequeño de las cepas evaluadas del género *Bacillus* puede reducir o prevenir la proliferación cuando se co-cultiva con microorganismos indeseables incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas montelli*, *Pseudomonas putida*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio fischerii*, y/o *Escherichia coli*. Esto está descrito en detalle en los ejemplos.

Métodos para evitar y/o reducir la proliferación en la solución acuosa

10 [0014] La invención también se refiere a métodos para evitar o reducir la proliferación de microorganismo(s) en solución acuosa que comprende someter a dicho(s) microorganismo(s) en solución acuosa a una o más cepas de bacterias seleccionadas del grupo que consiste en:

- 15 la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50017;
- la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7541;
- la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7542;
- la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7543;
- la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7544;
- la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7545;
- 20 la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7546;
- la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7549;
- la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7791;
- la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7792;
- 25 la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7793 o una mezcla de dos o más de las cepas.

[0015] En una forma de realización la invención se refiere a métodos para evitar o reducir la proliferación planctónica de microorganismo(s), que comprende la sujeción de dicho(s) microorganismo(s) en solución acuosa a la cepa que tiene el número de acceso de depósito NRRL B-50017.

30 [0016] En una forma de realización la invención se refiere a métodos para evitar o reducir la proliferación de microorganismo(s) en solución acuosa, que comprende someter dicho(s) microorganismo(s) en solución acuosa a la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7541. En una forma de realización la invención se refiere a métodos para evitar o reducir la proliferación de microorganismo(s) en solución acuosa, que comprende someter dicho(s) microorganismo(s) en solución acuosa a la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7542. En una forma de realización la invención se refiere a métodos para evitar o reducir la proliferación de microorganismo(s) en solución acuosa, que comprende someter dicho(s) microorganismo(s) en solución acuosa a la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7543. En una forma de realización la invención se refiere a métodos para evitar o reducir el plancton de microorganismo(s) en solución acuosa, que comprenden someter dicho(s) microorganismo(s) en solución acuosa a la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7544. En una forma de realización la invención se refiere a métodos para evitar o reducir la proliferación de microorganismo(s) en solución acuosa, que comprende someter dicho(s) microorganismo(s) en solución acuosa a la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7545. En una forma de realización la invención se refiere a métodos para evitar o reducir la proliferación de microorganismo(s) en solución acuosa, que comprende someter dicho(s) microorganismo(s) en solución acuosa a la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7546. En una forma de realización la invención se refiere a métodos para evitar o reducir la proliferación de microorganismo(s) en solución acuosa, que comprende someter dicho(s) microorganismo(s) en solución acuosa, que comprende someter dicho(s) microorganismo(s) en solución acuosa a la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7549. En una forma de realización la invención se refiere a métodos para evitar o reducir la proliferación de microorganismo(s) en solución acuosa, que comprende someter dicho(s) microorganismo(s) en solución acuosa a la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7550. En una forma de realización la invención se refiere a métodos para evitar o reducir la proliferación de microorganismo(s) en solución acuosa, que comprende someter dicho(s) microorganismo(s) en solución acuosa a la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7789. En una forma de realización la invención se refiere a métodos para evitar o reducir la proliferación de microorganismo(s) en solución acuosa, que comprende someter dicho(s) microorganismo(s) en solución acuosa a la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7791. En una forma de realización la invención se refiere a métodos para evitar o reducir la proliferación de microorganismo(s) en solución acuosa, que comprende someter dicho(s) microorganismo(s) en solución acuosa a la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7792. En una forma de realización la invención se refiere a métodos para evitar o reducir la proliferación de microorganismo(s) en solución acuosa, que comprende someter dicho(s) microorganismo(s) en solución acuosa a la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7793.

60 [0017] En una forma de realización una mezcla de bacterias se puede utilizar según el método de la invención. Ejemplos de mezclas se pueden encontrar debajo en la sección "Cepas de Bacterias y Mezclas de cepas de Bacterias".

[0018] El término "proliferación" significa el crecimiento de microorganismos no deseados, preferiblemente bacterias no deseadas en un ambiente acuoso, tal como un cuerpo de agua. Los microorganismos no deseados se dan típicamente de forma libre en ambientes acuosos. Ejemplos de ambientes acuosos considerados son agua de enjuagar en tazas de váter y agua de refrigeración hecho circular en plantas.

5

Cepas de bacterias y mezcla de cepas de bacterias

[0019] Debe entenderse que una cepa de bacterias usada en acuerdo con métodos de la invención puede ser un cultivo de una de las cepas depositadas anteriormente mencionadas. En una forma de realización preferida la cepa es una de las cepas depositadas o una descendiente de la misma.

10

[0020] La(s) cepa(s) de bacterias puede(n) ser un(unos) ingrediente(s) activo(s) en composiciones que también comprenden otros ingredientes activos y/o inactivos.

15

[0021] Los términos, "cantidad eficaz", "dosis eficaz" o "concentración eficaz" se definen aquí como la cantidad, concentración o dosis de una o más cepas de bacterias que pueden reducir y/o prevenir la formación de biopelícula provocada por microorganismos no deseados en una superficie y/o reducir y/o prevenir la proliferación planctónica de microorganismos no deseados en un entorno acuoso. La dosis eficaz real en números absolutos depende de factores que incluyen: el(los) microorganismo(s) no deseado(s) en cuestión; si el objetivo es la prevención o la reducción; el tiempo de contacto entre la(s) cepa(s) o composición que comprende dicha(s) cepa(s); otros ingredientes presentes, y también la superficie o entorno acuoso en cuestión. En una forma de realización una dosificación eficaz de bacterias, por ejemplo, de las seis mezclas de cepas de Bacillus mencionadas a continuación, estaría en el rango de 1 a 1×10^8 ufc/mL, preferiblemente 50 a 1×10^7 ufc/mL. Además, en una forma de realización la proporción entre la cepa de bacterias o mezclas concernidas aquí y el(los) microorganismo(s) no deseado(s) en cuestión puede(n) estar entre 1:100 000 y 100 000:1 (cepa/mezcla:microorganismo no deseado), preferiblemente 1:10 000 a 10 000:1, más preferiblemente 1:1000 a 1000:1, más preferiblemente 1:100 a 100:1, incluso más preferiblemente 1:10 a 10:1.

20

25

[0022] En general, ambientes que reciben altas cargas de microorganismos indeseables y nutrientes requieren altas dosis de cepas de bacterias de mitigación, mientras que ambientes con bajas cargas de organismos indeseables requieren dosis inferiores de cepas de bacterias de mitigación. Además, por ejemplo, la prevención de formación de biopelícula en superficies o prevención de la formación planctónica en ambientes acuosos, en general, requiere dosis inferiores de la(s) cepa(s) de bacterias concernida(s) que la reducción de la formación de biopelícula en las superficies correspondientes o reducir el número de de microorganismo(s) no deseado(s) ya existentes en ambientes acuosos correspondientes.

30

35

[0023] Consecuentemente, un método de la invención se puede usar para inhibir el crecimiento (es decir, conduciendo a la reducción de la formación de biopelícula) de uno o más microorganismos no deseados, preferiblemente bacterias ya presentes en una superficie o ya presentes en un entorno acuoso. En otra forma de realización la invención se refiere a prevenir y/o retardar significativamente la formación de biopelícula en una superficie esencialmente limpia (es decir, superficie sin esencialmente microorganismos no deseados) y/o proliferación planctónica en el agua esencialmente limpia (es decir, entorno acuoso que no contiene esencialmente ningún microorganismo no deseado). En otras palabras, la(s) cepa(s) de bacterias concernida(s) protege(n) la superficie y/o entorno acuoso contra el crecimiento futuro de uno o más microorganismos no deseados. Un método de la invención puede tener como resultado la reducción o incluso eliminación/limpieza de microorganismos no deseados ya existentes. La(s) cepa(s) de bacterias concernida(s) puede(n) en una forma de realización preferida ser aplicadas a la superficie en cuestión y/o añadidas al entorno acuoso en cuestión periódicamente. Periódicamente significa que el método de la invención se puede reiterar o repetir durante un periodo de tiempo, por ejemplo, cada minuto, hora, día, semana, mes, etc. como se ha mencionado anteriormente, el efecto puede no durar durante un periodo de tiempo largo. Puede requerir redosificación de cepas de bacterias. Por ejemplo, cuando la superficie y entorno acuoso está en el interior de la taza del inodoro y el agua de aclarado en la taza del inodoro, respectivamente, la redosificación puede ocurrir (periódicamente), por ejemplo, con cada descarga. La(s) cepa(s) de bacterias concernidas puede(n), por ejemplo, ser incorporada(s) en un block.

40

45

50

[0024] Un método de la invención también se puede realizar sometiendo manualmente y/o mecánicamente (es decir, aplicando o poniendo en contacto) la(s) cepa(s) de bacterias o composición que comprende una o más cepas de bacterias (es decir; mezclas) a la superficie en cuestión.

55

[0025] En una forma de realización preferida la bacteria, que se puede utilizar sola o en combinación con otras bacterias, es NRRL B-50017.

60

[0026] En una forma de realización preferida las cepas de bacterias es una mezcla de dos, tres, cuatro, cinco o seis de las siguientes cepas depositadas el 14 de marzo 2007: NRRL B-50014, NRRL B-50015, NRRL B-50016, NRRL B-50017, NRRL B-50018, and NRRL B-50019.

[0027] En otra forma de realización preferida las cepas de bacterias con una mezcla de dos, tres, cuatro o cinco de las siguientes cepas, depositadas el 14 de marzo 2007: NRRL B-50014, NRRL B-50015, NRRL B-50016, NRRL B-50017 y NRRL B-50018. Se debe entender que una mezcla de la invención puede o puede no comprender otras cepas además de las depositadas en relación con la presente invención. Debe entenderse que una mezcla de la invención puede además de unas cepas depositadas en relación con la invención, también comprender otras cepas. Un ejemplo es *Bacillus megaterium* SB-3112 (Número de depósito de ATCC PTA-3142) descrito en US 2005/0036990. En una forma de realización las mezclas comprenden NRRL B- 50014, NRRL B-50015, NRRL B-50016, NRRL B-50017, NRRL B-50018 y PTA-3142.

10 Microorganismos no deseados

[0028] En el contexto de la invención el término "microorganismos no deseados" significa microorganismos que pueden suponer un efecto que se considera negativo en la superficie en cuestión y/o en el entorno acuoso en cuestión, especialmente en entornos industriales o domésticos. Ejemplos de tales efectos negativos incluyen olor, corrosión, picadura, u otra degradación de material; infección; coloración o de otra manera hacer que una superficie aparezca estéticamente desagradable. Microorganismos no deseados también incluyen microorganismos patógenos, especialmente bacterias patógenas.

[0029] Usando una o varias de las cepas de bacterias aisladas concernidas aquí en una cantidad eficaz la formación de biopelícula en superficies y/o la proliferación planctónica en ambientes acuosos se pueden reducir y/o evitar.

[0030] En una forma de realización preferida la superficie en cuestión propensa a la formación de biopelícula se puede someter a una o varias de las cepas de bacterias como una medida preventiva antes de cualquier formación/acumulación de biopelícula. Esto tiene como resultado que se forme significativamente menos biopelícula. Alternativamente, si una biopelícula se ha formado ya, o al primer signo de acumulación de biopelícula, un método de la invención se puede utilizar para reducir una mayor formación de biopelícula. Un método de la invención puede incluso suponer la eliminación completa o parcialmente de la biopelícula.

[0031] Ejemplos de microorganismos no deseados incluyen aquellos descritos a continuación.

[0032] Microorganismos no deseados incluyen, pero de forma no limitativa, bacterias aeróbicas o bacterias anaeróbicas, Gram negativas y Gram positivas, hongos (levadura u hongo filamentoso), algas, y/o protozoos. Las bacterias contempladas incluyen bacterias seleccionadas del grupo que consiste en. *Pseudomonas* spp. incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Azotobacter vinelandii*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Streptococcus* spp., *Acetobacter*, *Leuconostoc*, *Betabacterium*, *Pneumococcus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Vibrio* spp., *Listeria* spp., y *Legionella* spp.

[0033] En una forma de realización preferida, el microorganismo no deseado es una bacteria aeróbica. En una forma de realización más preferida, la bacteria aeróbica es una cepa de *Aeromonas*. En otra forma de realización más preferida, la bacteria aeróbica es una cepa de *Burkholderia*. En otra forma de realización más preferida, la bacteria aeróbica es una Cepa de *Flavobacterium*. En otra forma de realización más preferida, la bacteria aeróbica es una cepa de *Microbacterium*. En otra forma de realización más preferida, la bacteria aeróbica es una Cepa de *Pseudomonas*. En otra forma de realización más preferida, la bacteria aeróbica es una Cepa de *Salmonella*. En otra forma de realización más preferida, la bacteria aeróbica es una cepa de *Staphylococcus*. En otra forma de realización más preferida, la bacteria aeróbica es de la familia *Enterobacteriaceae* (incluyendo por ejemplo, *Escherichia coli*).

[0034] En una forma de realización más preferida, la bacteria aeróbica es *Burkholderia cepacia*. En otra forma de realización más preferida, la bacteria aeróbica es una *Microbacterium imperiale* o *Mycobacterium tuberculosis*. En otra forma de realización más preferida, la bacteria aeróbica es *Pseudomonas aeruginosa*. En otra forma de realización más preferida, la bacteria aeróbica es *Pseudomonas fluorescens*. En otra forma de realización más preferida, la bacteria aeróbica es *Pseudomonas oleovorans*. En otra forma de realización más preferida, la bacteria aeróbica es *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. En otra forma de realización más preferida, la bacteria aeróbica es *Salmonella enteritidis*. En otra forma de realización más preferida, la bacteria aeróbica es *Staphylococcus aureus*. En otra forma de realización más preferida, la bacteria aeróbica es *Staphylococcus epidermidis*.

[0035] En otra forma de realización más preferida la bacteria es *Listeria monocytogenes*.

[0036] En otra forma de realización más preferida la bacteria es *Legionella adelaidensis*. En otra forma de realización más preferida la bacteria es *Legionella pneumophila*. En otra forma de realización más preferida la bacteria es *Legionella feeleii*. En otra forma de realización más preferida la bacteria es *Legionella moravica*.

[0037] En otra forma de realización la bacteria es *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischerii*, y/o *Vibrio alginolyticus*.

[0038] En otra forma de realización preferida, el microorganismo es una bacteria anaeróbica. En otra forma de realización más preferida, la bacteria anaeróbica es una cepa de *Desulfovibrio*. En otra forma de realización más preferida, la bacteria anaeróbica es *Desulfovibrio desulfuricans*.

[0039] En otra forma de realización preferida, el microorganismo no deseado es un hongo tal como una levadura u hongo filamentosos. En otra forma de realización más preferida, la levadura es una cepa de *Candida*. En otra forma de realización más preferida, la levadura es *Candida albicans*.

Composición de la invención

[0040] La invención también se refiere a una composición que comprende una o varias de las cepas de bacterias depositadas como se describe en este caso. Debe entenderse que una composición de la invención puede comprender una o varias de las cepas bacterianas concernidas aquí como cepas únicas o mezcla de dos o varias cepas, pero también puede incluir otras cepas de bacterias y/o ingredientes activos. En una forma de realización la composición comprende además un surfactante o uno o varios otros ingredientes mencionados a continuación.

Surfactantes

[0041] Los surfactantes pueden ser no iónicos incluyendo semipolares y/o aniónicos y/o zwitteriónicos y/o catiónicos. El(los) tensioactivo(s) debería(n) causar un daño a la actividad del cultivo de bacterias tan pequeña como sea posible.

[0042] Los tensioactivos pueden estar presentes en la composición a un nivel de 0,01% a 60% en peso.

[0043] Cuando se incluye allí, la composición contiene normalmente de aproximadamente 0 a aproximadamente un 40% de un surfactante aniónico tal como alquilbencenosulfonato lineal, alfa-olefinsulfonato, sulfato de alquilo (sulfato de alcohol graso), etoxisulfato alcohólico, alcanosulfonato secundario, éster metílico de alfa-sulfo ácido graso, ácido alquil- o alquenilsuccínico o jabón.

[0044] Cuando se incluye allí, la composición contiene normalmente de aproximadamente 0 a aproximadamente un 40% de un surfactante no iónico tal como alcohol etoxilato, nonilfenol, etoxilato alquilpoliglicósido, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, amida de polihidroxi alquil ácido graso, o derivados de N-alquilo N-acilo de glucosamina ("glucamidas").

Otros ingredientes

[0045] La composición puede comprender una o más enzimas. Ejemplos de enzimas contempladas se mencionan en la sección "Enzimas".

[0046] Otros ingredientes incluyen, pero de forma no limitativa, dispersantes, estabilizadores, agentes antimicrobianos, fragancias, tintes, y biocidas.

Enzimas

[0047] Una o más enzimas puede estar presente en una composición de la invención. Enzimas especialmente contempladas incluyen proteasas, alfa-amilasas, celulasas, lipasas, peroxidasas/oxidadas, pectato liasas, y mananasas, o mezclas derivadas.

[0048] Proteasas: proteasas adecuadas incluyen aquellas de origen animal, vegetal o microbiano. Origen microbiano es preferido. Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína están incluidos. La proteasa puede ser una serina proteasa o una metalo proteasa, preferiblemente una proteasa microbiana alcalina o una proteasa de tipo tripsina. Ejemplos de proteasas alcalinas son subtilisinas, especialmente aquellas derivadas de *Bacillus*, por ejemplo, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 (descrita en WO 89/06279). Ejemplos de proteasas de tipo tripsina son tripsina (p. ej., de origen bovino o porcino) y la proteasa de *Fusarium* descrita en WO 89/06270 y WO 94/25583.

[0049] Ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116, y WO 98/34946, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235 y 274. Enzimas proteasas disponibles comercialmente preferidas incluyen ALCALASE™, SAVINASE™, PRIMASE™, DURALASE™, DYRAZYM™, ESPERASE™, EVERLASE™,

POLARZYME™ y KANNASE™, LIQUANASE™ (Novozymes A/S), MAXATASE™, MAXACAL™, MAXAPEM™, PROPERASE™, PURAFECT™, OXP™ PURAFECT, FN2™, y FN3™ (Genencor internacional Inc.).

5 [0050] Lipasas: lipasas adecuadas incluyen aquellas de origen fúngico o bacteriano. Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína están incluidos. Ejemplos de lipasas útiles incluyen lipasas de *Humicola* (sinónimo de *Thermomyces*), por ejemplo, de *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) como se describe en EP 258 068 y EP 305 216 o de *H. insolens* como se describe en WO 96/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, por ejemplo, de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP 218 272), *P. cepacia* (EP 331 376), *P. stutzeri* (GB 1,372,034), *P. fluorescens*, *Pseudomonas sp.* cepa SD 705 (WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), una lipasa de *Bacillus*, por ejemplo, de *B. subtilis* (Dartois et al., 1993, Biochemica et Biophysica Acta 1131: 253-360), *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) o *B. pumilus* (WO 91/16422).

15 [0051] Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como los descritos en WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 y WO 97/07202.

[0052] Enzimas de lipasa disponibles comercialmente preferidas incluyen LIPOLASE™ y LIPOLASE ULTRA™, LIPOZYME™, y LIPEX™ (Novozymes A/S).

20 [0053] Cutinasa: el método de la invención se puede llevar a cabo en presencia de cutinasa clasificada en EC 3.1.1.74.

[0054] La cutinasa usada según la invención puede ser de cualquier origen. Preferiblemente las cutinasas son de origen microbiano, en particular de bacteriano, fúngico o de origen de levadura.

25 [0055] Las cutinasas son enzimas que son capaces de degradar cutina. En una forma de realización preferida, la cutinasa es derivada de una cepa de *Aspergillus*, en particular *Aspergillus oryzae*, una cepa de *Alternaria*, en particular *Alternaria brassiciola*, una cepa de *Fusarium*, en particular *Fusarium solani*, *Fusarium solani pisi*, *Fusarium roseum culmorum*, o *Fusarium roseum sambucium*, una cepa de *Helminthosporium*, en particular *Helminthosporium sativum*, una cepa de *Humicola*, en particular *Humicola insolens*, una cepa de *Pseudomonas*, en particular *Pseudomonas mendocina*, o
30 *Pseudomonas putida*, una cepa de *Rhizoctonia*, en particular *Rhizoctonia solani*, una cepa de *Streptomyces*, en particular *Streptomyces scabies*, o una cepa de *Ulocladium*, en particular *Ulocladium consortiale*. En una forma de realización más preferida la cutinasa es derivada de una cepa de *Humicola insolens*, en particular la cepa *Humicola insolens* DSM 1800. Cutinasa de *Humicola insolens* es descrita en WO 96/13580, que se incorpora aquí por referencia. La cutinasa puede ser una variante, tal como una de las variantes descritas en WO 00/34450 y WO 01/92502. Variantes de cutinasa preferida
35 incluyen variantes catalogadas en el ejemplo 2 de WO 01/92502, que se incorpora aquí por referencia.

[0056] Cutinasas comerciales preferidas incluyen NOVOZYM™ 51032 (disponibles de Novozymes A/S, Dinamarca).

40 [0057] El método de la invención se puede realizar en presencia de fosfolipasa clasificada como EC 3.1.1.4 y/o EC 3.1.1.32. Como se utiliza en este caso, el término fosfolipasa es una enzima que tiene actividad hacia fosfolípidos. Fosfolípidos, tales como lecitina o fosfatidilcolina, consisten en glicerol esterificado con dos ácidos grasos en una posición externa (sn-1) y en el medio (sn-2) y esterificados con ácido fosfórico en la tercera posición; el ácido fosfórico, a su vez, se puede esterificar a un amino-alcohol. Fosfolipasas son enzimas que participan en la hidrólisis de fosfolípidos. Diferentes tipos de actividad fosfolipásica pueden ser distinguidos, incluyendo fosfolipasas A₁ y A₂ que hidrolizan un grupo acilo graso (en las posiciones sn-1 y sn-2, respectivamente) para formar un lisofosfolípido; y lisofosfolipasa (o fosfolipasa B) que puede hidrolizar el grupo acilo graso restante en el lisofosfolípido. Fosfolipasa C y fosfolipasa D (fosfodiesterasas) liberan diacil glicerol o ácido fosfatídico respectivamente.

50 [0058] El término fosfolipasa incluye enzimas con actividad fosfolipásica, por ejemplo, fosfolipasa A (A₁ o A₂), actividad de fosfolipasa B, actividad de fosfolipasa C o actividad de fosfolipasa D. El término usado "fosfolipasa A" aquí en relación con una enzima de la invención se destina a cubrir una enzima con actividad de fosfolipasa A₁ y/o fosfolipasa A₂. La actividad de fosfolipasa se puede proporcionar por enzimas con otras actividades también, tal como, por ejemplo, una lipasa con actividad de fosfolipasa. La actividad de fosfolipasa puede, por ejemplo, ser de una lipasa con actividad de fosfolipasa lateral. En otras formas de realización de la invención la actividad enzimática de fosfolipasa está provista por una enzima con esencialmente
55 sólo actividad de fosfolipasa y donde la actividad enzimática de fosfolipasa no es una actividad lateral.

[0059] La fosfolipasa puede ser de cualquier origen, por ejemplo, de origen animal (tal como, por ejemplo, mamífero), por ejemplo, de páncreas (p. ej., bovino o páncreas porcino), o veneno de serpiente o veneno de abeja. Preferiblemente la fosfolipasa puede ser de origen microbiano, por ejemplo, de hongos filamentosos, levadura o bacterias, tal como el género o especies *Aspergillus*, por ejemplo, *A. niger*, *Dictiostelium*, por ejemplo, *D. discoideum*; *Mucor*, por ejemplo, *M. javanicus*, *M. mucedo*, *M. subtilissimus*; *Neurospora*, por ejemplo, *N. crassa*; *Rhizomucor*, por ejemplo, *R. pusillus*; *Rhizopus*, por ejemplo,

5 *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*, *Sclerotinia*, por ejemplo, *S. libertiana*; *Trichophyton*, por ejemplo, *T. rubrum*; *Whetzelinia*, por ejemplo, *W. sclerotiorum*; *Bacillus*, por ejemplo, *B. megaterium*, *B. subtilis*; *Citrobacter*, por ejemplo, *C. freundii*; *Enterobacter*, por ejemplo, *E. aerogenes*, *E. cloacae*; *Edwardsiella*, *E. tarda*; *Erwinia*, por ejemplo, *E. herbicola*; *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*; *Klebsiella*, por ejemplo, *K. pneumoniae*; *Proteus*, por ejemplo, *P. vulgaris*; *Providencia*, por ejemplo, *P. stuartii*; *Salmonella*, por ejemplo, *S. typhimurium*; *Serratia*, por ejemplo, *S. liquefaciens*, *S. marcescens*; *Shigella*, por ejemplo, *S. flexneri*; *Streptomyces*, por ejemplo, *S. violeceoruber*; *Yersinia*, por ejemplo, *Y. enterocolitica*. Así, la fosfolipasa puede ser fúngica, por ejemplo, de la clase *Pyrenomycetes*, tal como el género *Fusarium*, tal como una cepa de *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani*, o una cepa de *F. oxysporum*. La fosfolipasa también puede ser de una cepa de hongo filamentoso en el género *Aspergillus*, tal como una cepa de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*.

15 [0060] Fosfolipasas preferidas son derivadas de una cepa de *Humicola*, especialmente *Humicola lanuginosa*. La fosfolipasa puede ser una variante, tal como una de las variantes descritas en WO 00/32758, que se incorporan aquí por referencia. Variantes de fosfolipasa preferida incluyen variantes catalogadas en el Ejemplo 5 de WO 00/32758, que se incorpora específicamente aquí por referencia. En otra forma de realización preferida la fosfolipasa es una descrita en WO 04/111216, especialmente las variantes catalogadas en la tabla en el Ejemplo 1.

20 [0061] En otra forma de realización preferida la fosfolipasa es derivada de una cepa de *Fusarium*, especialmente *Fusarium oxysporum*. La fosfolipasa puede ser la concernida en WO 98/026057 visualizada en SEC ID n.º: 2 derivada de *Fusarium oxysporum* DSM 2672, o variantes de las mismas.

[0062] En una forma de realización preferida de la invención la fosfolipasa es una fosfolipasa A₁ (EC. 3.1.1.32). En otra forma de realización preferida de la invención la fosfolipasa es una fosfolipasa A₂ (EC.3.1.1.4.).

25 [0063] Ejemplos de fosfolipasas comerciales incluyen LECITASE™ y LECITASE™ ULTRA, YIELSMAX, o LIPOPAN F (disponibles de Novozymes A/S, Dinamarca).

30 [0064] Amilasas: amilasas adecuadas (beta y/o alfa) incluyen aquellas de origen fúngico o bacteriano. Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína están incluidos. Amilasas incluyen, por ejemplo, alfa-amilasas obtenidas de *Bacillus*, por ejemplo, una cepa especial de *B. licheniformis*, descrita con más detalle en GB 1,296,839, o las cepas de especie *Bacillus* descritas en WO 95/026397 o WO 00/060060.

35 [0065] Ejemplos de amilasas útiles son las variantes descritas en WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873, WO 97/43424, WO 01/066712, WO 02/010355, WO 02/031124 y WO 2006/002643(cuyas referencias se incorporan todas aquí por referencia.

40 [0066] Amilasas disponibles comercialmente son DURAMYL™, TERMAMYL™, ULTRA™ de TERMAMYL, NATALASE™, STAINZYME™, STAINZYME ULTRA™, FUNGAMYL™ y BAN™ (Novozymes A/S), RAPIDASE™ y PURASTAR™ (de Genencor internacional Inc.).

45 [0067] Celulasas: celulasas adecuadas incluyen aquellas de origen fúngico o bacteriano. Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína están incluidos. Celulasas adecuadas incluyen celulasas del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo, las celulasas fúngicas producidas de *Humicola insolens*, *Thielavia terrestris*, *Myceliophthora thermophila*, y *Fusarium oxysporum* descritas en US 4,435,307, US 5,648,263, US 5,691,178, US 5,776,757, WO 89/09259, WO 96/029397, y WO 98/012307.

50 [0068] Celulasas especialmente adecuadas son las celulasas neutras o alcalinas con beneficios de cuidado de color. Ejemplos de tales celulasas son celulasas descritas en EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasa tales como las descritas en WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593, US 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 y WO 1999/001544.

55 [0069] Celulasas disponibles comercialmente incluyen CELLUZYME™, CELLUCLAST™, CAREZYME™, ENDOLASE™, RENOZYME™ (Novozymes A/S), CLAZINASE™ y PURADAX HA™, ACCELERASE™ 1000 (Genencor internacional Inc.), y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

60 [0070] Peroxidasas/oxidases: peroxidasas/oxidases adecuadas incluyen aquellas de origen vegetal, fúngico o bacteriano. Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína están incluidos. Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, por ejemplo, de *C. cinereus*, y variantes de las mismas como aquellas descritas en WO 93/24618, WO 95/10602, y WO 98/15257.

[0071] Peroxidasas disponibles comercialmente incluyen Guardzyme™ y Novozym™ 51004 (Novozymes A/S).

[0072] Pectato liasas (también llamadas poligalacturonato liasas): ejemplos de pectato liasas incluyen pectato liasas que han sido clonadas de distintos géneros bacterianos tal como *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Xanthomonas*, al igual que de *Bacillus subtilis* (Nasser et al., 1993, FEBS Letts. 335:319-326) y *Bacillus* sp. YA-14 (Kim et al., 1994, Biosci. Biotech. Biochem. 58: 947-949). La purificación de pectato liasas con actividad máxima en el rango de pH de 8-10 producidas por *Bacillus pumilus* (Dave and Vaughn, 1971, J. Bacteriol. 108: 166-174), *B. polymyxa* (Nagel and Vaughn, 1961, Arch. Biochem. Biophys. 93: 344-352), *B. stearothermophilus* (Karbassi and Vaughn, 1980, Can. J. Microbiol. 26: 377-384), *Bacillus* sp. (Hasegawa and Nagel, 1966, J. Food Sci. 31: 838-845) y *Bacillus* sp. RK9 (Kelly and Fogarty, 1978, Can. J. Microbiol. 24: 1164-1172) también ha sido descrita. Cualquiera de los anteriores, al igual que cationes bivalentes independientes y/o pectato liasas termoestables, se pueden utilizar al practicar la invención. En formas de realización preferidas, la pectato liasa comprende la secuencia de aminoácidos de una pectato liasa descrita en el Heffron et al., 1995, Mol. Plant-Microbe Interact. 8: 331-334 and Henrissat et al., 1995, Plant Physiol. 107: 963-976. Pectato liasas En concretas contemplado son descritas en WO 99/27083 y WO 99/27084. Otras pectato liasas concretas contempladas derivadas de *Bacillus licheniformis* están descritas como SEC ID n.º: 2 en la patente EE.UU. n.º 6,284,524 (el cual documento es por la presente incorporado por referencia). Variantes de pectato liasa específicamente contempladas están descritas en WO 02/006442, especialmente las variantes descritas en los ejemplos en WO 02/006442 (cuyo documento se incorpora aquí por referencia).

[0073] Ejemplos de pectato liasas alcalinas disponibles comercialmente incluyen BIOPREP™ y L de SCOURZYME™ de Novozymes A/S, Dinamarca.

[0074] Mananasa: ejemplos de mananasas (EC 3.2.1.78) incluyen mananasas de origen fúngico y bacteriano. En una forma de realización específica la mananasa es derivada de una cepa del género de hongo filamentoso *Aspergillus*, preferiblemente *Aspergillus niger* o *Aspergillus aculeatus* (WO 94/25576). WO 93/24622 divulga una mananasa aislada de *Trichoderma reesei*. Mananasas también han sido aisladas de diferentes bacterias, incluyendo organismos de *Bacillus*. Por ejemplo, Talbot et al., 1990, Appl. Environ. Microbiol. 56(11): 3505-3510 describe una beta mananasa derivada de *Bacillus stearothermophilus*. Mendoza et al., 1994, World J. Microbiol. Biotech. 10(5): 551-555 describe una beta mananasa derivada de *Bacillus subtilis*. JP-A-03047076 divulga una beta mananasa derivada de *Bacillus* sp. JP-A- 63056289 describe la producción de una beta mananasa alcalina termoestable. JP-A-63036775 se refiere al microorganismo de *Bacillus* FERM P-8856 que produce beta mananasa y beta manosidasa. JP-A-08051975 divulga beta mananasas alcalinas a partir de *Bacillus* alcalofílico sp. AM-001. Una mananasa purificada de *Bacillus amyloliquefaciens* se describe en WO 97/11164. WO 91/18974 describe una hemicelulasa tal como una glucanasa, xilanasa o mananasa activa. Están contempladas las mananasas alcalinas de familia 5 y 26 derivadas de *Bacillus agaradhaerens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus* sp., y *Humicola insolens* descrita en WO 99/64619. Están especialmente contempladas las mananasas de *Bacillus* sp. concernidas en los ejemplos en WO 99/64619, cuyo documento se incorpora aquí por referencia.

[0075] Ejemplos de mananasas disponibles comercialmente incluyen MANNAWAY™ disponible de Novozymes A/S Dinamarca.

Materiales y métodos

[0076] Productos químicos usados como tampones y reactivos fueron productos comerciales de, al menos, calidad reactiva. Caldo de recuento en placa (Difco 275120)
 Agar de MacConkey (Smith River Biologicals, Ferrum, VA cat#11-00380)
 Caldo Luria (Difco 241420)
 Placas de agar de Standard Methods (placas SMA) (Smith River Biologicals, Ferrum, VA cat# 11-00450)

Cepas de bacterias:

[0077]

- Mezcla de *bacillus* (6BB): mezcla de seis *Bacillus* spp. cepas consistiendo en las siguientes cepas depositadas: NRRL# B-50014 (30%), B-50015 (30%), B-50016 (10%), B-50017 (10%), B-50018 (10%), B-50019 (10%). La proporción real entre las cepas en la mezcla 6BB se indica en paréntesis (x %).
- *Pseudomonas aeruginosa*: la cepa *Pseudomonas aeruginosa* usada en todos ejemplos equipada con un plásmido que expresa una proteína fluorescente verde fue constitutivamente construida como se describe por Nivens et al., 2001, J. Bacteriol. 183: 1047-1057.
- *Pseudomonas montelli* (ATCC 700412)
- *Pseudomonas putida* (ATCC 49451)
- *Vibrio harveyi* (ATCC 25919)
- *Vibrio alginolyticus* (ATCC 17749)
- *Vibrio fischerii* (MJ-1): cepa tipo salvaje

Depósito de Material biológico

- [0078] El material biológico ha sido depositado según las condiciones del tratado de Budapest en
 5 - American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20108, EE. UU. y
 - Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit (NRRL) National Center for Agricultural Utilization Research 1815 N.
 University Street, Peoria, IL 61604, EE. UU. Las cepas de bacterias recibieron la siguiente identificación #:

Identificación	Número de acceso	Fecha de depósito
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	PTA-7541	20 Abril 2006
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	PTA-7542	20 Abril 2006
<i>Bacillus atrofaeus</i>	PTA-7543	20 Abril 2006
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	PTA-7544	20 Abril 2006
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	PTA-7545	20 Abril 2006
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	PTA-7546	20 Abril 2006
<i>Bacillus subtilis subesp. subtilis</i>	PTA-7547	20 Abril 2006
<i>Bacillus velezensis</i>	PTA-7548	20 Abril 2006
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	PTA-7549	20 Abril 2006
<i>Bacillus simplex</i>	PTA-7550	20 Abril 2006
<i>Bacillus simplex</i>	PTA-7789	18 Agosto 2006
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	PTA-7790	18 Agosto 2006
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	PTA-7791	18 Agosto 2006
<i>Bacillus atrophaeus</i>	PTA-7792	18 Agosto 2006
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	PTA-7793	18 Agosto 2006
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NRRL B-50017	14 Marzo 2007
<i>Bacillus megaterium</i>	NRRL B-50019	14 Marzo 2007
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NRRL B-50018	14 Marzo 2007
<i>Bacillus licheniformis</i>	NRRL B-50014	14 Marzo 2007
<i>Bacillus licheniformis</i>	NRRL B-50015	14 Marzo 2007
<i>Bacillus pumilus</i>	NRRL B-50016	14 Marzo 2007

- 10 [0079] Las cepas han sido depositadas bajo condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la
 pendencia de esta solicitud de patente para uno autorizado para ello determinado por el comisario de patentes y marcas
 registradas bajo 37 C.F.R. §1,14 y 35 U.S.C. §122. Los depósitos representan cultivos puros. Los depósitos están
 disponibles según sea necesario por leyes patentes extranjeras en países donde equivalentes de la solicitud de sujeto o su
 15 descendiente son solicitadas. No obstante, se debe entender que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia
 para practicar la presente invención en menoscabo del derecho resultante de las patentes concedido por acción
 gubernativa.

- [0080] Las cepas de bacterias depositadas en ATTC son derivadas de cepas de bacterias de origen natural aislado.
 20 Todas las cepas fueron recogidas en el Estados Unidos en 2005.

- [0081] Para las cepas de bacterias depositadas en NRRL dos fueron recogidas de suciedad en Estados Unidos (depositado
 como NRRL B-50017 y NRRL B-50018) y cuatro vinieron de nuestras colecciones de cultivo. A nuestro leal saber y entender
 NRRL B-50014 es el mismo que ATCC # 23842 NRRL B-50015 es el mismo que ATCC # 21415 NRRL B-50016 es el
 mismo que NRRL b- 4064 y NRRL B-50019 = NRRL B3254).

- 25 [0082] Las cepas pueden consistir en esporas de bacterias latentes y/o bacterias viables.

Equipamiento:

- 30 [0083] Lector de placa de microtitulación cinética fluorescente (BioTek sinergia HT-I)
 Recipiente de policarbonato (Biosurfaces Technology, USA)
 Probeta de porcelana (Tyler Research Instruments Corp., Edmonton, Alberta, Canada)
 Probeta de boca ancha (Fisher cat#NC9421998, Pittsburg, PA, USA)

35 **EJEMPLOS****Ejemplo 1**

Proliferación planctónica de *Pseudomonas* en presencia de mezcla de *Bacillus* (6BB) - Placa de Microtitulación Fluorescente (FMP)

5 [0084] Los 96 pocillos de una placa de microtitulación fueron rellenos con 200 microL de caldo de recuento en placa (Difco DF0751-17-2) e inoculados con una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* equipada con un plásmido que expresa una proteína verde fluorescente constitutivamente. Una mezcla de seis *Bacillus* spp. (6BB) se añadió a los pocillos. La dosis inicial de *Pseudomonas* fue o bien $2,4 \times 10^8$ o bien $4,8 \times 10^8$ ufc/mL mientras que la dosis de *Bacillus* spp. fue $6,8 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^7$ ufc/mL dando como resultado proporciones *Pseudomonas*: *Bacillus* de 24:1 y 70:1. Las placas de microtitulación fueron monitorizadas con un lector de placa de microtitulación cinética fluorescente (BioTek Synergy HT-I) con incubación a 21°C y lecturas fluorescentes a 485/20 nm excitación, 528/20 nm emisión, cada 20 minutos durante 43 horas. Las curvas cinéticas de fluorescencia resultantes mostraron una supresión de la fluorescencia gfp dependiente de la dosis de *Bacillus* (es decir, supresión de población de *Pseudomonas*) (Fig. 1).

Ejemplo 2

15 Reducida formación de biopelícula de *Pseudomonas* y proliferación planctónica en la presencia de mezcla de *Bacillus* - probeta + Biocontrol probeta (TTCBC)

20 [0085] Un recipiente de policarbonato (Biosurfaces Technology) con tres probetas de porcelana (Tyler Research Instruments Corp., Edmonton, Alberta) fue insertado en una probeta de boca ancha (Fisher cat#NC9421998) y 50 mL caldo de recuento en placa (Difco DF0751-17-2) hecho según instrucciones de marcador fueron añadidos y sometidos a autoclave. Los tubos fueron inoculados con una mezcla de esporas de *Bacillus* e incubados a 28°C con agitación moderada durante toda la noche permitiendo así la germinación. Dosis inicial de esporas de *Bacillus* en el rango de $2,6 \times 10^2$ a $7,8 \times 10^5$ ufc/mL.

25 [0086] El siguiente día, una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* con expresión de gfp se añadió a los tubos a una concentración de 70 ufc/mL dando como resultado proporciones *Pseudomonas*:*Bacillus* de inóculo inicial que varían de 1:3,5 a 1:10 000. Después de los periodos de incubación adicionales de 24 y 48 horas, se tomaron muestras de los tubos de modo destructivo raspando cada probeta (células de biopelícula) en el suero salino tamponado con fosfato, homogenizando la suspensión, luego diluyendo y colocando en placas en agan de MacConkey (Difco DF0075-17-1) para enumerar sólo células *Pseudomonas*. El caldo en los tubos (células planctónicas) fue también muestreado, diluido y colocado en placas. El recuento de *Pseudomonas* en presencia de *Bacillus* spp. fue comparado con controles negativos sin *Bacillus* spp. presente y se apreció que el tratamiento con *Bacillus* spp. tuvo como resultado una reducción significativa y aproximadamente dependiente de la dosis de poblaciones de *Pseudomonas* en los estados de biopelícula (Fig. 2) y planctónicos (Fig. 3).

Ejemplo 3

35 Reducida formación de biopelícula de *Pseudomonas* y proliferación planctónica en la presencia de aislados de *Bacillus* - probeta + Biocontrol de probeta (TTCBC)

40 [0087] Un recipiente de policarbonato (Biosurfaces Technology) con tres probetas de porcelana (Tyler Research Instruments Corp., Edmonton, Alberta) fue insertado en una probeta de boca ancha (Fisher cat#NC9421998) y 50 mL caldo de recuento en placa (Difco DF0751-17-2) hecho según instrucciones de marcador fueron añadidos y sometido a autoclave. Cada tubo fue inoculado con un cultivo celular vegetativo durante toda la noche de un candidato individual *Bacillus* y un durante toda la noche con un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* equipado con un plásmido de gfp. Los tubos fueron incubados a 28°C con agitación moderada. La dosis inicial de células de *Bacillus* estaba en el rango de $1,0 \times 10^3$ a $8,2 \times 10^5$ ufc/mL y la dosis inicial de *Pseudomonas* fue aproximadamente 1×10^3 a 1×10^5 . La proporción de *Pseudomonas* a *Bacillus* estaba en el rango de 1: 2 a 1:147.

50 [0088] A puntos en el tiempo de 24 y 48 horas en la incubación, se tomaron muestras de los tubos de modo destructivo raspando cada probeta (células de biopelícula) en el suero salino tamponado con fosfato, homogenizado de la suspensión, luego diluyendo y colocando en placas en agan de MacConkey (Difco DF0075-17-1) para recontar sólo células *Pseudomonas*. El caldo en los tubos (células planctónicas) fue también muestreado, diluido y colocado en placas. El recuento de *Pseudomonas* en presencia de *Bacillus* spp. fue comparado con controles negativos sin *Bacillus* spp. presente y el log del control de *Pseudomonas* para cada candidato *Bacillus* fue calculado a tiempos 24 y 48 horas para células adheridas y planctónicas.

		Log control	Log control	Log control	Log control
Cepa	P:B proporción 1:x B	24 h planctónico	24 h adherido	48 h planctónico	48 h adherido
PTA-7544	9,5	3,4	2,2	5,4	4,1
PTA-7790	22,8	3,0	1,9	5,1	4,4
PTA-7791	85	4,8	2,7	4,5	4,8

PTA-7792	4,2	3,2	3,0	5,4	4,0
PTA-7549	147,1	4,5	3,7	6,0	4,3
PTA-7542	2,8	2,9	2,8	5,8	4,5
PTA-7545	3,7	3,6	3,2	7,1	5,3
NRRL B-50017	2,3	3,1	2,4	5,8	4,4
NRRL B-50016	4,8	0,9	1,4	0,6	0,5

Ejemplo 4

5 Reducida formación de biopelícula de *E. coli* y proliferación planctónica en presencia de aislados de *Bacillus* - probeta + Biocontrol de probeta (TTCBC)

10 [0089] Un recipiente de policarbonato (Biosurfaces Technology) con tres probetas de porcelana fue insertado en una probeta de boca ancha (Fisher cat#NC9421998) y 50 mL caldo de recuento en placa (Difco DF0751-17-2) hecho según las instrucciones de marcador fue añadido y sometido a autoclave. Cada tubo fue inoculado con un cultivo celular vegetativo durante toda la noche de un candidato *Bacillus* individual y con un cultivo de *E. coli* durante toda la noche. Los tubos fueron incubados a 28°C con agitación moderada. La dosis inicial de células de *Bacillus* estaba en el rango de 1,0x10³ a 8,2x10⁵ ufc/mL y la dosis inicial de *E. coli* estaba en el rango de 1x10³ a 1x10⁵. Las proporciones de *E. coli* respecto a *Bacillus* variaron de 1: 0.6 a 1:32.

15 [0090] A puntos en el tiempo a 24 y 48 horas en incubación, se tomaron muestras de los tubos de modo destructivo raspando cada probeta (células de biopelícula) en el suero salino tamponado con fosfato, homogenizando de la suspensión, luego diluyendo y colocando en placas en agar de MacConkey (Difco DF0075-17-1) para recontar sólo células de *E. coli*. El caldo en los tubos (células planctónicas) fue también muestreado, diluido y colocado en placas. El recuento de *E. coli* en presencia de *Bacillus* spp. fue comparado con controles negativos sin *Bacillus* spp. presente y el log control de *E. coli* para cada candidato *Bacillus* fue calculado a tiempos 24 y 48 horas para células adheridas y planctónicas.

Cepa	P:B proporción	Log control 24 horas planctónico	Log control 24 horas adherido	Log control 48 horas planctónico	Log control 48 hora adherido
PTA-7544	2,7	4,4	5,2	>9	>9
PTA-7790	21,0	5,2	6,3	>9	>9
PTA-7791	2,8	2,5	2,1	7,3	4,2
PTA-7792	2,3	0,0	0,6	0,0	0,0
PTA-7549	0,8	5,2	6,8	9,7	6,5
PTA-7542	5,7	5,1	4,7	>9	5,4
PTA-7545	17,0	5,1	4,9	>9	>9
NRRL B-50017	0,6	3,7	4,1	8,7	7,4
PTA-7546	32,4	4,0	3,9	9,7	7,2

Ejemplo 5

25 Zona de inhibición de *E. coli* en Placa Petri

30 [0091] Candidatos de *Bacillus* fueron crecidos en el caldo de recuento en placa durante 18 a 24 horas dando como resultado appx 10⁷ a 10⁸ ufc/mL. *E. coli* crecido de 18 a 24 horas (appx 10⁸ a 10¹⁰ cfu.mL) fue estriado para formar un tamiz en la superficie de placas de agar Standard Methods (placas SMA) Smith River Biologicals, Ferrum, VA) y cuatro agujeros de 5 mm fueron perforados en el agar con un tubo de acero inoxidable estéril. 50 microL de cada cultivo de líquido de *Bacillus* fue entregado en los agujeros (1 cepa por agujero) y la placa fue incubada durante 18 a 48 horas a 35°C, lado de agar abajo. El tamiz de *E. coli* inhibido en la proximidad a un agujero fue marcado como biocontrol positivo para el candidato *Bacillus*. La zona de inhibición fue medida en milímetros (mm) para permitir la evaluación semicuantitativa de control. Inhibición discernible >1 mm fue marcada como un positivo.

35

Cepa	Inhibición de <i>E. coli</i>
NRRL B-50016	-
NRRL B-50017	-
PTA-7541	+
PTA-7792	+
PTA-7542	+
PTA-7543	+
PTA-7544	+

PTA-7545	+
PTA-7546	+
PTA-7547	-
PTA-7549	+
PTA-7791	+
PTA-7790	+

Ejemplo 6Zona de inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* en Placa Petri

5

[0092] Candidatos de *Bacillus* fueron crecidos en el caldo de recuento en placa durante 18 a 24 horas dando como resultado appx 10^7 a 10^8 ufc/mL cultivo. *Pseudomonas aeruginosa* fue crecida de 18 a 24 horas (appx 10^8 a 10^{10} ufc/mL) y estriada para formar un tamiz en la superficie de placas de agar Standard Methods (Smith River Biologicals, Ferrum, VA) y cuatro agujeros de 5 mm fueron perforados en el agar con un tubo de acero inoxidable estéril. 50 microL de cada cultivo de líquido de *Bacillus* fueron entregados en los agujeros (1 cepa por agujero) y la placa fue incubada durante 18 a 48 horas a 35°C, lado de agar abajo. El tamiz de *Pseudomonas* inhibido en la proximidad a un agujero fue marcado como biocontrol positivo para el *Bacillus* candidato. La zona de inhibición fue también medida en micrómetros (mm) para permitir la evaluación semicuantitativa del control. Inhibición discernible > 0,5 mm fue marcada como un positivo.

10

Cepa	Inhibición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	(continuación)
NRRL B-50016	-
NRRL B-50017	+
PTA-7542	+
PTA-7545	+
PTA-7791	+

15

Ejemplo 7Zona de inhibición de *Pseudomonas montelli* y *putida* en Placa Petri

20

[0093] *Bacillus* NRRL candidato B-50014 fue crecido en el caldo de recuento en placa durante 18 a 24 horas dando como resultado appx 10^7 a 10^8 ufc/mL cultivo. *Pseudomonas montelli* (ATCC 700412) y *Ps. putida* (ATCC 49451) crecido 18 a 24 horas (appx 10^8 a 10^{10} ufc/mL cultivo) fueron estriados para formar un tamiz en la superficie de placas de agar Standard Methods y cuatro agujeros de 5 mm fueron perforados en el agar con un tubo de acero inoxidable estéril. 50 microL de cultivo de líquido de *Bacillus* fueron entregados en los agujeros y la placa fue incubada durante 18 a 48 horas a 35°C, lado de agar abajo. El tamiz de *Pseudomonas* inhibido en la proximidad a un agujero fue marcado como biocontrol positivo para el candidato *Bacillus*. La zona de inhibición fue también medida en milímetros (mm) para permitir la evaluación semicuantitativa de control.

25

[0094] Inhibición discernible > 1 mm fue marcada como un positivo.

30

Cepa	Inhibición de <i>Pseudomonas montelli</i>	Inhibición de <i>Pseudomonas putida</i>
NRRL B-50014	+	+

Ejemplo 8Inhibición de detección de quórum

35

[0095] *Serratia rubidaea* (ATCC 27593) fue usada como bacteria indicadora ya que su pigmentación depende de la ruta de detección de quórum de tacto. Compuestos de detección de quórum permiten que las bacterias "se comuniquen" y afectan a fenotipos tales como pigmentación, motilidad, patogenicidad y formación de biopelícula, así la inhibición de detección de quórum es un modo de acción para el control de biopelícula.

40

[0096] Candidatos de *Bacillus* fueron crecidos en el caldo de recuento de placa, de 18 a 24 horas, 35°C, a una densidad de aprox. 10^7 ufc/mL. Los bacilos fueron manchados (10 microL) sobre una placa de agar Standard Methods (Smith River Biologicals, Ferrum, VA) e incubados durante 18 a 24 horas a 26°C, después del cual tiempo, colonias fueron visibles. El cultivo de *Serratia* (5 microL) (Caldo Luria, 18 a 24 horas, 26°C, aprox. 10^7 ufc/mL) se añadió a 5 mL de agar LB fundido

0,5% (Caldo Luria 30,5 g/L y 0,5% agar noble), mezclado bien, y vertido sobre las placas con colonias candidatas de *Bacillus* maduro. Después de que el agar se colocara, la placa fue incubada de 18 a 24 horas a 26°C. Las zonas de pigmentación inhibida pero crecimiento de *Serratia* no inhibido per se fueron marcadas positivo para QSI y medidas a través de su diámetro completo para resultados semicuantitativos.

5

Cepa	Diámetro de pigmentación suprimida (mm)
NRRL B-50014	27
NRRL B-50015	27
NRRL B-50016	45
NRRL B-50017	42
NRRL B-50018	36
PTA-7541	39
PTA-7792	43
PTA-7542	31
PTA-7543	24
PTA-7544	49
PTA-7545	-
PTA-7546	43
PTA-7547	28
PTA-7548	-
PTA-7549	50
PTA-7793	-
PTA-7790	-
PTA-7791	40

Ejemplo 9

Control de Biopelícula de *Pseudomonas* y proliferación celular Planctónica en presencia de candidato *Bacillus* en reactores de biopelícula CDC

10

[0097] Reactores de biopelícula CDC (Biosurfaces Technologies, Bozeman, MT, Cat#CBR90-2) con probetas de porcelana (Tyler Research Instruments Corp., Edmonton, Alberta) fueron rellenos con 400 ml caldo de recuento en placa y sometidos a autoclave. Esporas PTA- 7546 fueron adicionadas a los medios enfriados de dos reactores (dosis inicial = $4,5 \times 10^5$ ufc/mL en el reactor) para permitir un tiempo de pregerminación de 24 horas con incubación a temperatura ambiente, la agitación se establece a 60 r.p.m. antes del ataque de *Pseudomonas*. Dos reactores adicionales fueron tratados como controles sin inoculación de *Bacillus*. *Pseudomonas aeruginosa* fue crecida durante toda la noche en el caldo de recuento en placa y 20 microL de una dilución 1:100 de cultivo de *Pseudomonas* fueron luego añadidos a los cuatro reactores (3590 ufc/mL) y la proporción de co-cultivo resultante fue 1 *Pseudomonas*:127 *Bacilli*. Después de 24 horas de crecimiento, la redosificación del medio inició a razón de 3 mL/min caldo de recuento en placa diluido (concentración 1 g/L). La agitación fue establecida a 60 r.p.m.

15

20

[0098] Un día más tarde (dos días después del inicio del co-cultivo), se tomaron muestras líquidas de cada reactor, colocadas en placas y diluidas en agar Macconkey e incubadas aprox. 18 horas a 35°C para obtener un recuento Gram negativo (=Pseudomonas=organismo no deseado). De forma similar, probetas fueron raspadas con bastoncitos de aplicador de madera estériles y el raspado fue suspendido en el tampón de fosfato estéril, homogeneizado, y colocado en placas y diluido en agan MacConkey que fue incubado durante 18 horas a 35°C. La comparación del recuento de *Pseudomonas* en reactores tratados vs. no tratados permitió el cálculo de "log control en reactores de *Bacillus*".

25

Condición	Reactor tratado A †	Reactor tratado B †	Media de reactores tratados †	Reactor no tratado A †	Reactor no tratado B †	Media de reactores no tratados †	Media de Log control †
Biopelícula de (rascada de probetas)	2,6x10 ² h	5,7x10 ² h	4,2x10 ² h	6,7x10 ⁶ h	1,4x10 ⁶ h	4,1x10 ⁶ h	3,9
Muestras planctónica (líquida)	1,4x10 ⁴ h	1,1x10 ⁴ h	1,3x10 ⁴ h	2,1x10 ⁷ h	6,4x10 ⁷ h	4,3x10 ⁷ h	3,5
† recuento ufc/mL o ufc/probeta							

30

Ejemplo 10

Control de biopelícula de *Pseudomonas* y proliferación celular planctónica en presencia de candidato *Bacillus* en reactores de biopelícula CDC con redosificación de espora de *Bacillus*

5 [0099] Reactores de biopelícula CDC (Biosurfaces Technologies, Bozeman, MT, Cat#CBR90-2) con probeta de porcelana (Tyler Research Instruments Corp., Edmonton, Alberta) fueron rellenos con 400 mL caldo de recuento en placa (resistencia completa) y sometidos a autoclave. Esporas de PTA-7545 (prueba 1) o NRRL B-50017 (prueba 2) fueron
 10 adicionadas a los medios enfriados de dos reactores para permitir un tiempo de pregerminación de 24 hora a temperatura ambiente con 60 r.p.m. de agitación, antes el ataque de *Pseudomonas* (dosis de *Bacillus* inicial = $1,3 \times 10^5$ ufc/mL en la prueba de reactor 1 ufc/mL prueba 2). Dos reactores adicionales fueron tratados como controles sin inoculación de *Bacillus*. *Pseudomonas aeruginosa* fue crecida durante toda la noche en el caldo de recuento en placa y 20 microL de una dilución de
 15 1: 100 del cultivo de *Pseudomonas* se añadió a los cuatro reactores (127 ufc/mL prueba 1 1×10^5 ufc/mL prueba 2) y la proporción de co-cultivo resultante fue 1 *Pseudomonas*:104 *Bacilli* para la prueba 1 y 1:0,1 para la prueba 2. Después de 24 horas de crecimiento, la redosificación del medio inició a razón de 90 ml/15 min de caldo de recuento en placa diluido (concentración 1 g/L) durante 15 min cada hora. Para los reactores tratados, esporas de *Bacillus* fueron dosificadas a razón de 1,5 ml concentrado de espora sobre el curso de 2,7 horas para una concentración final de $1,1 \times 10^8$ ufc de esporas de *Bacillus*/día para la prueba 1 y $1,8 \times 10^7$ ufc de esporas de *Bacillus*/día para la prueba 2. La agitación fue establecida a 60
 20 r.p.m.

[0100] Un día más tarde (dos días después del inicio del co-cultivo) se tomaron muestras líquidas de cada reactor, se colocaron en placas y se diluyeron en agar Maconkey y se incubaron aprox. 18 horas a 35°C para obtener recuento Gram negativo (organismo indeseable). De forma similar, probetas fueron raspadas con bastoncitos de aplicador de madera estériles y el raspado fue suspendido en el tampón de fosfato estéril, colocado en placas y diluido y homogeneizado en agua de MacConkey que fue incubado durante 18 horas a 35°C. La comparación del recuento de *Pseudomonas* en reactores
 25 tratados vs. no tratados permitió el cálculo de "log control en reactores *Bacillus*".

Condición	PTA-7545 Log control medio	NRRL B-50017 Log control medio
Biopelícula (rascada de probetas)	4,5	2,9
Muestras planctónicas (líquidas)	4,4	3,5

Ejemplo 11

Zona de inhibición de *Vibrio harveyi* en Placa Petri

30 [0101] Candidatos de *Bacillus* fueron crecidos en el caldo nutritivo (3 g/L extracto de carne bovina, 5 g/L peptona) a 35°C durante 18-24 horas. *V. harveii* ATCC 25919 fue crecido en el caldo nutritivo con 1,5% NaCl adicionado a 28°C durante 18-
 35 24 horas. Agar nutritivo (1.5% agar) con 1,5% NaCl fue sometido a autoclave en alícuotas de 25 mL y 250 microL durante toda la noche. Cultivo de *Vibrio* se añadió a cada alícuota de agar fundido dando como resultado aproximadamente 1×10^6 ufc/mL de *Vibrio* en el agar. Después de que el agar solidificara, 4 agujeros fueron perforados en cada placa utilizando una pieza de tubería de acero inoxidable esterilizada. 50 microL de cada cultivo de *Bacillus* durante toda la noche fueron transferidos a cada pocillo. Las placas fueron incubadas con el lado de agar abajo a 28°C durante 18-24 horas. Las zonas de tamiz de *Vibrio* inhibido fueron medidas. Inhibición discernible > 0.5 mm fue marcada como un positivo.
 40

Cepa	<i>Vibrio harveyi</i>
NRRL B-50015	+
NRRL B-50016	+
NRRL B-50017	+
PTA-7542	+
PTA-7543	+
PTA-7544	+
PTA-7545	+
PTA-7546	+
PTA-7547	+
PTA-7548	+
PTA-7749	+
PTA-7793	+
PTA-7790	+
PTA-7791	+

Ejemplo 12Zona de inhibición de *Vibrio alginolyticus* en Placa Petri

5 [0102] Candidatos de *Bacillus* fueron crecidos en el caldo nutritivo (3 g/L extracto carne bovina, 5 g/L peptona) a 35°C durante 18-24 horas. *V. alginolyticus* ATCC 17749 fue crecido en el caldo nutritivo con 1,5% NaCl adicionado a 28°C durante 18-24 horas. Agar nutritivo (1,5% agar) con 1,5% NaCl fue sometido a autoclave en alícuotas de 25 mL y 250 microL de cultivo de *Vibrio* durante toda la noche se añadió a cada alícuota de agar fundido dando como resultado

10 aproximadamente 1×10^6 ufc/mL de *Vibrio* en el agar. Después de que el agar solidificara, 4 agujeros fueron perforados en cada placa utilizando una pieza de tubería de acero inoxidable esterilizada. 50 microL de cada cultivo de *Bacillus* durante toda la noche a cada pocillo. Las placas fueron incubadas con el lado de agar abajo a 28°C durante 18-24 horas. Las zonas de tamiz de *Vibrio* inhibido fueron medidas. Inhibición discernible > 0.5 mm fue marcada como un positivo.

Cepa	<i>Vibrio alginolyticus</i>
NRRL B-50015	+
NRRL B-50016	+
NRRL B-50017	+
PTA-7541	+
PTA-7592	+

(continuación)

PTA-7542	+
PTA-7543	+
PTA-7544	+
PTA-7545	+
PTA-7546	+
PTA-7747	+
PTA-7748	+
PTA-7749	+
PTA-7793	+
PTA-7790	+
PTA-7791	+

15

Ejemplo 13Zona de inhibición de *Vibrio fischerii* en Placa Petri

20 [0103] Candidatos de *Bacillus* fueron crecidos en el caldo nutritivo (3 g/L extracto de carne bovina, 5 g/L peptona) a 35°C durante 18-24 horas. *V. fischerii* fue crecido en el caldo nutritivo con 1,5% NaCl adicionado a 28°C durante 18-24 horas. Agar nutritivo (1,5% agar) con 1,5% NaCl fue sometido a autoclave en alícuotas de 25 mL y 250 microL de cultivo de *Vibrio* durante toda la noche se añadieron a cada alícuota de agar fundido dando como resultado aproximadamente 1×10^6 ufc/mL

25 *Vibrio* en el agar. Después de que el agar solidificara, 4 agujeros fueron perforados en cada placa utilizando una pieza de tubería de acero inoxidable esterilizada. 50 microL de cada cultivo de *Bacillus* durante toda la noche fue transferido a cada pocillo. Las placas fueron incubadas con el lado de agar abajo a 28°C durante 18-24 horas. Las zonas de tamiz de *Vibrio* inhibido fueron medidas. Inhibición discernible > 0.5 mm fue marcada como un positivo.

Cepa	<i>Vibrio fischerii</i>
PTA-7543	+
PTA-7545	+
PTA-7546	+
PTA-7547	+
PTA-7548	+
PTA-7793	+
PTA-7790	+
PTA-7791	+

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para evitar o reducir la proliferación de microorganismos en solución acuosa, que comprende someter dichos microorganismos en solución acuosa a una o más cepas de bacterias seleccionadas del grupo que consiste en:
- la cepa con el número de acceso de depósito NRRL B-50017;
la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7541;
10 la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7542;
la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7543;
la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7544;
la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7545;
la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7546;
15 la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7549;
la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7791;
la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7792;
la cepa con el número de acceso de depósito PTA-7793 o una mezcla de dos o más de las cepas.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, donde la proliferación está provocada por uno o más microorganismos no deseados, preferiblemente bacterias, tales como bacterias patógenas.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el método se repite periódicamente.
- 25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde además están presentes uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en enzimas, dispersantes, surfactantes, agentes antimicrobianos, y biocidas.

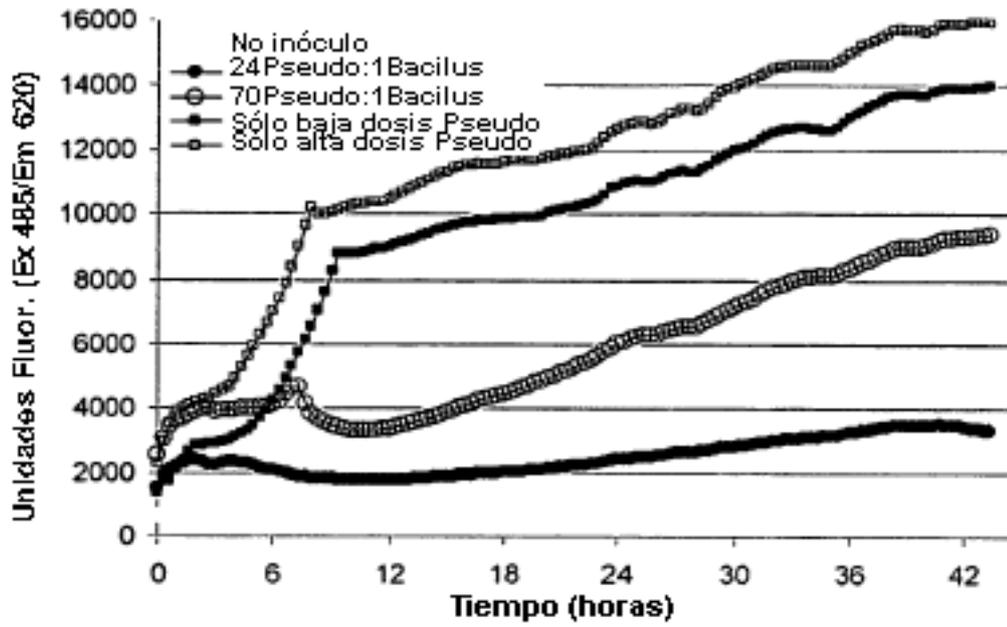


Fig. 1

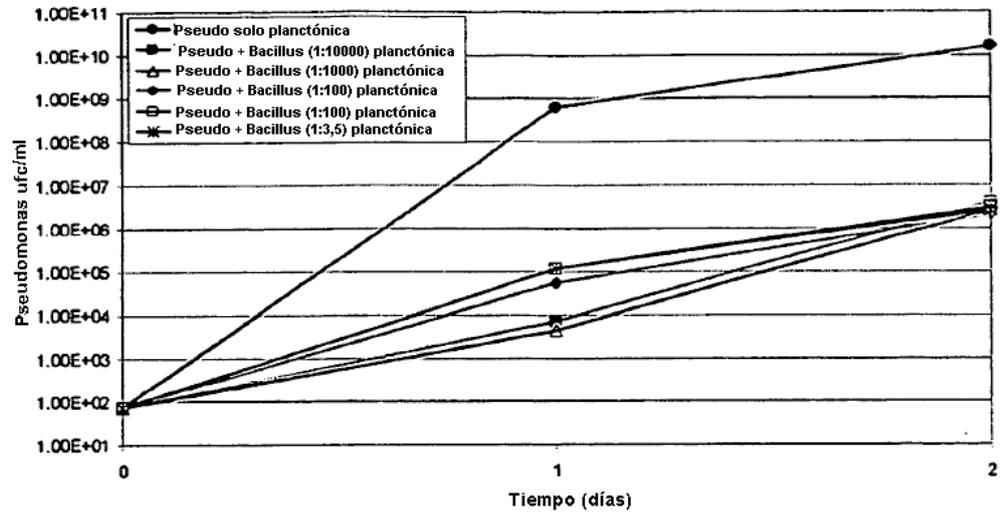


Fig. 2

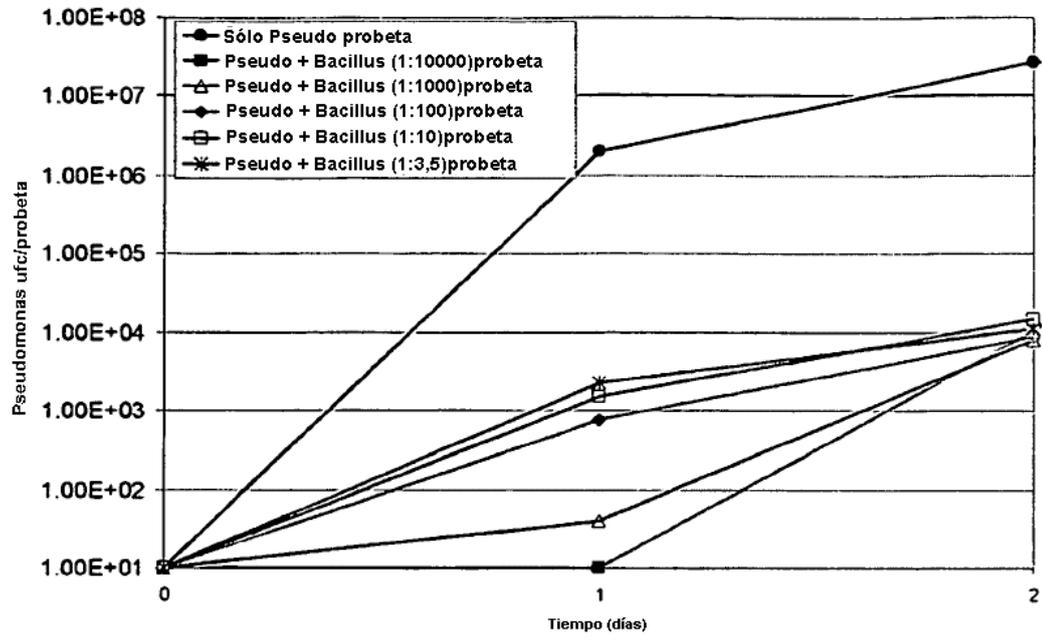


Fig. 3