

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092555** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.04.08

(22) Дата подачи заявки
2019.05.08

(51) Int. Cl. *C09K 17/14* (2006.01)
C05F 11/08 (2006.01)
C05G 3/00 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
C09K 101/00 (2006.01)

(54) **ПРОДУКТЫ НА ОСНОВЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ УКРЕПЛЕНИЯ КОРНЕЙ РАСТЕНИЙ И ЗДОРОВОГО ИММУНИТЕТА**

(31) **62/668,316; 62/719,758**

(32) **2018.05.08; 2018.08.20**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/031308**

(87) **WO 2019/217548 2019.11.14**

(71) Заявитель:
**ЛОКУС АГРИКАЛЧЕ АйПи
КОМПАНИ, ЛЛК (US)**

(72) Изобретатель:

**Цорнер Пол С., Фармер Шон, Алибек
Кен, Ибрагимова Самал (US)**

(74) Представитель:

**Хмара М.В., Осипов К.В., Пантелеев
А.С., Ильмер Е.Г., Дощечкина В.В.,
Липатова И.И., Новоселова С.В. (RU)**

(57) Изобретением предоставлены композиции и способы для улучшения иммунитета, здоровья, роста и урожайности растений посредством применения комбинации микроорганизмов и/или продуктов, выделяемых ими при росте. В частности, настоящее изобретение позволяет улучшать здоровье, рост и/или урожайность растений посредством применения комбинации грибка *Trichoderma* spp. и бактерии *Bacillus* spp. В частности, в одном из примеров осуществления настоящего изобретения применяют *Trichoderma harzianum* и *Bacillus amyloliquefaciens*.

A1

202092555

202092555

A1

ПРОДУКТЫ НА ОСНОВЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ УКРЕПЛЕНИЯ КОРНЕЙ РАСТЕНИЙ И ЗДОРОВОГО ИММУНИТЕТА

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка претендует на приоритет предварительной патентной
5 заявки US 62/668316, поданной 8 мая 2018 г., и предварительной патентной заявки
US 62/719758, поданной 20 августа 2018 г., содержание каждой из которых
полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Некоторые общие проблемы сельского хозяйства все еще продолжают
10 препятствовать способности сельхозпроизводителей получать максимальные
выходы продукции при сохранении невысоких затрат. Такие проблемы включают,
без ограничений, инфекции и заражения, вызываемые бактериями, грибами,
нематодами и другими вредителями и патогенами; высокую стоимость химических
удобрений и гербицидов, а также их влияние на окружающую среду и здоровье; и
15 затруднения, испытываемые растениями при поглощении питательных веществ и
воды из почв различных типов.

Например, у производителей цитрусовых вызывает значительные проблемы
широко распространенная инфекция цитрусовых растений, вызываемая патогенами,
приводящая к развитию позеленения цитрусовых и рака цитрусовых. Из-за таких
20 бактериальных инфекций гибнут целые сельскохозяйственные угодья, что приводило
к снижению производства и повышению цен на цитрусовую продукцию по всему
миру.

Позеленение цитрусовых, которое также известно как болезнь Huanglongbing
(сокр. HLB) или болезнь желтого дракона, является неизлечимой инфекцией,
25 вызываемой грамотрицательной бактерией *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Это
заболевание вызывает опустошение миллионов акров культур цитрусовых в
Соединенных Штатах и других частях мира. На инфицированных деревьях
вырастают горькие зеленые фрукты неправильной формы, непригодные для
продажи. Это заболевание распространяется инфицированным насекомым,
30 азиатской листоволшкой цитрусовых, которая серьезно угрожает будущему всех
цитрусовых деревьев мира.

Болезнь HLB развивается в лубяной ткани или сосудистой системе растения, которая транспортирует сахара ко всем частям дерева, и нарушает функционирование этой системы. Таким образом, *Liberibacter* может передвигаться и размножаться во всем дереве, включая корни. До того как симптомы проявляются в листе, инфекция обычно уже вызывает значительные повреждения в корневой системе, приводя к потере от 30 до 50% плотности корневых волокон.

По мере развития симптомов в кроне, корневая плотность продолжает постепенно снижаться. Вероятно, это объясняется закупориванием лубяной ткани, что затрудняет движение сахаров к корневой системе. Потеря значительной части корней сильно понижает здоровый иммунитет дерева, а также его способность эффективно поглощать питательные вещества и выдерживать дефицит воды во время продолжительных периодов засухи. Таким образом, одной из наиболее важных характеристик здоровых сельскохозяйственных культур является здоровая прикорневая зона (ризосфера).

Ризосфера представляет собой зону почвы, в которой развивается корневая система растения и из которой она поглощает воду и питательные вещества. Для ведения в почвы определенных питательных веществ многие производители в основном полагаются на применение синтетических химических веществ и химических удобрений, предназначенных для повышения урожаев сельскохозяйственных культур и защиты сельскохозяйственных культур от засухи и болезней. Однако при сниженной усваивающей способности, когда, например, корневая система растения повреждена в результате заболевания, добавление в почву большего количества воды и/или питательных веществ может не приводить к повышенной абсорбции корневой системы. Напротив, все, что добавляют, будет уходить через ризосферу в почвенные воды. Поскольку добавляемые вещества являются источниками загрязнения окружающей среды, их ответственное использование является важной экологической и коммерческой задачей. Слишком сильная зависимость и длительное применение определенных химических удобрений, пестицидов и антибиотиков оказывает разрушительное влияние на экосистемы почв, снижает их стрессоустойчивость, повышает популяцию устойчивых вредителей и замедляет рост и жизнеспособность растений.

Эффективная абсорбция питательных веществ и воды в ризосфере зависит не только от количества присутствующей в ней воды и питательных веществ, но и от типа конкретного микробиома, существующего в почве. Почвы содержат

миллиарды различных микроорганизмов, сосуществующих друг с другом и с растениями, образуя сложную сеть симбиотических взаимоотношений.

5 Оптимальная комбинация микроорганизмов в ризосфере зависит от типа растения, а также от типа почвы, в которой оно растет. Два растения, относящиеся к
разным видам или произрастающие в разных регионах, не могут иметь одинаковую
сеть микроорганизмов в ризосфере. Таким образом, несмотря на то, что
биологические средства потенциально могут играть важную роль в поддержании
здоровья сельскохозяйственных культур и рекультивации почв, обработка широкого
10 спектра видов растений во множестве различных регионов затруднительна ввиду
сложности и специфичности оптимального микробиома ризосферы каждого
растения.

 Экономические затраты и негативное влияние на здоровье и окружающую
среду, связанные с существующими способами производства сельскохозяйственных
культур, все еще препятствуют рациональному производству продуктов
15 потребления, получаемых на основе сельскохозяйственных культур. Таким образом,
имеется необходимость создания усовершенствованных, нетоксичных и
экологически безопасных способов повышения производительности
сельскохозяйственных культур при сохранении низкой стоимости.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

20 Настоящее изобретение относится к продуктам на основе микроорганизмов,
а также к способам применения продуктов на основе микроорганизмов в сельском
хозяйстве. Предпочтительно продукты на основе микроорганизмов и способы
согласно настоящему изобретению экологически безопасны, нетоксичны и
экономичны.

25 Предпочтительные примеры осуществления настоящего изобретения
относятся к полученным на основе микроорганизмов композициям для обработки
почвы и к способам их применения для улучшения здоровья, роста и общей
урожайности сельскохозяйственных растений за счет, например, улучшения
способности ризосферы к удержанию питательных веществ и влаги.
30 Предпочтительно композиции для обработки почвы согласно настоящему
изобретению могут улучшать, например, здоровье сельскохозяйственной культуры,
а также рост и урожаи сельскохозяйственной культуры, даже в тех ситуациях, в
которых одно или более растений сельскохозяйственной культуры инфицированы

патогеном или иным образом ухудшен здоровый иммунитет сельскохозяйственных растений.

Например, один из примеров осуществления настоящего изобретения может быть применен для улучшения здоровья, роста и урожаев цитрусовых растений, инфицированных, например, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (пожелтение цитрусовых) и/или *Xanthomonas axonopodis* (рак цитрусовых).

Один из примеров осуществления настоящего изобретения относится к композициям для обработки почвы, включающим комбинацию микроорганизмов и/или побочных продуктов, выделяемых ими при росте. Также изобретение относится к способам культивирования микроорганизмов и/или получению побочных продуктов, выделяемых ими при росте, включаемых в композицию для обработки почвы.

В одном из примеров осуществления композиция для обработки почвы включает первый микроорганизм и второй микроорганизм. В частности, первый микроорганизм представляет собой конидийобразующий (т.е. образующий споры) непатогенный грибковый штамм и второй микроорганизм представляет собой образующий споры непатогенный бактериальный штамм. Предпочтительно композиция включает грибок *Trichoderma spp.* и бактерию *Bacillus spp.*, однако изобретение включает и другие комбинации. В одном из конкретных примеров осуществления композиция включает *Trichoderma harzianum* и *Bacillus amyloliquefaciens*.

В одном из примеров осуществления композиция может включать от 1 до 99% об. *Trichoderma* и от 99 до 1% об. *Bacillus*. В предпочтительных примерах осуществления отношение численностей клеток *Trichoderma* к *Bacillus* составляет приблизительно 1:4.

В одном из примеров осуществления композиция может дополнительно включать один или более дополнительных полезных микроорганизмов, таких как, например, азотфиксаторы (например, *Azotobacter vinelandii*), мобилизаторы калия (например, *Frateuria aurantia*) и другие микроорганизмы, примеры которых включают *Mycococcus xanthus*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Starmerella bombicola*, *Saccharomyces boulardii*, *Pichia occidentalis*, *Pichia kudriavzevii* и/или *Meyerozyma guilliermondii*.

Виды и соотношения микроорганизмов и других ингредиентов в композиции могут быть определены в зависимости от, например, типа обрабатываемого растения, типа почвы, в которой произрастает растение, здоровья растения в момент обработки, а также других факторов. Таким образом, композиция может
5 быть адаптирована для любой заданной сельскохозяйственной культуры.

Микроорганизмы, содержащиеся в композициях для обработки почвы согласно изобретению, могут быть получены способами культивирования, которые могут быть проведены в любом масштабе от малого до большого. Способы культивирования включают, без ограничений, глубинное
10 культивирование/ферментацию, твердофазную ферментацию (англ. solid state fermentation, сокр. SSF), а также модификации, гибридные способы и/или комбинации перечисленных способов. В предпочтительных примерах осуществления микроорганизмы культивируют способом SSF или его модификациями.

Композиция для обработки почвы может включать субстрат, оставшийся после ферментации, и/или выделяемые при росте очищенные или неочищенные побочные продукты, такие как биологические поверхностно-активные вещества, ферменты и/или другие метаболиты. Микроорганизмы могут быть живыми или инактивированными, но в предпочтительных примерах осуществления
15 микроорганизмы являются живыми.
20

Композицию предпочтительно готовят для внесения в почву, нанесения на семена, целые растения или части растений (включая, без ограничений, корни, клубни, стебли, цветки и листья). В некоторых примерах осуществления композицию приготавливают в виде, например, жидкости, мелкодисперсного порошка, гранул, микрогранул, гранул неправильной формы, смачиваемого порошка, текучего
25 порошка, эмульсий, микрокапсул, масел или аэрозолей.

Для улучшения или стабилизации действия композиции, она может быть смешана с подходящими вспомогательными веществами и затем применена как таковая или, при необходимости, после разбавления. В некоторых примерах
30 осуществления композицию получают в виде концентрированного жидкого препарата или в виде сухого порошка или сухих гранул, которые могут быть смешаны с водой и другими компонентами с образованием жидкого продукта. В одном из примеров осуществления композиция включает субстрат, микроорганизмы

и продукты, выделяемые ими при росте, смешанные друг с другом и высушенные с образованием порошка или гранул.

5 В одном из примеров осуществления композиция может включать глюкозу (например, в виде патоки), глицерол, глицерин и/или другие влияющие на осмотическое давление вещества, предназначенные для создания осмотического давления во время хранения и транспортировки сухого продукта.

10 Один из примеров осуществления относится к способам улучшения здоровья, роста и урожайности растений, в которых комбинацию микроорганизмов вводят в контакт с растением и/или с окружающей его средой. Способ может включать контакт композиции для обработки почвы согласно настоящему изобретению, включающей первый микроорганизм и второй микроорганизм и/или побочный продукт, выделяемый при росте одного или обоих этих микроорганизмов, с растением и/или с окружающей его средой. Предпочтительно первый микроорганизм представляет собой грибок *Trichoderma spp.*, а второй микроорганизм представляет собой бактерию *Bacillus spp.*

В некоторых примерах осуществления микроорганизмы, содержащиеся композиции, совместно создают синергический эффект, усиливающий здоровье, рост и/или урожай растений.

20 В одном из примеров осуществления способ позволяет улучшать здоровье, рост и/или урожай растений за счет усиления здоровья и роста корней. В частности, в одном из примеров осуществления способы могут быть применены для улучшения свойств ризосферы, в которой растут корни растения, например, способности к удержанию питательных веществ и/или влаги.

25 Дополнительно, в одном из примеров осуществления способ может быть применен для инокуляции ризосферы растения одним или более полезными микроорганизмами. Например, в предпочтительных примерах осуществления микроорганизмы композиции для обработки почвы могут колонизировать ризосферу и принести большую пользу растению, корни которого в ней растут, включая защиту и обеспечение питания.

30 Предпочтительно в некоторых примерах осуществления способы согласно изобретению могут быть применены для улучшения здоровья, роста и/или урожайности растений, здоровый иммунитет которых был снижен в результате инфицирования патогеном или в результате действия фактора экологического

стресса, такого как, например, засуха. Таким образом, в некоторых примерах осуществления способы согласно изобретению также могут быть применены для повышения здорового иммунитета или иммунной реакции растений.

5 В некоторых примерах осуществления композицию для обработки почвы вводят в контакт с частью растения. В одном из конкретных примеров осуществления композицию вводят в контакт с одним или более корнями растения. Композиция может быть нанесена непосредственно на корни, например, распылением или погружением корней, и/или опосредованно, например, внесением композиции в почву, в которой произрастает растение (например, в ризосферу).
10 Композиция может быть нанесена на семена растения до или во время посадки или на любую другую часть растения и/или в окружающую его среду.

Композиции и способы согласно настоящему изобретению могут быть применены по отдельности или в комбинации с другими соединениями и/или способами для эффективного улучшения здоровья, роста и урожайности растений и/или для поддержания роста первого и второго микроорганизмов. Например, в
15 одном из примеров осуществления композиция может включать и/или может быть применена одновременно с питательными веществами и/или питательными микроэлементами для улучшения роста растения и/или микроорганизма, такими как магний, фосфат, азот, калий, селен, кальций, сера, железо, медь и цинк, и/или с
20 одним или более пребиотиками, такими как экстракт ламинарии, фульвовая кислота, хитин, гумат и/или гуминовая кислота. Точный перечень материалов и их количеств может быть определен производителем или ученым-агрономом после прочтения настоящего описания.

Композиции и способы также могут быть применены в комбинации с другими
25 системами ухода за сельскохозяйственными культурами. В одном из примеров осуществления композиция необязательно может включать или быть внесена (нанесена) совместно с природными и/или химическими пестицидами и/или репеллентами, такими как, например, любой известный коммерчески доступный пестицид и/или пестицид собственного производства, совместимый с комбинацией
30 вносимых микроорганизмов. В некоторых примерах осуществления композиция также может включать или быть внесена (нанесена) совместно, например, с гербицидами, удобрениями и/или другими совместимыми почвоулучшителями, включающими коммерчески доступные продукты, содержащие источники

питательных веществ (например, азот-фосфор-калий (NPK) и/или питательные микроэлементы).

Предпочтительно, настоящее изобретение может быть воплощено без высвобождения больших количеств неорганических соединений в окружающую среду. Дополнительно, в композициях и способах применяют биоразлагаемые и токсикологически безопасные компоненты. Таким образом, настоящее изобретение может быть применено для “зеленой” обработки почвы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1A-1B показана масса сухого вещества корней (г) апельсиновых деревьев, выращиваемых в Ft. Basinger, Флорида (A), и грейпфрутовых деревьев, выращиваемых в Ft. Pierce, Флорида (B), обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения (“Rhizolizer™”), в сравнении с тем же показателем необработанных контрольных растений (стандартная практика производителей).

На Фиг. 2 показана масса сухого вещества корней (г) грейпфрутовых деревьев, выращиваемых в St. Lucie County, Флорида, обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения (“Rhizolizer™”), в сравнении с тем же показателем необработанных контрольных растений (стандартная практика производителей).

На Фиг. 3A-3B показана масса сухого вещества корней апельсиновых деревьев Hamlin, выращиваемых в Highlands County, Флорида (A), и белых грейпфрутов, выращиваемых в St. Lucie County, Флорида (B), обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения (“Rhizolizer™”), в сравнении с тем же показателем необработанных контрольных растений (стандартная практика производителей).

На Фиг. 4A-4B показана средняя масса корней апельсиновых деревьев Hamlin, выращиваемых в Polk County, Флорида (A), и апельсиновых деревьев Valencia, выращиваемых в Collier County, Флорида (B), обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения (“Rhizolizer™”), в сравнении с тем же показателем необработанных контрольных растений (стандартная практика производителей).

На Фиг. 5А-5В показан процент роста новых побегов (А) и среднее количество побегов (В) у молодых апельсиновых деревьев Valencia, выращиваемых в Highlands County, Флорида, обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), в сравнении с теми же показателями необработанных контрольных растений (стандартная практика производителей).

На Фиг. 6А-6В показано увеличение плотности кроны у взрослых апельсиновых деревьев Hamlin (А) и молодых апельсиновых деревьев Hamlin (В), выращиваемых в Highlands County, Флорида, обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), в сравнении с тем же показателем необработанных контрольных растений (стандартная практика производителей).

На Фиг. 7 показано среднее изменение диаметра ствола у молодых апельсиновых деревьев Valencia, выращиваемых в Highlands County, Флорида, обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), в сравнении с тем же показателем необработанных контрольных растений (стандартная практика производителей).

На Фиг. 8А-8В показана масса плода белых грейпфрутов (А) и диаметр красных грейпфрутов Ruby (В), выращиваемых в Charlotte County, Флорида, обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), в сравнении с теми же показателями необработанных контрольных растений (стандартная практика производителей).

На Фиг. 9А-9В показан градус по шкале Брикса, измеренный для белых грейпфрутов, выращиваемых в Lucie County, Флорида (А) и в Charlotte County, Флорида (В), обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), в сравнении с тем же показателем необработанных контрольных растений (стандартная практика производителей).

На Фиг. 10А-10В показана масса весовых коробок апельсинов Hamlin, выращиваемых в Lake County, Флорида, обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения

("Rhizolizer™"), в сравнении с тем же показателем необработанных контрольных растений (стандартная практика производителей).

5 На Фиг. 11A-11B показан выраженный в фунтах твердого вещества общий собранный урожай апельсинов Hamlin, выращенных в Lake County, Флорида, обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), в сравнении с тем же показателем необработанных контрольных растений (стандартная практика производителей).

10 На Фиг. 12A-12B показан выраженный в фунтах твердого вещества общий собранный урожай на одну коробку (A) и на один акр (B) апельсинов Hamlin, выращенных в Polk County, Флорида, обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), в сравнении с теми же показателями необработанных контрольных растений (стандартная практика производителей).

15 На Фиг. 13A-13B показаны урожаи плодов (тонн/акр, по оси y) томатов, обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), в сравнении с необработанной контрольной группой, обработкой коммерческим контролем, обработкой *T. harzianum* и *B. amyloliquefaciens* в комбинации с картофельным
20 экстрактом, обработкой *T. harzianum* и *B. amyloliquefaciens* в комбинации с гуматом и патокой и обработкой Terra Treat. Столбиками представлен урожай красных плодов (подходящих для сбора плодов), и черными ромбами показан общий урожай плодов для каждой обработки (A). Отдельное сравнение урожаев подходящих для сбора плодов группы необработанного контроля и группы, обработанной Rhizolizer™-
25 ламинарией, представлено позицией (B).

На Фиг. 14A-14B показано увеличение общих урожаев подходящих для продажи плодов (мТ на один акр) (A) и градус по шкале Брикса (B) для томатов, выращенных в Fresno County, California, обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения
30 ("Rhizolizer™"), в сравнении с теми же показателями необработанных контрольных растений (стандартная практика производителей).

На Фиг. 15A-15B показана масса сухого вещества корней (г) томатов, обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров

осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), в сравнении с необработанной контрольной группой растений (стандартная практика производителей). На Фиг. 15В показаны корни томатов, полученные из растений томатов. Корни обработанного растения (правое изображение) были визуаль-
5 плотнее корней растения, обработанного в соответствии с практикой производителей (левое изображение).

На Фиг. 16А-16В показаны результаты измерений диаметра ствола миндальных деревьев, обработанных композицией согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения. На Фиг. 16А показано общее изменение
10 роста стволов миндальных деревьев (диаметр, мм), в котором после 6-ой обработки (Rhizolizer™) получали изменение диаметра ствола, составляющее 1,25 мм. В необработанной контрольной группе увеличение диаметра ствола составило лишь 0,96 мм. На Фиг. 16В показан рост в течение некоторого времени ствола деревьев, обработанных Rhizolizer™.

На Фиг. 17 показано начальное цветение/завязывание орехов на миндальных деревьях, выращиваемых в San Joaquin County, Калифорния, обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), в сравнении с тем же показателем
15 необработанных контрольных растений (стандартная практика производителей).

На Фиг. 18А-18F показаны данные сравнения увеличения массы корней (А, В), увеличения количества цветков (С), увеличения количества плодов (D), количество арбузов и урожай с одного акра (Е), а также масса плода и градус по шкале Брикса (F) арбузов, обработанных композицией согласно одному из примеров
20 осуществления настоящего изобретения, в сравнении с показателями необработанных растений, выращенных согласно стандартной практике производителей.

На Фиг. 19А-19В показаны данные сравнения количества цветков (А) и среднего урожая подходящих для сбора плодов (19В) мускусной дыни, обработанной композицией согласно одному из примеров осуществления
30 настоящего изобретения в сравнении с показателями необработанных растений, выращенных согласно стандартной практике производителей.

На Фиг. 20А-20В показана всхожесть растений картофеля сорта Yellow Rose Russet, выращиваемого в Imperial County, Калифорния, спустя 5 недель после

5 посадки (А), и гибридных сортов, спустя 6 недель после посадки (В). Картофель был обработан композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), и его показатели сравнивали с аналогичными показателями необработанных контрольных растений (стандартная практика производителей).

10 На Фиг. 21А-21В показан урожай корнеплодов картофеля сорта Reveille Russet Fresh Market Baking, выращиваемого в Hartley County, Техас (А), и картофеля сорта Russet Burbank, выращиваемого в Walworth County, Висконсин (В). Картофель был обработан композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), и его показатели сравнивали с аналогичными показателями необработанных контрольных растений (стандартная практика производителей).

15 На Фиг. 22А-22В показано качество урожая картофеля сорта Russet Burbank (А) и урожая картофеля сорта Colomba (В). Картофель был обработан композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), и его показатели сравнивали с аналогичными показателями необработанных контрольных растений (стандартная практика производителей).

20 На Фиг. 23А-23С показано увеличение размера плодов клубники, обработанной композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), в сравнении с необработанной контрольной группой растений (стандартная практика производителей). Определяли диаметр плода (А-В) и массу плода (С).

25 На Фиг. 24 показано повышение величины градуса по шкале Брикса плодов клубники, обработанной композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), в сравнении с плодами необработанной контрольной группы растений (стандартная практика производителей).

30 На Фиг. 25 показано увеличение ширины кроны кустов клубники, обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), в сравнении с растениями необработанной контрольной группы (стандартная практика производителей).

На Фиг. 26 показано увеличение массы корней кустов клубники, обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("RhizolizerTM"), в сравнении с растениями необработанной контрольной группой (стандартная практика производителей).

5 На Фиг. 27 показано увеличение количества плодов кустов клубники, обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("RhizolizerTM"), в сравнении с растениями необработанной контрольной группы (стандартная практика производителей).

10 На Фиг. 28A-28B показано увеличение урожая клубники в середине сезона. Определяли среднее количество корзин на акр (A) и общее количество корзин (B). Клубника была обработана композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("RhizolizerTM"), и ее показатели сравнивали с аналогичными показателями необработанных контрольных растений (стандартная практика производителей).

15 На Фиг. 29 показано увеличение массы корней растений кукурузы, обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("RhizolizerTM"), либо один раз при посадке и один раз в середине сезона, либо дважды (один раз при посадке и один раз в середине сезона). Три обрабатываемые группы сравнивали с растениями
20 необработанной контрольной группы (стандартная практика производителей).

На Фиг. 30 показано увеличение жизненного тонуса растений кукурузы, обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("RhizolizerTM"), либо один раз при посадке и один раз в середине сезона, либо дважды (один раз при посадке и один раз в
25 середине сезона). Три обрабатываемые группы сравнивали с растениями необработанной контрольной группы (стандартная практика производителей).

На Фиг. 31 показано увеличение урожая растений кукурузы, обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("RhizolizerTM"), либо один раз при посадке и один раз в
30 середине сезона, либо дважды (один раз при посадке и один раз в середине сезона). Три обрабатываемые группы сравнивали с растениями необработанной контрольной группы (стандартная практика производителей).

На Фиг. 32 показано увеличение расчетных урожаев двух групп растений хлопка, обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), в сравнении с растениями необработанной контрольной группы (стандартная практика производителей).

На Фиг. 33 показано увеличение среднего содержания хлорофилла (вверху слева), средней ширины листа (вверху справа) и средней длины листа (внизу) растений табака, обработанных композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), в сравнении с растениями необработанной контрольной группы (стандартная практика производителей).

На Фиг. 34 показано увеличение расчетного урожая арахиса, обработанного композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), в сравнении с растениями необработанной контрольной группы (стандартная практика производителей).

СВЕДЕНИЯ, ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ВОЗМОЖНОСТЬ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к продуктам, полученным на основе микроорганизмов, а также к способам применения продуктов, полученных на основе микроорганизмов в сельском хозяйстве. Предпочтительно, продукты на основе микроорганизмов и способы согласно настоящему изобретению экологически безопасны, нетоксичны и экономичны.

Предпочтительные примеры осуществления настоящего изобретения относятся к композициям для обработки почвы на основе микроорганизмов и к способам их применения для улучшения здоровья, роста и общей урожайности сельскохозяйственных растений за счет, например, улучшения способности ризосферы к удержанию питательных веществ и влаги. Предпочтительно композиции для обработки почвы согласно настоящему изобретению могут улучшать, например, здоровье сельскохозяйственной культуры, а также рост и урожайи сельскохозяйственной культуры, даже в тех ситуациях, в которых одно или более растений сельскохозяйственной культуры инфицированы патогеном или иным образом ухудшен здоровый иммунитет сельскохозяйственных растений.

Некоторые определения

Применяемые согласно настоящему изобретению “композиции на основе микроорганизмов” означают композиции, которые включают компоненты, которые были получены в результате роста микроорганизмов или других клеточных культур.

- 5 Таким образом, композиция на основе микроорганизмов может включать сами микроорганизмы и/или побочные продукты роста микроорганизмов. Микроорганизмы могут находиться в вегетативном состоянии, в виде спор или конидия, в виде гифы, в любой другой форме единицы размножения или в виде их смеси. Микроорганизмы могут иметь форму планктона или биопленки или их смеси.
- 10 Побочными продуктами роста могут быть, например, метаболиты, компоненты клеточных мембран, экспрессированные белки и/или другие клеточные компоненты. Микроорганизмы могут быть интактными или лизированными. В предпочтительных примерах осуществления микроорганизмы находятся, наряду со средой для выращивания, в которой они были выращены, в композиции на основе
- 15 микроорганизмов. Концентрация микроорганизмов может составлять, например, по меньшей мере 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} или 1×10^{13} или более КОЕ (колониеобразующих единиц, англ. colony forming unit, сокращенно CFU) на грамм или на мл композиции.

- Настоящее изобретение дополнительно относится к “продуктам на основе
- 20 микроорганизмов”, которые представляют собой продукты, которые должны быть применены на практике для достижения требуемого результата. Продукт на основе микроорганизмов может просто представлять собой композицию на основе микроорганизмов, собранных после культивирования микроорганизмов. В альтернативном варианте продукт на основе микроорганизмов может включать
- 25 дополнительные ингредиенты, которые в него добавляют. Дополнительные ингредиенты могут включать, например, стабилизаторы, буферы, подходящие носители, такие как вода, солевые растворы или любые другие подходящие носители, питательные вещества, добавляемые для дополнительного поддержания
- 30 роста микроорганизмов, непитательные усилители роста и/или агенты, позволяющие отслеживать нахождение микроорганизмов и/или композиции в окружающей среде, в которую они были внесены. Продукт на основе микроорганизмов также может включать смеси композиций на основе микроорганизмов. Продукт на основе микроорганизмов также может включать один или более компонентов композиции на основе микроорганизмов, которые были

подвергнуты какой-либо обработке, такой как, без ограничений, фильтрование, центрифугирование, лизирование, сушка, очистка и подобные операции.

5 Употребляемый в настоящей работе термин “собранный” в контексте ферментации композиции на основе микроорганизмов относится к извлечению некоторой части или всей композиции на основе микроорганизмов из емкости для выращивания.

10 Употребляемый в настоящей работе термин “биопленка” означает сложный агрегат из микроорганизмов, в котором клетки склеены друг с другом и/или с поверхностями. В некоторых примерах осуществления клетки секретируют полисахаридный барьер, который окружает весь агрегат. Клетки, содержащиеся в биопленках, физиологически отличны от планктонных клеток того же организма, которые представляют собой отдельные клетки, которые могут плавать на поверхности или внутри жидкостной среды.

15 Употребляемый в настоящей работе термин “выделенное” или “очищенное” соединение относится к соединению, по существу не содержащему других соединений, таких как клеточный материал, с которым оно связано в природе. Очищенный или выделенный полинуклеотид (рибонуклеиновая кислота (РНК) или дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)) не содержит генов или последовательностей, которые фланкируют его при нахождении его в природе. Очищенный или выделенный полипептид не содержит аминокислот или последовательностей, которые фланкируют его при нахождении его в природе. Употребляемый при описании штамма микроорганизма термин “выделенный (очищенный)” означает, что этот штамм извлечен из окружающей среды, в которой он находится в природе. Таким образом, выделенный штамм может существовать в 20 виде, например, биологически чистой культуры или в виде спор (или других форм штамма) в комбинации с носителем.

30 Употребляемый в настоящей работе термин “биологически чистая культура” относится к культуре, которая была выделена из материалов, с которыми она была связана в природе. В одном из предпочтительных примеров осуществления культура была выделена из всех других живых клеток. В других предпочтительных примерах осуществления биологически чистая культура имеет более предпочтительные характеристики по сравнению с культурой того же микроорганизма в том виде, в котором он существует в природе. Предпочтительной

характеристикой может быть, например, усиленное продуцирование одного или более побочных продуктов, выделяемых при росте.

В некоторых примерах осуществления очищенные соединения составляют по меньшей мере 60% масс. интересующего соединения. Предпочтительно препарат
5 содержит по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99%, масс. интересующего соединения. Например, очищенное соединение представляет собой соединение, которое по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 98%, 99% или 100% (масс.) состоит из требуемого соединения. Чистоту определяют любым подходящим
10 стандартным способом, например, способом колоночной хроматографии, тонкослойной хроматографии или высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Термин “метаболит” относится к любому веществу, производимому при метаболизме (например, к побочному продукту, выделяемому при росте), или к
15 веществу, участие которого в конкретном виде метаболического процесса необходимо. Примеры метаболитов включают, без ограничений, биологические поверхностно-активные вещества, биополимеры, ферменты, кислоты, растворители, спирты, белки, витамины, минералы, микроэлементы и аминокислоты.

20 Употребляемый в настоящей работе термин “модулировать” означает “вызывать изменения” (например, повышение или понижение).

Следует понимать, что цитируемые в настоящей работе диапазоны представляют собой сокращенные записи всех значений, находящихся в пределах
25 диапазона. Например, следует понимать, что диапазон от 1 до 20 включает любое число, комбинацию чисел или поддиапазон из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, а также все десятичные дроби, находящиеся между вышеуказанными целыми числами, такие как, например, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и 1,9. Что касается поддиапазонов, то они, в частности,
30 включают “вложенные частичные поддиапазоны”, начинающиеся от любого из конечных значений диапазона. Например, вложенный частичный поддиапазон такого примера, как диапазон от 1 до 50, может включать от 1 до 10, от 1 до 20, от 1 до 30 и от 1 до 40 в одном направлении или от 50 до 40, от 50 до 30, от 50 до 20 и от 50 до 10 в другом направлении.

Употребляемый в настоящей работе термин “снижать” относится к отрицательному изменению, а термин “повышать” относится к положительному изменению, каждое из которых составляет по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% или 100%.

- 5 Употребляемый в настоящей работе термин “эталонный” относится к стандартному или контрольному состоянию.

- 10 Употребляемый в настоящей работе термин “поверхностно-активное вещество” относится к соединению, которое снижает поверхностное натяжение (или межфазное натяжение) между двумя жидкостями или между жидкостью и твердым веществом. Поверхностно-активные вещества действуют как, например, моющие средства, смачивающие агенты, эмульгаторы, вспениватели и диспергирующие средства. “Биологическое поверхностно-активное вещество” представляет собой поверхностно-активное вещество, производимое живым организмом.

- 15 Употребляемый в настоящей работе термин “сельское хозяйство” означает культивирование и разведение растений, водорослей и/или грибов (грибков) для получения пищевых продуктов, волокон, биотоплива, медикаментов, косметических средств, пищевых добавок, для декоративных целей и других целей. Согласно настоящему изобретению, сельское хозяйство также может включать садоводство, ландшафтный дизайн, устройство садов, консервацию растений, плодоводство и
20 разведение декоративных древесных пород. Дополнительно в сельское хозяйство включены уход за почвой, ее мониторинг и сохранение.

- 25 Употребляемый в настоящей работе термин “улучшение” означает усовершенствование или повышение. Например, улучшенное здоровье растений означает повышение способности растения к росту и изобилию, которое включает
30 способность растения отражать атаки вредителей и/или заболевания и переживать воздействие факторов экологического стресса, таких как засуха и/или переувлажнение. Улучшенный рост растения означает увеличение размера и/или массы растения и/или повышение способности растения достигать требуемого размера и/или массы. Улучшенные урожаи означают увеличение количества, повышение качества (например, вкуса, текстуры) и/или размера конечного продукта, производимого растением.

Употребляемый в настоящей работе термин “предотвращать” или “предотвращение” ситуации или события означает отсрочку начала наступления,

ингибирование, подавление, предупреждение и/или минимизацию вероятности наступления, распространенности или прогрессирования ситуации или события. Предотвращение может необязательно включать неопределенное, абсолютное или полное предотвращение, что означает, что признак или симптом все же может
5 развиваться позднее. Предотвращение может включать снижение агрессивности при наступлении заболевания, состояния или нарушения и/или замедление прогрессирования состояния или нарушения до наступления более агрессивного состояния или нарушения.

Употребляемый в настоящей работе в отношении вредителя термин
10 “контроль” означает уничтожение, потерю дееспособности, иммобилизацию или снижение численности популяции вредителя или иное воздействие, делающее вредителя по существу неспособным нанести вред.

Употребляемый в настоящей работе термин “вредитель” относится к любому организму, отличному от человека, который оказывает на человека или сферу
15 деятельности человека деструктивное, разрушительное и/или пагубное влияние (например, на сельское хозяйство, садоводство). В некоторых, но не во всех случаях вредителем может быть патогенный организм. Вредители могут вызывать или переносить инфекции, заражения и/или болезни, или они могут просто питаться живой тканью или наносить другой физический вред живой ткани. Вредители могут
20 быть одноклеточными или многоклеточными организмами, примеры которых включают, без ограничений, вирусы, грибки, бактерии, паразиты и/или нематоды.

Употребляемый в настоящей работе термин “почвоулучшитель” или “вспомогательное вещество для почв” означает любое соединение, материал или комбинацию соединений или материалов, которую добавляют в почву для
25 улучшения физического свойства почвы. Почвоулучшители могут включать органические и неорганические вещества и могут дополнительно включать, например, удобрения, пестициды и/или гербициды. Для роста и здоровья растений необходимы богатые питательными веществами, хорошо дренированные почвы, и, таким образом, для улучшения роста и здоровья растений могут быть применены
30 почвоулучшители, которые изменяют содержание питательных веществ и влаги в почве. Почвоулучшители также могут быть применены для улучшения множества различных качеств почвы, примеры которых включают, без ограничений, структуру почвы (например, предотвращение слеживания); для повышения концентрации

питательных веществ и способности к хранению; для улучшения удержания воды в сухих почвах; и для улучшения дренажа переувлажненных (заболоченных) почв.

Употребляемый в настоящей работе термин “фактор экологического стресса” означает абиотическое или неживое состояние, которое оказывает отрицательное
5 воздействие на живой организм в определенной окружающей среде. Фактор экологического стресса должен оказывать на окружающую среду влияние, выходящее за пределы ее нормального диапазона вариаций, тем самым оказывая значительное негативное влияние на жизнедеятельность популяции или физиологию индивидуального организма. Примеры факторов экологического
10 стресса включают, без ограничений, засуху, экстремальные температуры, наводнение, сильные ветра, природные катастрофы, изменения рН почвы, высокую радиацию, уплотнение почвы, промышленные выбросы и другие факторы.

Переходный термин “включающий”, который является синонимом термину “содержащий”, имеет неограничивающее или открытое значение и не исключает
15 наличия дополнительных, неуказанных элементов или этапов способа. Напротив, переходная фраза “состоящий из” исключает любой элемент, этап или ингредиент, не указанный в пункте формулы изобретения. Переходная фраза “по существу состоящий из” ограничивает объем пункта формулы изобретения указанными материалами или этапами “и объектами, которые не оказывают существенного
20 влияния на основную и новую характеристику (характеристики)” заявляемого изобретения. Употребление термина “включающий” предусматривает наличие примеров осуществления, которые “состоят” или “по существу состоят из” указанного компонента (компонентов).

Если четко не указано иное или иное не следует из контекста,
25 употребляемый в настоящей работе термин “или” рассматривается как включающий. Если четко не указано иное или иное не следует из контекста, употребляемая в настоящей работе форма единственного числа включает множественное число.

Если четко не указано иное или иное не следует из контекста,
30 употребляемый в настоящей работе термин “приблизительно” включен в диапазон нормального допуска, известного в данной области техники, например, в величину, составляющую 2 стандартных отклонения от среднего. “Приблизительно” может находиться в диапазоне 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% или 0,01% от указанного значения.

Упоминание в настоящей работе перечня химических групп в любом определении переменной величины включает определения этой переменной величины с каждой из указанных групп или с комбинацией перечисленных групп. Упоминание в настоящей работе примера осуществления или аспекта переменной величины включает этот пример осуществления как единственный пример осуществления или в комбинации с любыми другими примерами осуществления или их частями.

Содержание каждого из цитируемых в настоящей работе документов полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

10 Композиции для обработки почвы

Один из примеров осуществления настоящего изобретения относится к композициям для обработки почвы, включающим комбинацию микроорганизмов и/или побочных продуктов, выделяемых ими при росте. Композиция для обработки почвы может быть применена для улучшения здоровья, роста и/или урожайности растений, и в некоторых примерах осуществления, даже если растения были инфицированы патогеном или заболеванием. В частности, композиции согласно изобретению могут быть применены для улучшения роста и здоровья корней и/или для повышения здорового иммунитета растения. В некоторых примерах осуществления композиция для обработки почвы также может быть применена для инокуляции корней растений одним или более полезными микроорганизмами.

Предпочтительно, композиции на основе микроорганизмов согласно настоящему изобретению нетоксичны и могут быть нанесены в высоких концентрациях, что не приводит к возникновению раздражения, например, кожи или пищеварительного тракта человека или другого не являющегося вредителем животного. Таким образом, настоящее изобретение особенно подходит в тех случаях, когда композиции на основе микроорганизмов применяют в присутствии живых организмов, таких как обслуживающий персонал предприятия и сельскохозяйственные животные.

В одном из примеров осуществления композиция для обработки почвы может включать первый микроорганизм, который предпочтительно представляет собой конидийобразующий (образующий споры) грибковый штамм, и второй микроорганизм, который предпочтительно представляет собой образующий споры бактериальный штамм. Предпочтительно, первый микроорганизм представляет

собой грибок *Trichoderma* spp., а второй микроорганизм представляет собой образующую споры бактерию *Bacillus* spp., однако изобретение включает и другие комбинации. В некоторых примерах осуществления композиция включает *Trichoderma harzianum* и *Bacillus amyloliquefaciens*. В одном из конкретных примеров осуществления штамм *B. amyloliquefaciens* представляет собой *B. amyloliquefaciens* subsp. *locus*.

В одном из примеров осуществления композиция может включать от 1 до 99% масс. *Trichoderma* и от 99 до 1% масс. *Bacillus*. В некоторых примерах осуществления отношение численности клеток *Trichoderma* к численности клеток *Bacillus* составляет приблизительно от 1:9 до приблизительно 9:1, приблизительно от 1:8 до приблизительно 8:1, приблизительно от 1:7 до приблизительно 7:1, приблизительно от 1:6 до приблизительно 6:1, приблизительно от 1:5 до приблизительно 5:1 или приблизительно от 1:4 до приблизительно 4:1.

В одном из примеров осуществления микроорганизмы композиции согласно изобретению составляют приблизительно от 5 до 20% масс. от общей массы композиции или приблизительно от 8 до 15% или приблизительно от 10 до 12%. В одном из примеров осуществления композиция включает приблизительно от 1×10^6 до 1×10^{12} , от 1×10^7 до 1×10^{11} , от 1×10^8 до 1×10^{10} или 1×10^9 КОЕ/мл *Trichoderma*. В одном из конкретных примеров осуществления композиция включает приблизительно от 1×10^6 до 1×10^{12} , от 1×10^7 до 1×10^{11} , от 1×10^8 до 1×10^{10} или 1×10^9 КОЕ/мл *Bacillus*.

В некоторых примерах осуществления композиция может дополнительно включать один или более дополнительных микроорганизмов. В одном из примеров осуществления дополнительные микроорганизмы могут включать один или более, например, из следующих видов микроорганизмов: микобактерий и/или бактерий другого типа, дрожжей и/или грибов. Один из иллюстративных примеров осуществления включает применение микобактерии, где микобактерия представляет собой *Mucococcus xanthus*.

В некоторых примерах осуществления дополнительные микроорганизмы способны фиксировать, солибилизировать и/или мобилизовать азот, калий, фосфор (или фосфат) и/или другие питательные микроэлементы, находящиеся в почве. В один из примеров осуществления могут быть включены азотфиксирующие бактерии, такие как, например, *Azotobacter vinelandii*. В другой пример осуществления могут

быть включены калий-мобилизующие бактерии, такие как, например, *Frateuria aurantia*.

Другие дополнительные микроорганизмы могут включать, например, *Pseudomonas chlororaphis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Starmerella bombicola*,
5 *Saccharomyces boulardii*, *Pichia occidentalis*, *Pichia kudriavzevii* и/или *Meyerozyma guilliermondii*.

В одном из конкретных примеров осуществления один или более дополнительных микроорганизмов добавляют в концентрации, составляющей от 1×10^8 до 1×10^{11} или от 1×10^9 до 1×10^{10} КОЕ/мл для каждого микроорганизма.

10 Виды и отношения микроорганизмов и других ингредиентов в композиции могут быть уточнены в соответствии, например, с типом обрабатываемого растения, типом почвы, в которой произрастает растение, здоровьем растения в момент обработки, а также другими факторами.

15 Микроорганизмы и композиции на основе микроорганизмов согласно настоящему изобретению имеют ряд полезных свойств, подходящих для улучшения здоровья, роста и урожайности растений. Например, композиции могут включать продукты, полученные в результате роста микроорганизмов, такие как биологические поверхностно-активные вещества, белки и/или ферменты, как в очищенной, так и в неочищенной форме.

20 В одном из примеров осуществления микроорганизмы, содержащиеся в композиции согласно изобретению, способны продуцировать биологическое поверхностно-активное вещество. В другом примере осуществления биологические поверхностно-активные вещества могут быть произведены отдельно другими микроорганизмами и добавлены в композицию либо в очищенной, либо в
25 неочищенной форме. Биологические поверхностно-активные вещества в неочищенной форме могут включать, например, биологические поверхностно-активные вещества и другие продукты клеточного роста в среде, остающейся после ферментации, которые образуются в результате культивирования микроорганизма, вырабатывающего биологическое поверхностно-активное вещество. Композиция,
30 включающая биологические поверхностно-активные вещества в неочищенной форме, может включать приблизительно от 0,001% до приблизительно 90%, приблизительно от 25% до приблизительно 75%, приблизительно от 30% до приблизительно 70%, приблизительно от 35% до приблизительно 65%,

приблизительно от 40% до приблизительно 60%, приблизительно от 45% до приблизительно 55% или приблизительно 50% чистого биологического поверхностно-активного вещества.

Биологические поверхностно-активные вещества образуют важный класс вторичных метаболитов, производимых различными микроорганизмами, такими как бактерии, грибки и дрожжи. Будучи амфифильными молекулами, микробные биологические поверхностно-активные вещества снижают поверхностное и межфазное натяжение между молекулами жидкостей, твердых веществ и газов. Кроме того, биологические поверхностно-активные вещества согласно настоящему изобретению биоразлагаемы, имеют низкую токсичность, эффективно способствуют солюбилизации и разложению нерастворимых соединений, находящихся в почве, и могут быть получены экономичными способами с использованием возобновляемых ресурсов. Они могут ингибировать адгезию нежелательных микроорганизмов к различным поверхностям, предотвращать образование биопленок и могут иметь очень выраженные эмульгирующие и деэмульгирующие свойства. Кроме того, биологические поверхностно-активные вещества также могут быть применены для повышения смачиваемости и для равномерной солюбилизации и/или распределения удобрений, питательных веществ и воды в почве.

Биологические поверхностно-активные вещества, применяемые в способах согласно изобретению, могут быть выбраны, например, из низкомолекулярных гликолипидов (например, софоролипидов, целлобиозолипидов, рамнолипидов, маннозилэритритололипидов и трегалозолипидов), липопептидов (например, сурфактина, итурина (iturin), фенгицина, артрофактина (arthrofactin) и лихенизина (lichenysin)), флаволипидов, фосфолипидов (например, кардиолипинов) и высокомолекулярных полимеров, таких как липопротеины, комплексов липополисахарид-белок и комплексов полисахарид-белок-жирная кислота.

Композиция может включать одно или более биологических поверхностно-активных веществ в концентрации, составляющей от 0,001% до 10%, от 0,01% до 5%, от 0,05% до 2% и/или от 0,1% до 1%.

Предпочтительно согласно настоящему изобретению композиция для обработки почвы может включать среду, в которой выращивают микроорганизмы. Композиция может содержать, например, по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% или 100% масс. среды для выращивания.

Ферментационная среда может содержать живую и/или неактивную культуру, выделяемые при росте побочные продукты в очищенной или неочищенной форме, такие как биологические поверхностно-активные вещества, ферменты и/или другие метаболиты, и/или любые остаточные питательные вещества. Количество биомассы в композиции может составлять, например, любую величину в диапазоне 5 (% масс.) приблизительно от 0,01% до 100%, приблизительно от 1% до 90%, приблизительно от 5% до приблизительно 80% или приблизительно от 10% до приблизительно 75%.

10 Продукт ферментации может быть применен непосредственно, как после экстракции или очистки, так и без экстракции или очистки. При необходимости, экстракция и очистка могут быть легко произведены стандартными способами или методиками экстракции и/или очистки, описанными в литературе.

15 Микроорганизмы, находящиеся в композиции для обработки почвы, могут быть в активной или неактивной форме или в виде вегетативных клеток, репродуктивных спор, мицелия, гифы, конидия или любой другой формы единиц размножения микроорганизмов. Композиция также может содержать комбинацию любых из указанных микробных форм.

20 В одном из примеров осуществления различные виды микроорганизма выращивают по отдельности и затем смешивают друг с другом, получая композицию для обработки почвы. В одном из примеров осуществления микроорганизмы могут быть культивируемыми совместно, например, *B. amyloliquefaciens* и *M. xanthus*.

25 В одном из примеров осуществления композицию предпочтительно подготавливают для внесения в почву, для нанесения на семена, целые растения или части растений (включающие, без ограничений, корни, клубни, стебли, цветки и листья). В некоторых примерах осуществления композицию приготавливают в виде, например, жидкости, тонкодисперсного порошка, гранул, микрогранул, гранул неправильной формы, смачиваемого порошка, текучего порошка, эмульсий, микрокапсул, масел или аэрозолей.

30 Для улучшения или стабилизации воздействия композиции она может быть смешана с подходящими вспомогательными веществами и затем нанесена как таковая или, при необходимости, после разбавления. В предпочтительных примерах осуществления композиция получена в виде жидкости,

концентрированной жидкости или сухого порошка или гранул, которые могут быть смешаны с водой и другими компонентами с образованием жидкого продукта.

5 В одном из примеров осуществления композиция может включать глюкозу (например, в виде патоки), глицерол и/или глицерин, применяемые в качестве веществ, влияющих на осмотическое давление, создающих осмотическое давление во время хранения и транспортировки сухого продукта, или в дополнение к таким веществам.

10 Композиции могут быть применены как таковые или в комбинации с другими соединениями и/или способами эффективного улучшения здоровья, роста и урожайности растений, и/или для поддержания роста первого и второго микроорганизмов. Например, в одном из примеров осуществления композиция может включать и/или может быть нанесена одновременно с питательными веществами и/или питательными микроэлементами для улучшения роста растения и/или микроорганизма, такими как магний, фосфат, азот, калий, селен, кальций, 15 сера, железо, медь и цинк; и/или с одним или более пребиотиками, такими как экстракт ламинарии, фульвовая кислота, хитин, гумат и/или гуминовая кислота. Точный набор материалов и их количеств может быть определен производителем или ученым-агрономом после прочтения настоящего описания.

20 Композиции также могут быть применены в комбинации с другими сельскохозяйственными соединениями и/или системами ухода за сельскохозяйственными культурами. В одном из примеров осуществления композиция необязательно может включать или использоваться, например, с природными и/или химическими пестицидами, репеллентами, гербицидами, удобрениями, веществами для обработки воды, неионными поверхностно-активными веществами и/или почвоулучшителями. Предпочтительно, однако, 25 композиция не включает и/или не применяется с беномилом, хлоридом додецилдиметиламмония, диоксидом водорода/пероксиуксусной кислотой, имазаилом, пропиконазолом, тебуконазолом или трифлумизолом.

30 Если композицию смешивают с совместимыми химическими добавками, то перед добавлением композиции согласно изобретению химические добавки предпочтительно разбавляют водой.

В композицию могут быть добавлены дополнительные компоненты, например, буферные агенты, носители, другие композиции на основе

микроорганизмов, получаемые на том же или на другом предприятии, модификаторы вязкости, консерванты, питательные вещества для роста микроорганизмов, отслеживающие агенты, биоциды, другие микроорганизмы, поверхностно-активные вещества, эмульгирующие агенты, смазочные вещества, агенты, регулирующие растворимость, регуляторы pH, консерванты, стабилизаторы и агенты, повышающие устойчивость к ультрафиолетовому излучению.

Величина pH композиции на основе микроорганизмов должна быть подходящей для применяемого микроорганизма. В одном из предпочтительных примеров осуществления pH композиции составляет приблизительно от 3,5 до 7,0, приблизительно от 4,0 до 6,5 или приблизительно 5,0.

До момента применения композиция необязательно может храниться. Продолжительность хранения предпочтительно невелика. Таким образом, продолжительность хранения может составлять менее 60 суток, 45 суток, 30 суток, 20 суток, 15 суток, 10 суток, 7 суток, 5 суток, 3 суток, 2 суток, 1 суток или 12 часов. В одном из предпочтительных примеров осуществления, если в продукте содержатся живые клетки, то продукт хранят при невысокой температуре, такой как, например, менее 20°C, 15°C, 10°C или 5°C.

Композиции на основе микроорганизмов могут быть применены без дополнительной стабилизации, консервации и хранения. Предпочтительно непосредственное применение композиций на основе микроорганизмов позволяет сохранять высокую жизнеспособность микроорганизмов, снижает вероятность загрязнения посторонними веществами и нежелательными микроорганизмами и поддерживает активность побочных продуктов микробного роста.

В других примерах осуществления композиция (микроорганизмы, среда для выращивания или микроорганизмы и среда) может быть помещена в контейнер подходящего размера с учетом, например, предполагаемого применения, предполагаемого способа нанесения, размера емкости для ферментации и любого способа транспортировки от установки для выращивания микроорганизмов к месту использования. Таким образом, контейнеры, в которые помещают композицию на основе микроорганизмов, могут иметь объем, например, от 1 пинты до 1000 галлонов (приблизительно от 0,47 л до 3785,4 л) или более. В некоторых примерах осуществления емкость контейнеров составляет 1 галлон (приблизительно 3,8 л), 2 галлона (приблизительно 7,6 л), 5 галлонов (приблизительно 18,9 л), 25 галлонов (приблизительно 94,6 л) или более.

Выращивание микроорганизмов согласно настоящему изобретению

Для осуществления настоящего изобретения применяют способы культивирования микроорганизмов и выработки микробных метаболитов и/или других побочных продуктов роста микроорганизмов. Для осуществления настоящего изобретения дополнительно применяют способы культивирования, которые 5 подходят для культивирования микроорганизмов и выработки микробных метаболитов в требуемом масштабе. Способы культивирования включают, без ограничений, глубинное культивирование/ферментацию, твердофазную ферментацию (SSF), а также модификации, гибридные варианты и/или комбинации 10 перечисленных способов.

Употребляемый в настоящей работе термин “ферментация” означает культивирование или выращивание клеток в регулируемых условиях. Выращивание может быть аэробным или анаэробным. В предпочтительных примерах осуществления микроорганизмы выращивают способом SSF и/или его 15 модифицированными вариантами.

Один из примеров осуществления настоящего изобретения относится к материалам и способам получения биомассы (например, жизнеспособного клеточного материала), внеклеточных метаболитов (например, небольших молекул и выделяемых белков), остаточных питательных веществ и/или внутриклеточных 20 компонентов (например, ферментов и других белков).

Емкость для выращивания микроорганизмов, применяемая согласно настоящему изобретению, может представлять собой любой ферментатор или реактор культивирования для промышленного применения. В одном из примеров осуществления емкость может иметь функциональные контроллеры/датчики или 25 может быть соединена с функциональными контроллерами/датчиками для измерения важных параметров способа культивирования, таких как pH, параметры кислорода, давление, температура, влажность, плотность микроорганизмов и/или концентрация метаболитов.

В другом примере осуществления емкость также может быть сконструирована с возможностью отслеживать рост микроорганизмов внутри 30 емкости (например, определять численность клеток и фазы роста). В альтернативном варианте из емкости ежедневно может отбираться образец, который анализируют с помощью методик установления количества, известных в

данной области техники, таких как посев способом разведения. Посев способом разведения представляет собой простую методику, применяемую для оценки количества организмов в образце. Эта методика также может служить инструментом сравнения различных окружающих сред или способов обработки.

5 В одном из примеров осуществления способ включает предоставление источника азота для питания культивируемого организма. Источник азота может представлять собой, например, нитрат калия, нитрат аммония, сульфат аммония, фосфат аммония, аммиак, мочевины и/или хлорид аммония. Эти источники азота могут быть применены независимо или в виде комбинации из двух или более
10 источников.

Способ может включать обогащение выращиваемой культуры кислородом. В одном из примеров осуществления применяют медленное движение воздуха для удаления воздуха, содержащего низкие концентрации кислорода, и введения обогащенного кислородом воздуха. В случае глубокой ферментации обогащенный
15 кислородом воздух может представлять собой обычный окружающий воздух, подаваемый ежедневно с помощью механизмов, включающих крыльчатки (лопастные мешалки) для механического перемешивания жидкости и барботеры воздуха для барботажа пузырьков газа через жидкость для растворения кислорода в жидкости.

20 Способ может дополнительно включать предоставление источника углерода для питания культивируемого организма. Источник углерода обычно представляет собой углевод, такой как глюкоза, сахароза, лактоза, фруктоза, трегалоза, манноза, маннит и/или мальтоза; органические кислоты, такие как уксусная кислота, фумаровая кислота, лимонная кислота, пропионовая кислота, яблочная кислота,
25 малоновая кислота и/или пировиноградная кислота; спирты, такие как этанол, пропанол, бутанол, пентанол, гексанол, изобутанол и/или глицерол; жиры и масла, такие как соевое масло, масло канолы, масло из рисовых отрубей, оливковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и/или льняное масло; и т.д. Такие источники углерода могут быть применены независимо или в виде комбинации из двух более
30 источников.

В одном из примеров осуществления в среду включают факторы роста и питательные микроэлементы для микроорганизмов. Это особенно предпочтительно при выращивании микроорганизмов, которые не способны продуцировать все витамины, которые им требуются. Среда также может включать неорганические

питательные вещества, включающие микроэлементы, такие как железо, цинк, медь, марганец, молибден и/или кобальт. Кроме того, могут быть включены источники витаминов, незаменимых аминокислот и микроэлементов, например, в виде муки или шрота, такие как кукурузная мука, или в виде экстрактов, таких как экстракт дрожжей, картофельный экстракт, говяжий экстракт, соевый экстракт, экстракт банановой кожуры и подобные экстракты, или в очищенных формах. Также могут быть включены аминокислоты, такие как, например, аминокислоты, участвующие в биосинтезе белков.

В один из примеров осуществления также могут быть включены неорганические соли. Подходящими неорганическими солями могут быть дигидрофосфат калия, гидрофосфат дикалия, гидрофосфат динатрия, сульфат магния, хлорид магния, сульфат железа, хлорид железа, сульфат марганца, хлорид марганца, сульфат цинка, хлорид свинца, сульфат меди, хлорид кальция, хлорид натрия, карбонат кальция и/или карбонат натрия. Эти неорганические соли могут быть применены независимо или в виде комбинации из двух более солей.

В некоторых примерах осуществления способ культивирования может дополнительно включать добавление в среду дополнительных кислот и/или противомикробных препаратов до и/или во время культивирования. Противомикробные агенты или антибиотики применяются для защиты культуры от загрязнения.

Дополнительно, для предотвращения образования и/или накопления пены во время глубинного культивирования также могут быть добавлены антивспениватели.

Величина pH смеси должна быть подходящей для рассматриваемого микроорганизма. Для стабилизации pH вблизи предпочтительного значения могут быть применены буферы и регуляторы pH, такие как карбонаты и фосфаты. Если в среде присутствуют ионы металлов в высоких концентрациях, то может возникнуть необходимость в применении хелатирующего агента.

Микроорганизмы могут быть выращены в планктонной форме или в виде биопленки. В случае биопленки в емкости может находиться субстрат, на котором микроорганизмы могут быть выращены в состоянии биопленки. Система также может быть, например, сконструирована с возможностью оказывать стимулирующее воздействие (такое как сдвиговое напряжение), которое усиливает рост биопленки и/или улучшает характеристики роста биопленки.

В одном из примеров осуществления способ культивирования микроорганизмов осуществляют при температуре от приблизительно 5° до приблизительно 100°C, предпочтительно от 15 до 60°C, более предпочтительно от 25 до 50°C. В другом примере осуществления культивирование может быть
5 проведено в непрерывном режиме при постоянной температуре. В другом примере осуществления культивирование может быть проведено при переменных температурах.

В одном из примеров осуществления оборудование, применяемое в способе, стерильно, и условия способа культивирования стерильны. Оборудование для
10 культивирования, такое как реактор/емкость, может быть отделено от установки для стерилизации, но соединено с установкой для стерилизации, например, с автоклавом. Оборудование для культивирования также может включать установку для стерилизации, в которой проводят стерилизацию *in situ* до начала инокуляции. Воздух может быть стерилизован способами, известными в данной области техники.
15 Например, перед введением в емкость, обычный окружающий воздух может быть пропущен через по меньшей мере один фильтр. В других примерах осуществления может быть произведена пастеризация среды, или в альтернативном случае способ проводят в отсутствие нагревания, если для контроля нежелательного роста бактерий могут быть применены низкая активность воды и низкий pH.

В одном из примеров осуществления настоящее изобретение дополнительно относится к способу получения микробных метаболитов, таких как, например, биологические поверхностно-активные вещества, ферменты, белки, этанол, молочная кислота, бета-глюкан, пептиды, промежуточные продукты метаболизма, полиненасыщенные жирные кислоты и липиды, где способ включает
25 культивирование штамма микроорганизма согласно настоящему изобретению в условиях, подходящих для роста и выработки метаболитов, и необязательно очистку метаболита. Содержание метаболита, получаемого способом, может составлять, например, по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%.

Вырабатываемый микроорганизмами при росте побочный продукт, представляющий интерес, может оставаться в микроорганизмах или может секретироваться в среду для выращивания. Среда может содержать соединения, которые стабилизируют активность вырабатываемого микроорганизмами при росте побочного продукта.

Содержание биомассы в среде ферментации может составлять, например, от 5 г/л до 180 г/л или более или от 10 г/л до 150 г/л.

Концентрация клеток может составлять, например, по меньшей мере от 1×10^6 до 1×10^{12} , от 1×10^7 до 1×10^{11} , от 1×10^8 до 1×10^{10} или 1×10^9 КОЕ/мл.

- 5 Способ и оборудование для культивирования микроорганизмов и производства микробных побочных продуктов может работать в периодическом, в полунепрерывном режиме или в непрерывном режиме.

10 В одном из примеров осуществления всю композицию, полученную культивированием микроорганизмов, извлекают по завершении культивирования (например, после достижения требуемой плотности клеток или плотности определенного метаболита). В такой периодической процедуре после сбора первой партии начинают получение абсолютно новой партии продукта.

15 В другом примере осуществления за один раз извлекают лишь часть продукта ферментации. В этом примере осуществления биомасса, содержащая жизнеспособные клетки, споры, конидий, гифы и/или мицелий, остается в емкости в качестве инокулята для следующей партии культивирования. Извлекаемая композиция может представлять собой бесклеточную среду или может содержать клетки, споры или другие репродуктивные единицы размножения и/или их комбинацию. В этом случае реализуется система, работающая в полунепрерывном
20 режиме.

Предпочтительно для проведения способа не требуется сложное оборудование или большое потребление энергии. Интересующие микроорганизмы можно культивировать в небольшом масштабе или в крупном масштабе на месте и применять в виде смеси со средами, в которых их культивировали.

- 25 Предпочтительно продукты на основе микроорганизмов могут быть получены в отдаленных зонах. Установки для выращивания микроорганизмов могут работать в отсутствие электрической сети, например, утилизируя солнечную энергию, ветер и/или гидроэлектрическую энергию.

Штаммы микроорганизмов

- 30 Микроорганизмы, подходящие для применения согласно настоящему изобретению, могут представлять собой, например, непатогенные для растений штаммы бактерий, дрожжей и/или грибков. Микроорганизмы могут представлять

собой природные или генетически модифицированные микроорганизмы. Например, для того, чтобы микроорганизмы обладали определенными характеристиками, в них могут быть изменены определенные гены. Микроорганизмы также могут представлять собой мутанты требуемого штамма. Употребляемый в настоящей работе термин “мутант” означает штамм, генетический вариант или субтип исходного микроорганизма, где по сравнению с исходным микроорганизмом мутант включает одну или более генетических вариаций (например, точечную мутацию, мутацию с изменением смысла, нонсенс-мутацию, делецию, дупликацию, мутацию со сдвигом рамки считывания или экспансию повторов). Процедуры получения мутантов хорошо известны в области микробиологии. Например, для этих целей широко применяют УФ мутагенез и нитрозогуанидин.

В одном из примеров осуществления микроорганизм представляет собой дрожжи или грибок. Виды дрожжей и грибков, подходящих для осуществления настоящего изобретения, включают *Aureobasidium* (например, *A. pullulans*), *Blakeslea*, *Candida* (например, *C. apicola*, *C. bombicola*, *C. nodaensis*), *Cryptococcus*, *Debaryomyces* (например, *D. hansenii*), *Entomophthora*, *Hanseniaspora*, (например, *H. uvarum*), *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces* (например, *K. phaffii*), *Mortierella*, *Mycorrhiza*, *Penicillium*, *Phycomyces*, *Pichia* (например, *P. anomala*, *P. guilliermondii*, *P. occidentalis*, *P. kudriavzevii*), *Pleurotus* spp. (например, *P. ostreatus*), *Pseudozyma* (например, *P. aphidis*), *Saccharomyces* (например, *S. boulardii sequela*, *S. cerevisiae*, *S. torula*), *Starmerella* (например, *S. bombicola*), *Torulopsis*, *Trichoderma* (например, *T. reesei*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. viride*), *Ustilago* (например, *U. maydis*), *Wickerhamomyces* (например, *W. anomalus*), *Williopsis* (например, *W. mrakii*), *Zygosaccharomyces* (например, *Z. bailii*) и другие виды.

В одном из предпочтительных примеров осуществления микроорганизм представляет собой спорообразующий грибок *Trichoderma* spp. В одном из конкретных предпочтительных примеров осуществления микроорганизм представляет собой *Trichoderma harzianum*.

Некоторые виды *Trichoderma* полезны при добавлении в почву, где они могут размножаться и расти в близком соседстве с корнями растения. Кроме дополнительной стимуляции роста растения они могут частично защищать корни от инвазии других патогенных для растений грибков и других микробных вредителей и вредителей-животных.

Trichoderma может осуществлять сильную и долговременную колонизацию поверхностей корней, проникая в эпидермис и внутренние клетки, находящиеся вблизи поверхности. Такие ассоциации корней и микроорганизмов вызывают существенные изменения в протеоме и метаболизме растения. Они продуцируют и/или высвобождают множество различных соединений, которые индуцируют локализованные или системные ответы устойчивости, что приводит к отсутствию патогенности для растений.

Дополнительно растения защищены от различных классов патогенов растений ответными реакциями, аналогичными приобретенной системной устойчивости и индуцируемой ризобактериями системной устойчивости. Грибок *Trichoderma* spp. может эффективно подавлять болезни, вызываемые некоторыми переносимыми с почвой патогенами растений. Например, виды *T. harzianum*, *T. hamatum* и *T. viride* проявляют фунгицидную активность в отношении *Sclerotium*, *Rhizoctonia*, *Solani*, *Pythium*, *Fusarium*, *Cercospora*, *Ralstonia*, *Fragaria*, *Rhizopus*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Magnaporthe* и многих других видов.

Кроме того, некоторые штаммы *Trichoderma* способны эффективно подавлять рост некоторых вирусных и бактериальных патогенов растений и почвы, а также оказывать значительный нематоцидный эффект.

Кроме защиты растений от патогенов и вредителей, корневая колонизация грибом *Trichoderma* spp. может улучшать рост и развитие корней, продуктивность сельскохозяйственной культуры, ее устойчивость к абиотическим стрессам и биодоступность питательных веществ.

В некоторых примерах осуществления микроорганизмы представляют собой бактерии, включающие грамположительные и грамотрицательные бактерии. Бактерии могут представлять собой, например, *Agrobacterium* (например, *A. radiobacter*), *Azotobacter* (*A. vinelandii*, *A. chroococcum*), *Azospirillum* (например, *A. brasiliensis*), *Bacillus* (например, *B. amyloliquefaciens*, *B. circulans*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *Bacillus mucilaginosus*, *B. subtilis*), *Frateuria* (например, *F. aurantia*), *Microbacterium* (например, *M. laevaniformans*), миксобактерии (например, *Mycobacterium xanthus*, *Stigmatella aurantiaca*, *Sorangium cellulosum*, *Minicystis rosea*), *Pantoea* (например, *P. agglomerans*), *Pseudomonas* (например, *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* (Kluyver), *P. putida*), *Rhizobium* spp., *Rhodospirillum* (например, *R. rubrum*), *Sphingomonas* (например, *S. paucimobilis*) и/или *Thiobacillus thiooxidans* (*Acidothiobacillus thiooxidans*).

В одном из конкретных примеров осуществления микроорганизм представляет собой *Bacillus amyloliquefaciens*, такой как, например, штамм *B. amyloliquefaciens subsp. locus*. В некоторых примерах осуществления микроорганизм *Bacillus* может солюбилизовать в почве соединения фосфора.

5 В одном из примеров осуществления микроорганизм представляет собой микобактерию или слизеобразующую бактерию. В частности, в одном из примеров осуществления микобактерия представляет собой бактерию *Mucosoccus* spp., например, *M. xanthus*.

10 В некоторых примерах осуществления микроорганизм представляет собой микроорганизм, способный фиксировать и/или солюбилизовать азот, калий, фосфор и/или другие питательные микроэлементы, находящиеся в почве.

15 В одном из примеров осуществления микроорганизм представляет собой азотфиксирующий микроорганизм или diaзотроф, например, выбранный из следующих видов: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Chlorobiaceae*, *Cyanothece*, *Frankia*, *Klebsiella*, клубеньковой бактерии, *Trichodesmium* и некоторых видов Archaea. В одном из конкретных примеров осуществления азотфиксирующая бактерия представляет собой *Azotobacter vinelandii*.

20 В другом примере осуществления микроорганизм представляет собой калий-мобилизующий микроорганизм или КМВ, выбранный из, например, *Bacillus mucilaginosus*, *Frateuria aurantia* или *Glomus mosseae*. В одном из конкретных примеров осуществления калий-мобилизующий микроорганизм представляет собой *Frateuria aurantia*.

25 Дополнительные микроорганизмы могут включать, например, *Pseudomonas chlororaphis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Starmerella bombicola*, *Saccharomyces boulardii*, *Pichia occidentalis*, *Pichia kudriavzevii* и/или *Meyerozyma guilliermondii*.

30 В одном из примеров осуществления комбинацию микроорганизмов, вносимую в растение и/или окружающую его среду, адаптируют для заданного растения и/или окружающей среды. Предпочтительно, в некоторых примерах осуществления микроорганизмы в комбинации создают синергический эффект, улучшая здоровье, рост и/или урожайность растений.

Получение продуктов на основе микроорганизмов

Одним из продуктов на основе микроорганизмов согласно настоящему изобретению является просто среда для ферментации, содержащая микроорганизмы и/или микробные метаболиты, вырабатываемые микроорганизмами, и/или любые остаточные питательные вещества. Продукт ферментации может быть применен непосредственно без экстракции или очистки. При необходимости может быть легко проведена экстракция и очистка с применением стандартных способов или методик экстракции и/или очистки, описанных в литературе.

Микроорганизмы, содержащиеся в продуктах на основе микроорганизмов, могут быть в активной или неактивной форме или в виде вегетативных клеток, репродуктивных спор, конидия, мицелия, гиф или любой другой формы микробной единицы размножения. Продукты на основе микроорганизмов также могут содержать комбинацию любых из указанных форм микроорганизмов.

В одном из примеров осуществления различные штаммы микроорганизма выращивают по отдельности и затем смешивают, получая продукт на основе микроорганизмов. Необязательно микроорганизмы могут быть смешаны со средой, в которой они выращены, и высушены до проведения смешивания.

В одном из примеров осуществления различные штаммы не смешивают друг с другом, а наносят на растение и/или вносят в окружающую его среду в виде отдельных продуктов на основе микроорганизмов.

Продукты на основе микроорганизмов могут быть применены без дополнительной стабилизации, консервации и хранения. Предпочтительно, непосредственное применение продуктов на основе микроорганизмов позволяет сохранять высокую жизнеспособность микроорганизмов, снижает вероятность загрязнения посторонними веществами и нежелательными микроорганизмами и позволяет сохранять активность побочных продуктов роста микроорганизмов.

После отбора композиции на основе микроорганизмов из емкостей для выращивания, в собранный продукт, помещаемый в контейнеры или иным образом транспортируемый к месту использования, могут быть добавлены дополнительные компоненты. Добавки могут представлять собой, например, буферы, носители, другие композиции на основе микроорганизмов, получаемые на той же или другой установке, модификаторы вязкости, консерванты, питательные вещества для

выращивания микроорганизмов, поверхностно-активные вещества, эмульгирующие агенты, смазочные вещества, агенты, регулирующие растворимость, отслеживающие агенты, растворители, биоциды, антибиотики, регуляторы pH, хелатирующие агенты, стабилизаторы, агенты, повышающие устойчивость к ультрафиолетовому излучению, другие микроорганизмы и другие подходящие добавки, традиционно добавляемые в такие препараты.

В одном из примеров осуществления могут быть добавлены буферные агенты, включающие органические кислоты и аминокислоты или их соли. Подходящие буферы включают цитрат, глюконат, тартрат, малат, ацетат, лактат, оксалат, аспартат, малонат, глюкогептонат, соль пировиноградной кислоты, соль галактаровой кислоты, соль глюкаровой кислоты, соль тартроновой кислоты, глутамат, глицин, лизин, глутамин, метионин, цистеин, аргинин и смеси перечисленных веществ. Также могут быть применены фосфорная кислота и кислоты фосфора или их соли. Для применения подходят синтетические буферы, но предпочтительно добавлять природные буферы, такие как органические кислоты и аминокислоты или их соли, перечисленные выше.

В другом примере осуществления регуляторы pH включают гидроксид калия, гидроксид аммония, карбонат или бикарбонат калия, соляную кислоту, азотную кислоту, серную кислоту или соответствующие смеси.

Величина pH композиции на основе микроорганизмов должна быть подходящей для применяемого микроорганизма (микроорганизмов). В одном из предпочтительных примеров осуществления pH композиции составляет приблизительно от 3,5 до 7,0, приблизительно от 4,0 до 6,5 или приблизительно 5,0.

В одном из примеров осуществления в композицию могут быть включены дополнительные компоненты, такие как водный препарат соли, такой как бикарбонат или карбонат натрия, сульфат натрия, фосфат натрия, бифосфат натрия.

В некоторых примерах осуществления в композицию может быть добавлено клейкое вещество для увеличения продолжительности прилипания продукта к частям растения. Для этой цели могут быть применены полимеры, такие как полимеры, имеющие заряд, или вещества на основе полисахаридов, например, ксантановая камедь, гуаровая камедь, леван, ксиллиан, геллановая камедь, курдлан, пуллулан, декстран и т.д.

В предпочтительных примерах осуществления в качестве клейкого вещества применяют ксантановую камедь коммерчески доступного сорта. Концентрация камеди должна быть выбрана с учетом содержания камеди в коммерческом продукте. Если ксантановая камедь имеет высокую чистоту, то достаточно 0,001% (масс./об. – ксантановая камедь/раствор).

В одном из примеров осуществления в продукт на основе микроорганизмов могут быть добавлены глюкоза, глицерол и/или глицерин, которые служат, например, компонентом, влияющим на осмотическое давление во время хранения и транспортировки. В одном из примеров осуществления может быть включена патока.

В одном из примеров осуществления для улучшения роста микроорганизмов в композицию могут быть добавлены пребиотики, и/или они могут быть распределены одновременно с продуктом на основе микроорганизмов. Подходящие пребиотики включают, например, экстракт ламинарии, фульвовую кислоту, хитин, гумат и/или гуминовую кислоту. В одном из конкретных примеров осуществления количество наносимых пребиотиков составляет приблизительно 0,1 л/акр до приблизительно 0,5 л/акр (приблизительно от 0,25 до 1,235 л/га), или приблизительно 0,2 л/акр до приблизительно 0,4 л/акр (приблизительно от 0,5 до 1 л/га).

Необязательно перед началом использования продукт может храниться. Продолжительность хранения предпочтительно невелика. Таким образом, продолжительность хранения может составлять менее 60 суток, 45 суток, 30 суток, 20 суток, 15 суток, 10 суток, 7 суток, 5 суток, 3 суток, 2 суток, 1 суток или 12 часов. В одном из предпочтительных примеров осуществления, если в продукте присутствуют живые клетки, то продукт хранят при невысокой температуре, такой как, например, менее 20°C, 15°C, 10°C или 5°C.

Местное производство продуктов на основе микроорганизмов

В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения, установка для выращивания микроорганизмов производит свежие микроорганизмы с высокой плотностью и/или побочные продукты, выделяемые при росте целевых микроорганизмов, в требуемом масштабе. Установка для выращивания микроорганизмов может быть расположена на участке применения или вблизи него. Установка производит композиции, включающие высокую плотность

микроорганизмов, в режиме периодического, полунепрерывного или непрерывного культивирования.

Установки для выращивания микроорганизмов согласно настоящему изобретению могут быть расположены в той местности, где затем применяют продукт на основе микроорганизмов (например, в цитрусовой роще). Например, установка для выращивания микроорганизмов может находиться на расстоянии менее 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 15, 10, 5, 3 или 1 мили от участка применения (1 миля составляет 1,609 км).

Поскольку продукт на основе микроорганизмов может быть произведен вблизи места применения, что позволяет избежать проведения стабилизации, консервации, хранения и транспортировки микроорганизма, характерных для традиционных производств микроорганизмов, то может быть достигнута гораздо более высокая плотность микроорганизмов, что позволяет использовать меньшие объемы продукта на основе микроорганизмов непосредственно на участке применения или создавать более высокую плотность нанесения микроорганизмов там, где необходимо достичь требуемой эффективности. Это позволяет устанавливать биореактор меньшего масштаба (например, меньшую емкость для ферментации, делать меньшие запасы исходного материала, питательных веществ и агентов для регулирования pH), что делает систему эффективной и позволяет избежать необходимости стабилизации клеток или их отделения от культуральной среды. Местное получение продукта на основе микроорганизмов также облегчает включение культуральной среды в продукт. Среда может содержать вещества, получаемые во время ферментации, которые особенно подходят для местного использования.

Имеющие высокую плотность, устойчивые культуры микроорганизмов местного производства более эффективны в полевых условиях, чем культуры, которые пребывали в логистической сети в течение некоторого времени. Продукты на основе микроорганизмов согласно настоящему изобретению имеют особые преимущества по сравнению с традиционными продуктами, в которых клетки отделены от метаболитов и питательных веществ, присутствующих в среде для ферментации. Сниженная продолжительность транспортировки позволяет производить и доставлять свежие партии микроорганизмов и/или их метаболитов в то время и в тех объемах, которые необходимы на конкретном участке.

Установки для выращивания микроорганизмов согласно настоящему изобретению производят свежие композиции на основе микроорганизмов, включающие сами микроорганизмы, метаболиты микроорганизмов и/или другие компоненты среды, в которой выращивают микроорганизмы. При необходимости композиции могут иметь высокую плотность вегетативных клеток или единиц размножения или содержать смесь вегетативных клеток и единиц размножения.

Предпочтительно композиции могут быть адаптированы для применения на определенном участке. В одном из примеров осуществления установка для выращивания микроорганизмов расположена на или вблизи участка, на котором затем применяют продукты на основе микроорганизмов (например, в цитрусовой роже).

Предпочтительно рассмотренные установки для выращивания микроорганизмов являются решением существующей в настоящее время проблемы сотрудничества с географически удаленными крупными промышленными производителями, продукция которых имеет пониженное качество из-за производственных задержек до поступления продукта в участок применения, "узких мест" логистической сети, неправильного хранения и других случайностей, которые препятствуют своевременной доставке и применению, например, доставке продукта, содержащего большое количество жизнеспособных клеток, и соответствующей среды и метаболитов, в которых были выращены эти клетки.

Установки для выращивания микроорганизмов обеспечивают производственную гибкость, поскольку они позволяют совмещать улучшенный синергический эффект продуктов на основе микроорганизмов с географической близостью. Так, в предпочтительных примерах осуществления системы согласно настоящему изобретению позволяют эффективно утилизировать свойства встречающихся в местной природе микроорганизмов и побочных продуктов их метаболизма для усовершенствования сельскохозяйственного производства.

Продолжительность культивирования в индивидуальных емкостях может составлять, например, от 1 до 7 суток или более. Продукт культивирования может быть собран любым из многочисленных имеющихся способов.

Производство на месте и доставка в течение, например, 24 часов по завершении ферментации приводит к получению чистых композиций с высокой клеточной плотностью и существенно более низкими затратами на перевозку.

Учитывая перспективы быстрого развития более эффективных и мощных микробных инокулятов, можно предположить, что потребители получают ощутимую пользу от возможности быстрой доставки продуктов на основе микроорганизмов.

Способы улучшения здоровья корней растений и укрепления здорового иммунитета

5 Предпочтительные примеры осуществления относятся к способу улучшения здоровья, роста и урожайности растений, который включает нанесение на растение и/или окружающую его среду комбинации полезных микроорганизмов и/или побочных продуктов, выделяемых при их росте. В некоторых примерах осуществления способами согласно изобретению обрабатывают совокупность
10 растений и/или их окружения.

Употребляемый в настоящей работе термин растения “окружающая среда (окружение)” означает почву и/или другую среду, в которой произрастает растение, которая может включать ризосферу. В некоторых примерах осуществления радиус
15 окружающей среды (окружения) не превышает, например, расстояния по меньшей мере 5 миль (приблизительно 9,6 км), 1 мили (приблизительно 1,6 км), 1000 футов (приблизительно 305 м), 500 футов (приблизительно 152 м), 300 футов (приблизительно 91 м), 100 футов (приблизительно 30,5 м), 10 футов (приблизительно 3 м), 8 футов (приблизительно 2,4 м) или 6 футов (приблизительно 1,8 м) от растения.

20 В конкретных примерах осуществления способы могут включать нанесение первого микроорганизма и второго микроорганизма и/или побочного продукта, выделяемого при росте одного или обоих этих микроорганизмов, на растение и/или его внесение в среду, окружающую растение. Предпочтительно первый микроорганизм представляет собой грибок *Trichoderma spp.*, и второй
25 микроорганизм представляет собой бактерию *Bacillus spp.* В конкретных примерах осуществления способ включает нанесение композиции для обработки почвы согласно настоящему изобретению на растение и/или внесение ее в среду, окружающую растение.

В одном из примеров осуществления способ включает культивирование
30 первого и второго микроорганизмов по отдельности и последующее их смешивание с образованием одной композиции для обработки почвы. В одном из примеров осуществления первый и второй микроорганизмы не смешивают друг с другом с

образованием одного продукта, а наносят на растение и/или вносят в среду, окружающую растение в виде отдельных обработок.

Для улучшения или стабилизации эффекта от обработки композицией, композиция может быть смешана с подходящими вспомогательными веществами и
5 затем нанесена как таковая или, при необходимости, после разбавления. В предпочтительных примерах осуществления композицию производят в виде сухого порошка или гранул, которые могут быть смешаны с водой и другими компонентами с образованием жидкого продукта.

В одном из примеров осуществления одновременно с *Trichoderma* и/или
10 *Bacillus* могут быть внесены дополнительные микроорганизмы. Например, также может быть добавлена микобактерия, такая как *Mycobacterium xanthus*, и/или один или более микроорганизмов, способных фиксировать, мобилизовать и/или солюбилизовать азот, калий, фосфор (или фосфат) и/или другие питательные микроэлементы, находящиеся в почве. В одном из примеров осуществления также
15 может быть добавлен азотфиксирующий микроорганизм, такой как, например, *Azotobacter vinelandii*. В другом примере осуществления также может быть добавлен калий-мобилизующий микроорганизм, такой как, например, *Frateuria aurantia*.

В некоторых примерах осуществления способы дополнительно включают внесение вместе с композицией материалов, применяемых для улучшения роста
20 микроорганизмов (например, питательных веществ и/или пребиотиков для стимуляции роста микроорганизмов). В одном из примеров осуществления источники питательных веществ могут включать, например, источники азота, калия, фосфора, магния, белков, витаминов и/или углерода. В одном из примеров осуществления пребиотики могут включать, например, экстракт ламинарии,
25 фульвовую кислоту, хитин, гумат и/или гуминовую кислоту.

В одном из примеров осуществления применение способа может приводить к улучшению здоровья, роста и/или урожайности растений за счет улучшения здоровья и роста корней. В частности, в одном из примеров осуществления способы могут быть применены для улучшения свойств ризосферы, в которой растут корни
30 растения, например, для усиления способности к удержанию питательных веществ и/или влаги.

Дополнительно, в одном из примеров осуществления способ может быть применен для инокуляции ризосферы одним или более полезными

микроорганизмами. Например, в предпочтительных примерах осуществления микроорганизмы, содержащиеся в композиции для обработки почвы, могут колонизировать ризосферу и оказывать множество полезных воздействий на растение, корни которого находятся в ризосфере, где примеры воздействия
5 включают защиту и обеспечение питания.

Предпочтительно, в одном из примеров осуществления способы согласно изобретению могут быть применены для улучшения здоровья, роста и/или урожайности растений, здоровый иммунитет которых был снижен в результате инфицирования патогеном или воздействия фактора экологического стресса, такого
10 как, например, засуха. Таким образом, в некоторых примерах осуществления способы согласно изобретению также могут быть применены для усиления здорового иммунитета или иммунной реакции растений.

Употребляемый в настоящей работе термин “нанесение (внесение)” композиции или продукта означает контакт композиции или продукта с целевым
15 объектом или участком таким образом, чтобы композиция или продукт могли оказывать воздействие на целевой объект или участок. Воздействие может быть обусловлено, например, ростом микроорганизмов и/или взаимодействием с растением, а также действием метаболита, фермента, биологического поверхностно-активного вещества или другого побочного продукта, выделяемого
20 микроорганизмами при росте. Нанесение (внесение) также может включать “обработку” композицией целевого объекта или участка.

Нанесение может дополнительно включать приведение в контакт продукта на основе микроорганизмов непосредственно с растением, частью растения и/или со
25 средой, окружающей растение (например, почвой или ризосферой). Продукт на основе микроорганизмов может быть нанесен в виде обработки семян или поверхности почвы или на поверхность растения или части растения (например, на поверхность корней, клубней, стеблей, цветков, листьев или плодов). Продукт может быть распылен, налит, разбрызган, введен или распределен в виде жидкости, сухого порошка, мелкодисперсного порошка, гранул, микрогранул, гранул
30 неправильной формы, смачиваемого порошка, текучего порошка, эмульсий, микрокапсул, масел, гелей, паст или аэрозолей.

В одном из конкретных примеров осуществления композицию вводят в контакт с одним или более корнями растения. Композиция может быть нанесена непосредственно на корни, например, распылением или погружением корней, и/или

опосредованно, например, введением композиции в почву, в которой произрастает растение (например, в ризосферу). Композиция может быть нанесена на семена растения до или во время посадки или на любую другую часть растения и/или в окружающую его среду.

5 В некоторых примерах осуществления композиции согласно изобретению наносят на поверхность почвы без механического введения. Полезный эффект нанесения на почву может быть активирован после воздействия дождя, разбрызгивателя, затопления или капельного орошения, после чего композиция доставляется, например, к корням растений.

10 Растения и/или их окружение могут быть обработаны в любой момент процесса выращивания растения. Например, композиция для обработки почвы может быть нанесена на почву до, одновременно с или после посева семян. Она также может быть нанесена в любой последующий момент во время развития и роста растения, примеры которого включают: цветение, плодоношение растения и
15 во время и/или после сбрасывания листьев.

В одном из примеров осуществления способ может быть применен на крупномасштабном сельскохозяйственном предприятии. Способ может включать введение композиции для обработки почвы в резервуар, соединенный с системой орошения, применяемой для подачи воды, удобрений или других жидких
20 композиций к сельскохозяйственной культуре, саду или полю. Таким образом, растение и/или почва, окружающая растение, могут быть обработаны композицией для обработки почвы, например, через введение в почву, посредством пропитывания почвы или с помощью круговой дождевальной системы орошения, или с помощью распыления по борозде, в которую помещают семена, или с
25 помощью разбрызгивателей или капельных ирригаторов. Рассматриваемый способ прекрасно подходит для обработки сотен акров сельскохозяйственных культур, садов или полей за один раз.

В одном из примеров осуществления способ может быть применен на предприятии меньшего масштаба, таком как приусадебный сад или оранжерея. В
30 таких случаях способ может включать распыление композиции для обработки почвы на растение и/или окружающую его среду с помощью ручного газонного и садового распылителя. Композиция может быть смешана с водой и необязательно другими средствами для обработки газона и сада, такими как удобрения и пестициды.

Композиция также может быть смешана в стандартной ручной садовой лейке и вылита в почву.

В некоторых примерах осуществления обрабатываемое растение здорово. Предпочтительно настоящее изобретение может применяться для усиления
5 иммунной реакции растения с нарушенной иммунной системой, например, в результате поражения растения заболеванием и/или после возникновения симптомов заболевания.

Например, на растение может воздействовать патогенный штамм
10 *Pseudomonas* (например, *P. savastanoi*, *P. syringae pathovars*); *Ralstonia solanacearum*; *Agrobacterium* (например, *A. tumefaciens*); *Xanthomonas* (например, *X. oryzae pv. Oryzae*, *X. campestris pathovars*, *X. axonopodis pathovars*); *Erwinia* (например, *E. amylovora*); *Xylella* (например, *X. fastidiosa*); *Dickeya* (например, *D. dadantii* и *D. solani*); *Pectobacterium* (например, *P. carotovorum* и *P. atrosepticum*); *Clavibacter* (например, *C. michiganensis* и *C. sepedonicus*); *Candidatus Liberibacter asiaticus*;
15 *Pantoea*; *Burkholderia*; *Acidovorax*; *Streptomyces*; *Spiroplasma*; и/или *Phytoplasma*; а также растение может быть заражено болезнью huanglongbing (HLB, пожелтение цитрусовых), раком цитрусовых, пятнистым бактериозом цитрусовых, пестрым хлорозом цитрусовых, бурой гнилью, гнилью корней цитрусовых, пятнистостью цитрусовых и черной пятнистостью.

В одном из примеров осуществления способы применяют для улучшения
20 здоровья, роста и/или урожайности цитрусовых деревьев, зараженных болезнью пожелтения цитрусовых и/или раком цитрусовых.

Настоящее изобретение может быть применено для улучшения здоровья, роста и/или урожайности растений и/или сельскохозяйственных культур, например,
25 в сельском хозяйстве, садоводстве, оранжереях, в ландшафтном дизайне и в подобных условиях.

В одном из примеров осуществления настоящее изобретение также может быть применено для улучшения одного или более качеств почвы, что позволяет
30 улучшать эксплуатационные характеристики почвы с точки зрения ее использования в сельском хозяйстве, домашнем огородничестве и садоводстве.

В некоторых примерах осуществления композиция для обработки почвы также может быть применена для ускорения колонизации корней и/или ризосферы, а также сосудистой системы растения с целью улучшения здоровья и повышения

жизнеспособности растений. Таким образом, могут быть размножены микроорганизмы, фиксирующие питательные вещества, такие как *Rhizobium* и/или *Mycorrhizae*, а также другие полезные эндогенные и экзогенные микроорганизмы и/или побочные продукты их жизнедеятельности, которые способствуют улучшению
5 роста, здоровья и/или урожайности сельскохозяйственных культур.

В одном из примеров осуществления способ может быть применен для улучшения проникновения полезных молекул через наружные слои клеток корневой системы.

Настоящее изобретение может быть применено для улучшения любых
10 качеств почвы любого типа, например, глинистой, песчаной, илистой, торфяной, известняковой, суглинистой почвы и/или комбинаций таких почв. Кроме того, способы и композиции могут быть применены для улучшения качества сухих, переувлажненных, пористых, истощенных, слежавшихся почв и/или комбинаций таких почв.

В одном из примеров осуществления способ может быть применен для
15 улучшения дренирования и/или распространения воды в переувлажненных почвах. В одном из примеров осуществления способ может быть применен для улучшения удержания воды в сухих почвах.

В одном из примеров осуществления способ может быть применен для
20 улучшения удержания питательных веществ в пористых и/или истощенных почвах.

В одном из примеров осуществления способ позволяет устанавливать контроль над самими патогенными бактериями. В одном из примеров осуществления применение способа позволяет улучшать здоровый иммунитет растений с целью повышения способности сопротивляться инфекциям.

В другом примере осуществления способ позволяет устанавливать контроль
25 над вредителями, которые могут действовать как векторы или переносчики для патогенных бактерий, такими как мухи, тля, муравьи, жуки и белокрылки. Таким образом, способы согласно изобретению позволяют предотвращать распространение бактерий, оказывающих патогенное действие на растения,
30 посредством контроля, например, уничтожения, таких вредителей-переносчиков.

Продукты на основе микроорганизмов могут быть применены как таковые или в комбинации с другими соединениями, эффективно улучшающими здоровье, рост

и/или урожайность растений, а также другими соединениями, предназначенными для эффективной обработки от патогенных вредителей растений и для предотвращения распространения патогенных вредителей растений. Например, в способах эти продукты могут быть применены одновременно с источниками питательных веществ и/или питательных микроэлементов для улучшения роста растения и/или микроорганизма, таких как магний, фосфат, азот, калий, селен, кальций, сера, железо, медь и цинк; и/или с одним или более пребиотиками, такими как экстракт ламинарии, фульвовая кислота, хитин, гумат и/или гуминовая кислота. Точный набор материалов и их количества могут быть определены производителем или ученым-агрономом после прочтения настоящего описания.

Композиции также могут быть применены в комбинации с другими используемыми в сельском хозяйстве соединениями и/или системами ухода за сельскохозяйственными культурами. В одном из примеров осуществления композиция необязательно может включать и/или быть применена, например, наряду с природными и/или химическими пестицидами, репеллентами, гербицидами, удобрениями, средствами обработки воды, неионными поверхностно-активными веществами и/или почвоулучшителями.

В одном из примеров осуществления композиции согласно изобретению совместимы с применением сельскохозяйственных соединений, характеризующихся как ингибиторы отложений, таких как, например, гидроксипропандиндифосфоновая кислота;

бактерицидных средств, таких как, например, стрептомицин сульфат и/или Galltrol® (*A. radiobacter*, штамм K84);

биоцидов, таких как, например, диоксид хлора, дидецилдиметилхлорид аммония, галогенированные гетероциклические соединения и/или диоксид водорода/пероксиуксусная кислота;

удобрений, таких как, например, N-P-K удобрения, нитрат кальция-аммония 17-0-0, тиосульфат калия, азот (например, 10-34-0, Kugler KQ-XRN, Kugler KS-178C, Kugler KS-2075, Kugler LS 6-24-6S, UN 28, UN 32) и/или калий;

фунгицидов, таких как, например, хлороталонил, манкоцеб гексаметилентетрамин, алюминий трис (aluminum tris), азоксистробин, *Bacillus* spp. (например, *B. Licheniformis*, штамм 3086, *B. subtilis*, *B. Subtilis*, штамм QST 713), беномил, боскалид, пираклостробин, каптан, карбоксин, хлорнеб, хлороталонил,

сульфат меди, циазофамид, диклоран, диметоморф, этридиазол, тиофанат-метил, фенамидон, фенаримол, флудиоксонил, флуопиколид, флутоланил, ипродион, манкоцеб, манеб, мефаноксам, флудиоксонил, мефеноксам, металаксил, миклобутанил, оксатиапипролин, пентахлорнитробензол (квинтоцен), фосфорная
5 кислота, пропамокарб, пропанил, пиракlostробин, *Reynoutria sachalinensis*, *Streptomyces* spp. (например, штамм K61 *S. griseoviridis*, *S. lydicus* WYEC 108), сера, мочеви́на, тиабендазол, тиофанат-метил, тирам, триадимефон, триадименол и/или винклозолин;

регуляторов роста, таких как, например, анцимидол, хлормекват хлорид,
10 диаминозид, паклобутразол и/или униконазол;

гербицидов, таких как, например, глифосат, оксифлуорфен и/или пендиметалин;

инсектицидов, таких как, например, ацефат, азадирактин, *B. thuringiensis* (например, subsp. *israelensis*, штамм AM 65-52), *Beauveria bassiana* (например, штамм GHA), карбарил, хлорпирифос, циантранилипрол (cyantraniliprole),
15 циромазин, дикофол, диазинон, динотефуран, имидаклоприд, *Isaria fumosorosae* (например, Аропка штамм 97), линдан и/или малатион;

средств для обработки воды, таких как, например, пероксид водорода (30-35%), фосфо́новая кислота (5-20%) и/или хлорит натрия;

20 а также гликолипидов, липопептидов, ДЭТА, диатомитовой земли, цитронеллы, эфирных масел, минеральных масел, экстракта чеснока, экстракта чили и/или любого известного пестицида коммерческого и/или собственного производства, совместимость которого была показана специалистом, ознакомленным с настоящей работой.

25 Предпочтительно, композиция не включает и/или не применяется одновременно со следующими соединениями или в течение периода, составляющего от 7 до 10 суток до или после применения следующих соединений: бенонила, хлорида додецилдиметиламмония, диоксида водорода/пероксиуксусной кислоты, имазадила, пропиконазола, тебуконазола или трифлумизола.

30 В некоторых примерах осуществления композиции и способы могут быть применены для повышения эффективности действия других соединений, например, для улучшения проникновения соединения-пестицида в организм растения или

вредителя или для повышения биодоступности питательного вещества для корней растений. Продукты на основе микроорганизмов также могут быть применены для дополнения других средств обработки, например, при обработке антибиотиками. Предпочтительно, настоящее изобретение позволяет снизить количество антибиотиков, которыми должна быть обработана сельскохозяйственная культура или растение для достижения эффекта от обработки против бактериальной инфекции и/или для предотвращения бактериальной инфекции.

В одном из примеров осуществления применение способов и композиций согласно настоящему изобретению приводит к увеличению одного или более следующих параметров: массы корней, диаметра ствола, плотности кроны, градуса по шкале Брикса, содержания хлорофилла, количества цветков и/или концентрации азота в тканях листьев растения на приблизительно 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200% или более по сравнению с теми же параметрами растения, выращиваемого в необработанной среде.

В некоторых примерах осуществления применение способов и композиций согласно настоящему изобретению приводит к повышению урожайности сельскохозяйственной культуры на приблизительно 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200% или более по сравнению с необработанными сельскохозяйственными культурами.

В одном из примеров осуществления применение способов и композиций согласно настоящему изобретению приводит к снижению количества вредителей на растении или в среде, окружающей растение, приблизительно на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200% или более по сравнению с растением, выращиваемым в необработанной среде.

В одном из примеров осуществления применение способов и композиций согласно настоящему изобретению позволяет снижать вред, наносимый растениям вредителями, приблизительно на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200% или более по сравнению с растениями, выращиваемыми в необработанной среде.

30

Целевые растения

Употребляемый в настоящей работе термин “растение” включает, без ограничений, любые виды древесных, цветочных или декоративных сельскохозяйственных культур или зерновых, плодовых растений или овощей,

цветов или деревьев, макроводорослей или микроводорослей, фитопланктона и фотосинтетических водорослей (например, зеленых водорослей *Chlamydomonas reinhardtii*). Термин “растение” также включает одноклеточные растения (например, микроводоросли) и совокупность растительных клеток, которые по большей части дифференцированы в колонии (например, вольвокс), или структуру, находящуюся на любой стадии развития растения. Такие структуры включают, без ограничений: плод, семя, побег, стебель, лист, корень, лепесток цветка и т.д. Растения могут быть отдельностоящими, например, в саду, или они могут быть одним из множества растений, например, составляющих часть питомника, сельскохозяйственной культуры или пастбища.

Употребляемый в настоящей работе термин “сельскохозяйственные растения” относится к растениям или водорослям любых видов, которые могут употребляться в пищу человеком или животными или рыбами или морскими животными, или быть в употреблении или применении у человека (например, в текстильной промышленности или в производстве косметических средств), или рассматриваться человеком (например, цветы или кусты ландшафтного дизайна или садов), или этот термин относится к растениям или водорослям или их частям, применяемым в промышленности или в коммерческих отраслях или в сфере образования.

Типы сельскохозяйственных растений, на которые могут оказывать благотворное влияние продукты и способы согласно настоящему изобретению, включают, без ограничений: пропашные культуры (например, кукурузу, сою, сорго, арахис, картофель и т.д.), полевые культуры (например, люцерну, пшеницу, зерновые и т.д.), древесные культуры (например, грецкий орех, миндаль, орех пекан, лещину, фисташки и т.д.), цитрусовые культуры (например, апельсин, лимон, грейпфрут и т.д.), плодовые культуры (например, яблони, груши, клубнику, чернику, ежевику и т.д.), дернистые растения (например, траву), декоративные растения (например, цветы, плющи и т.д.), овощи (например, томаты, морковь и т.д.), лозовые культуры (например, виноград и т.д.), лесные растения (например, сосну, ель, эвкалипт, тополь и т.д.), культивируемые пастбища (любую смесь растений, применяемую для пастбы животных).

Дополнительные примеры растений, на которые настоящее изобретение может оказывать полезный эффект, включают, без ограничений, зерновые и травы (например, пшеницу, ячмень, рожь, овес, рис, маис, сорго, кукурузу), свеклу

(например, сахарную или кормовую свеклу); плоды (например, виноград, клубнику, малину, чернику, семечковые, косточковые, сочные плоды, яблоки, груши, сливы, персики, миндаль, вишню или ягоды); бобовые культуры (например, бобы, чечевицу, горох или сою); масличные культуры (например, масличный рапс, горчицу, мак, 5 оливки, подсолнечник, кокосовые орехи, клещевину, какао-бобы или земляной орех); тыквенные культуры (например, тыкву, огурцы, тыкву крупноплодную или дыню); волокнистые растения (например, хлопок, лен, коноплю или джут); цитрусовые плодовые растения (например, апельсины, лимоны, грейпфруты или мандарины); овощи (например, шпинат, салат-латук, спаржу, капусту, морковь, лук, 10 томаты, картофель или болгарский перец); лавровые (например, авокадо, сассафрас лекарственный или камфару); а также табак, орехи, травы, специи, медицинские растения, кофе, баклажаны, сахарный тростник, чай, перец, культурный виноград, хмель, семейство подорожниковых, каучуконосы, цветы на срез и декоративные растения.

15 В некоторых примерах осуществления сельскохозяйственное растение представляет собой цитрусовое растение. Примеры цитрусовых растений согласно настоящему изобретению включают, без ограничений, апельсиновые деревья, лимонные деревья, лаймовые деревья и грейпфрутовые деревья. Другие примеры включают *Citrus maxima* (помело), *Citrus medica* (сладкий лимон), *Citrus micrantha* (папеда), *Citrus reticulata* (мандарин), *Citrus paradisi* (грейпфрут), *Citrus japonica* 20 (кумкват), *Citrus australasica* (лайм австралийский пальцевидный), *Citrus australis* (лайм австралийский круглый), *Citrus glauca* (лайм австралийский пустынный), *Citrus garrawayae* (горный белый лайм), *Citrus gracilis* (лайм какаду или лайм Humpty Doo), *Citrus inodora* (лайм Russel River), *Citrus warburgiana* (дикий лайм Новой Гвинеи), 25 *Citrus wintersii* (пальцевидный лайм Brown River), *Citrus halimii* (limau kadangsa, limau kedut kera), *Citrus indica* (дикий индийский апельсин), *Citrus macroptera* и *Citrus latipes*, *Citrus x aurantiifolia* (ки лайм, лайм нстоящий), *Citrus x aurantium* (апельсин горький), *Citrus x latifolia* (персидский лайм), *Citrus x limon* (лимон), *Citrus x limonia* (лимон кантонский красный), *Citrus x sinensis* (апельсин сладкий), *Citrus x tangerina* 30 (танжерин), лимон империал, танжелло, оранжелло, тангор, гибрид мандарина kinnow, гибрид kiyomi, танжелло Minneola, оробланко, гибрид агли (ugli), рука Будды (цитрон пальчатый), цитрон, апельсин-бергамот, апельсин-королек, каламондин, клементин, лимон Мейера и юдзу.

В некоторых примерах осуществления сельскохозяйственное растение родственно цитрусовому растению и представляет собой, например, муррею, лайм китайский и понцирус трехлисточковый (*Citrus trifolata*).

Дополнительные примеры целевых растений включают все растения, которые относятся к надсемейству Viridiplantae, в частности, однодольные и двудольные растения, включающие кормовые растения или кормовые бобовые культуры, декоративные растения, продовольственные сельскохозяйственные культуры, деревья или кустарники, выбранные из: *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Abelmoschus* spp., *Agave sisalana*, *Agropyron* spp., *Agrostis stolonifera*, *Allium* spp., *Amaranthus* spp., *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, *Annona* spp., *Apium graveolens*, *Arachis* spp., *Artocarpus* spp., *Asparagus officinalis*, *Avena* spp. (например, *A. sativa*, *A. fatua*, *A. byzantina*, *A. fatua* var. *sativa*, *A. hybrida*), *Averrhoa carambola*, *Bambusa* sp., *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsea*, *Beta vulgaris*, *Brassica* spp. (например, *B. napus*, *B. rapa* ssp. [канола, масличный рапс, репа масличная]), *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis sativa*, *Capsicum* spp., *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, *Carya* spp., *Carthamus tinctorius*, *Castanea* spp., *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*, *Cinnamomum* spp., *Citrullus lanatus*, *Citrus* spp., *Cocos* spp., *Coffea* spp., *Colocasia esculenta*, *Cola* spp., *Corchorus* sp., *Coriandrum sativum*, *Corylus* spp., *Crataegus* spp., *Crocus sativus*, *Cucurbita* spp., *Cucumis* spp., *Cynara* spp., *Daucus carota*, *Desmodium* spp., *Dimocarpus longan*, *Dioscorea* spp., *Diospyros* spp., *Echinochloa* spp., *Elaeis* (например, *E. guineensis*, *E. oleifera*), *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Erianthus* sp., *Eriobotrya japonica*, *Eucalyptus* sp., *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum* spp., *Fagus* spp., *Festuca arundinacea*, *Ficus carica*, *Fortunella* spp., *Fragaria* spp., *Ginkgo biloba*, *Glycine* spp. (например, *G. max*, *Soja hispida* или *Soja max*), *Gossypium hirsutum*, *Helianthus* spp. (например, *H. annuus*), *Hemerocallis fulva*, *Hibiscus* spp., *Hordeum* spp. (например, *H. vulgare*), *Ipomoea batatas*, *Juglans* spp., *Lactuca sativa*, *Lathyrus* spp., *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, *Lotus* spp., *Luffa acutangula*, *Lupinus* spp., *Luzula sylvatica*, *Lycopersicon* spp. (например, *L. esculentum*, *L. lycopersicum*, *L. pyriforme*), *Macrotyloma* spp., *Malus* spp., *Malpighia emarginata*, *Mammea americana*, *Mangifera indica*, *Manihot* spp., *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, *Melilotus* spp., *Mentha* spp., *Miscanthus sinensis*, *Momordica* spp., *Morus nigra*, *Musa* spp., *Nicotiana* spp., *Olea* spp., *Opuntia* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp. (например, *O. sativa*, *O. latifolia*), *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca sativa*, *Pennisetum* sp., *Persea* spp., *Petroselinum crispum*, *Phalaris arundinacea*, *Phaseolus* spp., *Phleum pratense*,

Phoenix spp., *Phragmites australis*, *Physalis* spp., *Pinus* spp., *Pistacia vera*, *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus* spp., *Prosopis* spp., *Prunus* spp., *Psidium* spp., *Punica granatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes* spp., *Ricinus communis*, *Rubus* spp., *Saccharum* spp., *Salix* sp., *Sambucus* spp., *Secale cereale*, *Sesamum* spp., *Sinapis* sp., *Solanum* spp. (например, *S. tuberosum*, *S. integrifolium* или *S. lycopersicum*), *Sorghum bicolor*, *Spinacia* spp., *Syzygium* spp., *Tagetes* spp., *Tamarindus indica*, *Theobroma cacao*, *Trifolium* spp., *Tripsacum dactyloides*, *Triticosecale rimpaui*, *Triticum* spp. (например, *T. aestivum*, *T. durum*, *T. turgidum*, *T. hybernum*, *T. macha*, *T. sativum*, *T. monococcum* или *T. vulgare*), *Tropaeolum minus*, *Tropaeolum majus*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vigna* spp., *Viola odorata*, *Vitis* spp., *Zea mays*, *Zizania palustris*, *Ziziphus* spp. и другие растения.

Целевые растения также могут включать, без ограничений, кукурузу (*Zea mays*), *Brassica* sp. (например, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), в частности, виды *Brassica*, подходящие в качестве источников масла из семян, люцерну (*Medicago sativa*), рис (*Oryza sativa*), рожь (*Secale cereale*), сорго (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), просо (например, просо американское (*Pennisetum glaucum*), просо обыкновенное (*Panicum miliaceum*), просо итальянское (*Setaria italica*), просо пальчатое (*Eleusine coracana*)), подсолнечник (*Helianthus annuus*), сафлор (*Carthamus tinctorius*), пшеницу (*Triticum aestivum*), сою (*Glycine max*), табак (*Nicotiana tabacum*), картофель (*Solanum tuberosum*), арахис (*Arachis hypogaea*), хлопок (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), сладкий картофель (*Ipomoea batatas*), маниок (*Manihot esculenta*), кофе (*Coffea* spp.), кокос (*Cocos nucifera*), ананас (*Ananas comosus*), цитрусовые деревья (*Citrus* spp.), растения какао (*Theobroma cacao*), чайные растения (*Camellia sinensis*), банан (*Musa* spp.), авокадо (*Persea americana*), инжир (*Ficus casica*), гуаву (*Psidium guajava*), манго (*Mangifera indica*), оливковое дерево (*Olea europaea*), папайю (*Carica papaya*), кешью (*Anacardium occidentale*), макадамиию (*Macadamia integrifolia*), миндаль (*Prunus amygdalus*), сахарную свеклу (*Beta vulgaris*), сахарный тростник (*Saccharum* spp.), овес, ячмень, овощные растения, декоративные растения и хвойные растения.

Целевые овощные растения включают томаты (*Lycopersicon esculentum*), салат-латук (например, *Lactuca sativa*), зеленые бобы (*Phaseolus vulgaris*), лимскую фасоль (*Phaseolus limensis*), горох (*Lathyrus* spp.) и члены рода *Cucumis*, такие как огурец (*C. sativus*), мускусная дыня (*C. cantalupensis*) и дыня-кantalупка (*C. melo*). Декоративные растения включают азалию (*Rhododendron* spp.), гортензию (*Macrophylla hydrangea*), гибискус (*Hibiscus rosasanensis*), розы (*Rosa* spp.),

тюльпаны (*Tulipa* spp.), нарциссы (*Narcissus* spp.), петунии (*Petunia hybrida*), гвоздику (*Dianthus caryophyllus*), пуансеттию (*Euphorbia pulcherrima*) и хризантему. Хвойные растения, которые могут быть обработаны в соответствии с примерами осуществления изобретения, включают, например, сосну, такую как сосна ладанная (5 *Pinus taeda*), сосна Эллиота (*Pinus elliotii*), сосна орегонская (*Pinus ponderosa*), сосна скрученная широкохвойная (*Pinus contorta*) и сосна лучистая (*Pinus radiata*); тиссолистную лжетсугу (*Pseudotsuga menziesii*); тсугу западную (*Tsuga canadensis*); ель ситхинскую (*Picea glauca*); секвойю вечнозеленую (*Sequoia sempervirens*); пихту, такую как пихта миловидная (*Abies amabilis*) и пихта бальзамическая (*Abies 10 balsamea*); и тую, такую как туя гигантская (*Thuja plicata*) и каллитропис нутканский (*Chamaecyparis nootkatensis*). Растения примеров осуществления включают сельскохозяйственные растения (например, кукурузу, люцерну, подсолнечник, капусту, сою, хлопок, сафлор, арахис, сорго, пшеницу, просо, табак и т.д.), такие как кукуруза и соя.

15 Целевые виды газонной травы включают, без ограничений: мятлик однолетний (*Poa annua*); райграс однолетний (*Lolium multiflorum*); мятлик сплюснутый (*Poa compressa*); овсяницу красную (*Festuca rubra*); полевицу волосовидную (*Agrostis tenuis*); полевицу болотную (*Agrostis palustris*); житняк гребенчатый (*Agropyron desertorum*); пырей пустынный (*Agropyron cristatum*); 20 овсяницу жестковатую (*Festuca longifolia*); мятлик луговой (*Poa pratensis*); ежу скученную (*Dactylis glomerate*); райграс пастбищный (*Lolium perenne*); овсяницу красную (*Festuca rubra*); полевицу белую (*Agrostis alba*); мятлик обыкновенный (*Poa trivialis*); овсяницу овечью (*Festuca ovine*); костер безостый (*Bromus inermis*); овсяницу тростниковую (*Festuca arundinacea*); тимофеевку (*Phleum pratense*); 25 полевицу собачью (*Agrostis canine*); бескильницу расставленную (*Puccinellia distans*); пырей Смита (*Agropyron smithii*); свинорой (*Cynodon* spp.); августинову траву (*Stenotaphrum secundatum*); цойсию японскую (*Zoysia* spp.); гречку заметную (*Paspalum notatum*); аксонопус афинский (*Axonopus affinis*); эремохлою змеехвостую (*Eremochloa ophiuroides*); кикую (*Pennisetum clandestinum*); морской паспалум 30 (*Paspalum vaginatum*); бутелоа изящную (*Bouteloua gracilis*); бизонову траву (*Buchloe dactyloids*); бутелоа коротконисходящую (*Bouteloua curtipendula*).

Дополнительные значимые растения включают зерновые растения, дающие значимые семена, масличные семенные растения и бобовые растения. Значимые семена включают семена зерновых культур, таких как кукуруза, пшеница, ячмень, 35 рис, сорго, рожь, просо и т.д. Масличные семенные растения включают хлопок, сою,

сафлор, подсолнечник, капусту полевую, маис, люцерну, пальму, кокос, лен, клещевину, оливковые деревья и т.д. Бобовые растения включают бобы (фасоль) и горох. Бобовые растения включают гуаровые бобы, рожковое дерево, пажитник, соевые бобы, фасоль обыкновенную, вигну китайскую, маш, лимскую фасоль, 5 стручковую фасоль, чечевицу, турецкий горох и т.д.

Дополнительные значимые растения включают коноплю (например, коноплю культурную, индийскую и сорную) и промышленную коноплю.

Все растения и части растений могут быть обработаны в соответствии с изобретением. В этом контексте под растениями понимают все растения и 10 популяции растений, такие как полезные и неполезные дикие растения или сельскохозяйственные растения (включая природные виды сельскохозяйственных растений). Сельскохозяйственные растения могут представлять собой растения, которые могут быть получены традиционными способами скрещивания и оптимизации или биотехнологическими и рекомбинантными методиками или 15 комбинациями таких способов, и включают трансгенные растения и сорта растений.

Части растений означают все надземные и подземные части и органы растений, такие как побег, лист, цветок и корень, неограничивающие примеры которых могут включать: листья, шипы, черенки, стебли, цветки, плодовые тела, 20 плоды и семена, а также корни, клубни и ризомы. Части растений также включают материал культуры и материал для вегетативного и генеративного размножения, например, черенки, клубни, ризомы, отводки и семена.

В некоторых примерах осуществления растение представляет собой растение, пораженное патогенным заболеванием или вредителем. В конкретных 25 примерах осуществления растение поражено позеленением цитрусовых и/или раком цитрусовых и/или вредителем, который переносит указанные заболевания.

ОПИСАНИЕ ПРИМЕРОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Для лучшего понимания настоящего изобретения и его многочисленных преимуществ ниже приведены примеры, предназначенные для иллюстрации 30 изобретения. Приведенные ниже примеры иллюстрируют некоторые из способов, применений, примеров осуществления и вариантов настоящего изобретения. Они не ограничивают объем изобретения. В приведенные примеры осуществления изобретения могут быть внесены различные изменения и модификации.

Пример 1Твердофазная ферментация микроорганизмов *Bacillus*

Для получения спор *Bacillus spp.* используют среду на основе пшеничных отрубей. Среду распределяют по кюветам из нержавеющей стали в виде слоя
5 толщиной приблизительно от 1 до 2 дюймов (что составляет приблизительно от 2,54 до 5,08 см) и стерилизуют.

После стерилизации кюветы инокулируют посевной культурой. Для улучшения роста микроорганизмов необязательно могут быть включены добавочные питательные вещества, включающие, например, соли и/или источники
10 углерода, такие как патока, крахмалы, глюкоза и сахароза. Для повышения скорости роста и улучшения подвижности и распределения бактерий по культуральной среде в культуру может быть добавлен картофельный экстракт или экстракт банановой кожуры.

Затем споры выбранного штамма *Bacillus* распыляют или наносят пипеткой
15 на поверхность субстрата, и кюветы инкубируют при температуре от 32 до 40°C. Для стабилизации температуры через сушильный шкаф прокачивают воздух из окружающей среды. В результате инкубации в течение 48-72 часов может быть получено 1×10^{10} спор/грамм или более штамма.

Пример 220 Твердофазная ферментация грибковых спор

Для выращивания *Trichoderma spp.* 250 г никстамализированной кукурузной муки смешивают с деионизированной водой и стерилизуют в кювете из нержавеющей стали, герметично закрытой крышкой и лентами для кюветы. Среду из кукурузной муки инокулируют в асептических условиях посевной культурой
25 *Trichoderma* распылением или из пипетки. Затем кюветы инкубируют при 30°C в течение 10 суток. Спустя 10 суток можно собрать приблизительно 10^9 единиц размножения/грамм или более *Trichoderma*. Единицами размножения *Trichoderma* (конидий и/или гифы), собранными из одной партии, можно обработать, например, от 1000 до 2000 акров земли (приблизительно от 405 до 809 га).

Пример 3

Получение продукта на основе микроорганизмов

Микроорганизмы, субстрат и любые остаточные питательные вещества, образующие в результате получения способами, рассмотренными в Примерах 1 и 2, могут быть смешаны и/или измельчены и высушены с образованием гранул или порошкообразного вещества. Различные штаммы микроорганизмов получают по отдельности и затем смешивают либо до, либо после сушки.

Для хранения и транспортировки продукта, содержащего смесь из 10^9 клеток/г *T. harzianum* и 10^{10} клеток/г *B. amyloliquefaciens* может быть применен герметизируемый пакет. В продукт могут быть добавлены питательные микроэлементы или аналогично получаемые микроорганизмы.

Для подготовки к использованию сухой продукт растворяют в воде. Концентрация может достигать величины, составляющей по меньшей мере от 5×10^9 до 5×10^{10} клеток/мл. Продукт затем разбавляют водой в резервуаре для смешивания до концентрации, составляющей от 1×10^6 до 1×10^7 клеток/мл.

Один пакет может быть применен для обработки приблизительно 20 акров (приблизительно 8 га) сельскохозяйственной культуры или 10 акров (приблизительно 4 га) цитрусовой рощи.

Пример 4

Обработка корней апельсиновых деревьев, Ft. Basinger, Флорида

Композицией для обработки почвы согласно настоящему изобретению (называемой Rhizolizer™), включающей 37,5 мл культуры *Trichoderma harzianum*, 37,5 мл культуры *Bacillus amyloliquefaciens subsp. locus* и 2 кварты (приблизительно 1,9 л) экстракта ламинарии, два раза обрабатывали апельсиновые деревья, выращиваемые в саду в Ft. Basinger, Флорида. Сравнивали массу корней в сыром состоянии (свежих) и массу сухого вещества корней у обработанных растений и необработанных контрольных растений.

Как показано в Таблице 1, измеренные величины средней массы корней в период наибольшего развития у растений, обработанных Rhizolizer™, как в случае сухой массы (Фиг. 1A), так и массы свежих корней, превышали соответствующие

показатели растений, выращенных в соответствии со стандартной практикой производителей (необработанный контроль).

Таблица 1

Измерения средней массы корней в период наибольшего развития необработанных контрольных растений (КБО, сокр. от “контроль без обработки”) и растений, обработанных Rhizolizer™ (Обработка В)

Код обработки	Обработка	Номер обработки	Масса сухого вещества (г)	Масса свежего материала (г)
КБО	КБО	1	8,75	33,97
КБО	КБО	2	12,26	45,77
			Итого	21,01
				79,74
ОБРАБОТКА В	TDH10/BCA10	1	19,8	80,18
ОБРАБОТКА В	TDH10/BCA10	2	16,79	67,64
			Итого	36,59
				147,82

Где TDH означает “*Trichoderma harzianum*”, BCA означает “*Bacillus amyloliquefaciens subsp. Locus*”

Пример 5

10 Обработка корней грейпфрутовых деревьев, ft. Pierce, Флорида

Композицией для обработки почвы согласно настоящему изобретению (называемой Rhizolizer™), включающей 37,5 мл культуры *Trichoderma harzianum*, 37,5 мл культуры *Bacillus amyloliquefaciens subsp. locus* и 2 кварты (приблизительно 1,9 л) экстракта ламинарии, четыре раза обрабатывали грейпфрутовые деревья, выращиваемые в садах в Ft. Pierce, Флорида. Повторные обработки проводили каждые два месяца. После четвертой обработки сравнивали массу корней в сыром состоянии (свежих) и массу сухого вещества корней у обработанных растений и необработанных контрольных растений.

Измеренные величины средней массы корней в период наибольшего развития у растений, обработанных Rhizolizer™, как в случае сухой массы (Фиг. 1B), так и массы свежих/влажных корней, превышали соответствующие показатели

растений, выращенных в соответствии со стандартной практикой производителей (необработанный контроль).

Пример 6

Обработка цитрусовых во Флориде

5 Цитрусовые растения, выращиваемые в различных округах Флориды, были обработаны композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения, и полученные результаты сравнивали с данными, полученными для необработанных контрольных растений (практика производителей). Изучали массу корней, рост побегов, плотность кроны, диаметр
10 ствола, размер плодов, содержание сахара по шкале Брикса в плодах и урожайность (масса коробок).

На Фиг. 2 показана масса сухого вещества корней грейпфрутовых деревьев, выращиваемых в St. Lucie County. Обработку композицией для обработки почвы производили раз в квартал, всего проводя 8 обработок (1,5 жидких унций/акр (что
15 приблизительно составляет 0,1 л/га) каждый раз). Наблюдали 153% прирост массы сухого вещества корней по сравнению с растениями, обрабатываемыми в соответствии с обычной практикой производителей.

На Фиг. 3А показана масса сухого вещества корней (г/образец) апельсиновых деревьев Hamlin, выращиваемых в Highlands County. Обработку композицией для
20 обработки почвы производили раз в квартал, всего производили 3 обработки (1,5 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,1 л/га) каждый раз). Наблюдали 76% прирост массы сухого вещества корней по сравнению с растениями, обрабатываемыми в соответствии с обычной практикой производителей. На Фиг. 3В показана масса сухого вещества корней (г/образец) белых грейпфрутов,
25 выращиваемых в St. Lucie County. Обработку композицией для обработки почвы производили раз в квартал, всего производили 3 обработки (1,5 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,1 л/га) каждый раз). Наблюдали 82% прирост массы сухого вещества корней по сравнению с растениями, обрабатываемыми в соответствии с обычной практикой производителей.

30 На Фиг. 4А показана средняя масса корней (г) апельсиновых деревьев Hamlin, выращиваемых в Polk County. Обработку композицией для обработки почвы производили раз в квартал, всего производили 4 обработки (1,5 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,1 л/га) в первых трех обработках; 3 жидких

унций/акр (что приблизительно составляет 0,2 л/га) в последней обработке). Наблюдали 93% прирост средней массы корней. На Фиг. 4В показана средняя масса корней (г) апельсиновых деревьев Valencia, выращиваемых в Collier County. Обработку композицией для обработки почвы производили раз в квартал, всего производили 4 обработки (1,5 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,1 л/га) в первых трех обработках; 3 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,2 л/га) в последней обработке). Наблюдали 35% прирост средней массы корней.

На Фиг. 5А-5В показана процентная доля деревьев с ростом новых побегов (5А) и среднее количество побегов (5В) у молодых апельсиновых деревьев Valencia, выращиваемых в Highlands County. Обработку композицией для обработки почвы проводили дважды в месяц, всего производили 6 обработок (1,5 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,1 л/га) каждый раз). Наблюдали повышение процентной доли деревьев с ростом новых побегов на 73%, и было установлено, что в среднем молодые деревья образовывали на 38 побегов больше.

На Фиг. 6А-6В показано увеличение плотности кроны у взрослых апельсиновых деревьев Hamlin (6А) и молодых апельсиновых деревьев Hamlin (6В) в Highlands County. Обработку композицией для обработки почвы производили раз в квартал, всего производили 3 обработки (1,5 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,1 л/га) каждый раз). У взрослых деревьев визуально наблюдали прирост кроны на 19%, а у молодых деревьев наблюдали прирост кроны на 33%.

На Фиг. 7 показано среднее изменение диаметра ствола у молодых апельсиновых деревьев Valencia, выращиваемых в Highlands County. Обработку композицией для обработки почвы проводили дважды в месяц, всего производили 4 обработки (1,5 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,1 л/га) каждый раз). У обработанных растений в период с февраля по октябрь наблюдали увеличение диаметра ствола на 102%, в то время как у растений, обрабатываемых в соответствии с обычной практикой производителей, наблюдали увеличение диаметра ствола только на 81%.

На Фиг. 8А-8В показана масса плода белых грейпфрутов (8А) и диаметр красных грейпфрутов Ruby Red (8В), выращиваемых в Charlotte County. Обработку композицией для обработки почвы производили раз в квартал, всего производили 4 обработки (1,5 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,1 л/га) каждый раз). У белых грейпфрутов наблюдали 6% прирост массы, и у красных грейпфрутов Ruby наблюдали увеличение диаметра на 2%.

На Фиг. 9А-9В показаны величины по шкале Брикса плодов белых грейпфрутов, выращиваемых в Lucie County (9А) и Charlotte County (9В). В Lucie County обработку композицией для обработки почвы проводили дважды в месяц, всего производили 5 обработок (1,5 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,1 л/га) каждый раз), и в Charlotte County обработку композицией раз в квартал, всего производили 3 обработки (1,5 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,1 л/га) каждый раз). В грейпфрутах, выращенных в Lucie County, наблюдали повышение градуса по шкале Брикса на 4%, и в грейпфрутах, выращенных в Charlotte County, наблюдали повышение градуса по шкале Брикса на 8%.

На Фиг. 10А-10В показана масса коробок с апельсинами Hamlin, выращенными двумя разными производителями в Lake County. Обработку композицией для обработки почвы производили раз в квартал, и всего производили 4 обработки (1,5 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,1 л/га) каждый раз). Производитель 1 наблюдал повышение массы на 42% (10А), и Производитель 2 наблюдал повышение массы на 14% (10В).

На Фиг. 11А-11В показан выраженный в фунтах твердого вещества общий собранный урожай апельсинов Hamlin, выращенных двумя разными производителями в Lake County. Обработку композицией для обработки почвы производили раз в квартал, и всего производили 4 обработки (1,5 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,1 л/га) каждый раз). Производитель 1 наблюдал повышение массы на 32% (11А), и Производитель 2 наблюдал повышение массы на 9% (11В).

На Фиг. 12А-12В показан выраженный в фунтах твердого вещества общий собранный урожай на одну коробку (12А) и на один акр (12В) апельсинов Hamlin, выращенных в Polk County. Обработку композицией для обработки почвы проводили дважды в месяц, и всего производили 4 обработки (1,5 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,1 л/га) каждый раз). Наблюдали 5% повышение в фунтах твердого вещества на коробку и 6% повышение в фунтах твердого вещества на акр.

Пример 7Испытания на поле с томатами, Central Valley, Калифорния

Композицией для обработки почвы согласно настоящему изобретению (называемой Rhizolizer™), включающей 37,5 мл культуры *Trichoderma harzianum*,
 5 37,5 мл культуры *Bacillus amyloliquefaciens subsp. locus* и 2 кварты (приблизительно 1,9 л) экстракта ламинарии, три раза с интервалом, составляющим от 26 до 33 суток, обрабатывали растения томатов. Спустя приблизительно 29-32 суток после третьей обработки собирали плоды томатов и определяли урожай. Урожаи (в тоннах) определяли на участках площадью 10 футов x 5 футов (0,001 акр
 10 (приблизительно 4 м²)) и рассчитывали урожайность с одного акра.

Как показано на Фиг. 13А, сравнивали урожаи красных плодов (столбики диаграммы) и общие урожаи плодов (ромбы) на растениях, обработанных в соответствии с данными, показанными в Таблице 2.

Таблица 215 Обработка почвы при исследовании воздействия на томаты

1	Контрольная группа без обработки
2	37,85 мл культуры <i>Trichoderma harzianum</i> + 37,85 мл культуры <i>Bacillus amyloliquefaciens subsp. locus</i>
3	37,85 мл культуры <i>Trichoderma harzianum</i> + 37,85 мл культуры <i>Bacillus amyloliquefaciens subsp. locus</i> + 1,89 мл картофельного экстракта
4	37,85 мл культуры <i>Trichoderma harzianum</i> + 37,85 мл культуры <i>Bacillus amyloliquefaciens subsp. locus</i> + 1 л гумата + 2 фунта (приблизительно 0,9 кг) патоки
5	Rhizolizer™
6	2 части Terra Treat™
7	Коммерческий контроль (Viusid 3, 1,5 и 2,3 жидких унций/акр (что составляет 0,2, 0,1 и 0,15 л/га)).

Как показано на Фиг. 13А-13В, от томатов, обработанных Rhizolizer™, получали 42 тонн красных плодов с одного акра (из 48 тонн всех плодов с одного акра), в то время как от необработанных контрольных растений получали 30 тонн
 20 красных плодов с одного акра (из 38 тонн всех плодов с одного акра).

Пример 8Испытания на поле с томатами, Fresno County, Калифорния

Произрастающие в Fresno County, Калифорния, томаты были обработаны композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения (“Rhizolizer™”), и полученные результаты сравнивали с данными, полученными для необработанных контрольных растений (стандартная практика производителей). Определяли урожаи, величины по шкале Брикса и массу сухого вещества корней.

На Фиг. 14А показаны общие урожаи (мТ) с одного акра подходящих для продажи плодов томатов, которые ежемесячно обрабатывали композицией для обработки почвы; всего производили 3 обработки (3 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,2 л/га) каждый раз). Наблюдала 40% повышение урожая по сравнению с растениями, обрабатываемыми в соответствии с обычной практикой производителей.

На Фиг. 14В показаны величины по шкале Брикса, определенные для плодов томатов, которые ежемесячно обрабатывали композицией для обработки почвы; всего производили 3 обработки (3 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,2 л/га) каждый раз). Наблюдала повышение градуса по шкале Брикса на 26% по сравнению с необработанными контрольными растениями.

На Фиг. 15А показана масса сухого вещества корней (г) томатов, один раз обработанных композицией для обработки почвы с расходом 3 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,2 л/га). Наблюдала увеличение массы корней на 50% по сравнению с необработанными контрольными растениями. На Фиг. 15В показаны корни томатов, взятые от растения томата. Корни обработанного растения (нижнее изображение) были визуально плотнее, чем корни растения, обработанного в соответствии с обычной практикой производителей (верхнее изображение).

Пример 9Исследование роста ствола деревьев миндаля в Калифорнии

В течение 5 месяцев определяли увеличение диаметра ствола миндальных деревьев, выращиваемых в Sege, Калифорния, которые обрабатывали в соответствии с восьмью различными типами обработки почвы. Применяемые восемь типов обработки почвы представлены в Таблице 3.

Таблица 3

Обработка почвы при определении роста стволов миндальных деревьев

1	Положительный контроль
2	Культура <i>Trichoderma harzianum</i> 0,001% об./об.
3	Культура <i>Trichoderma harzianum</i> 0,01% об./об.
4	Культура <i>Trichoderma harzianum</i> 0,1% об./об.
5	Культура <i>Trichoderma harzianum</i> 0,001% об./об. + культура <i>Bacillus amyloliquefaciens subsp. locus</i> 0,001% об./об.
6	Культура <i>Trichoderma harzianum</i> 0,01% об./об. + культура <i>Bacillus amyloliquefaciens subsp. locus</i> 0,01% об./об. (Rhizolizer™)
7	Культура <i>Trichoderma harzianum</i> 0,1% об./об. + культура <i>Bacillus amyloliquefaciens subsp. locus</i> 0,1% об./об.
8	Контроль без обработки

5 На Фиг. 16А показаны результаты измерений диаметра ствола деревьев; так, в результате обработки #6, считая от левого края (Rhizolizer™), диаметр ствола изменился на 1,25 мм, в то время как контрольные деревья без обработки показали прирост диаметра ствола только на 0,96 мм. На Фиг. 16В показан рост с течением времени диаметра стволов деревьев, обрабатываемых Rhizolizer™.

Пример 1010 Исследование цветения миндаля/завязывания орехов

15 Выращиваемые в San Joaquin County, Калифорния, миндальные деревья были обработаны композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), и их сравнивали с необработанными контрольными растениями (стандартная практика производителей). Обработку композицией для обработки почвы проводили дважды, после сбора урожая, при расходе 3 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,2 л/га) в каждой обработке.

20 После цветения подсчитывали количество завязей орехов. Количество завязей орехов на обработанных деревьях на 21% превышало их количество на необработанных контрольных деревьях (Фиг. 17).

Пример 11Испытания на поле с арбузами

Растения арбузов, выращиваемых в Hillsborough County, Флорида, дважды обрабатывали Rhizolizer™ (одна обработка в месяц на протяжении двух месяцев) и сравнивали их с растениями арбузов, обрабатываемыми в соответствии со стандартной практикой производителей. На Фиг. 18А-18F показано сравнение размеров корней (А-В), количества цветков (С), количества плодов (D), урожаев (Е), массы и величин по шкале Брикса (F) обработанных растений и растений, обрабатываемых в соответствии со стандартной практикой производителей; очевидно, что наблюдается повышение всех показателей.

Пример 12Испытания на поле с мускусными дынями

Растения мускусной дыни, выращиваемые в Polk County, Флорида, дважды обрабатывали Rhizolizer™ (одна обработка в месяц на протяжении двух месяцев) и сравнивали их с растениями дыни, обрабатываемыми в соответствии со стандартной практикой производителей. На Фиг. 19А показано увеличение количества цветков, и на Фиг. 19В показан средний урожай подходящих для сбора плодов с обработанных растений в сравнении с урожаем необработанных растений, выращиваемых в соответствии со стандартной практикой производителей; при этом наблюдалось повышение всех показателей.

Пример 13Испытания на поле с картофелем

Растения картофеля из разных местностей были обработаны композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), и их сравнивали с необработанными контрольными растениями (стандартная практика производителей). Определяли всходы после посадки, урожай и качество картофеля.

На Фиг. 20А-20В показаны всходы растений картофеля Yellow Rose Russet в Imperial County, Калифорния, спустя 5 недель после посадки (А), и гибридных сортов, спустя 6 недель после посадки (В). Композицию для обработки почвы вносили один раз во время посадки при расходе 1 жидкая унция/акр (что

приблизительно составляет 0,067 л/га). Спустя 5 недель прирост картофеля Yellow Rose Russet по сравнению с картофелем, выращиваемым в соответствии со стандартной практикой производителей, составил 246% (растений/линейные 867 футов (что приблизительно составляет 264 м)). Спустя 6 недель, прирост картофеля гибридных сортов по сравнению с картофелем, выращиваемым в соответствии со стандартной практикой производителей, составил 56% (растений/линейные 1250 футов (что приблизительно составляет 381 м)).

На Фиг. 21A-21B показаны урожаи картофеля Reveille Russet Fresh Market Baking, выращиваемого в Hartley County, Техас (A), и картофеля Russet Burbank, выращиваемого в Walworth County, Висконсин (B). Обработку Reveille Russets композицией для обработки почвы проводили один раз при посадке с расходом 3 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,2 л/га). Было показано, что урожай обработанных растений на 31% превышал урожай растений, выращиваемых в соответствии со стандартной практикой производителей (Фиг. 21A). Картофель Russet Burbank обрабатывали композицией для обработки почвы 3 раза с расходом 3 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,2 л/га) каждый раз. После обработки номер 3 наблюдали 5% прирост по сравнению с растениями, выращиваемыми в соответствии со стандартной практикой производителей (Фиг. 21B).

На Фиг. 22A-22B показано качество урожая картофеля Russet Burbank (22A) и выхода в соответствии с качеством картофеля Colomba (22B). Картофель Russet Burbank обрабатывали до 3 раз композицией для обработки почвы; при этом в группах, полученных после 1 обработки, 2 обработок и 3 обработок, наблюдали увеличение количества клубней No. 1 (Фиг. 22A). Картофель Colomba обрабатывали ежемесячно, всего производили 3 обработки. Наблюдали 26% увеличение количества клубней Качества А по сравнению с картофелем, выращиваемым в соответствии со стандартной практикой производителей.

Пример 14

Испытания на поле с клубникой

Выращиваемые в Hillsborough County, Флорида, растения клубники были обработаны композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("RhizolizerTM"), и их сравнивали с

необработанными контрольными растениями (стандартная практика производителей).

Диаметр и массу плода определяли в двух группах клубники Radiance, дважды обработанной композицией для обработки почвы при расходе 3 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,2 л/га) (Фиг. 23А). Наблюдали 6% и 8,5% увеличение диаметра плода у обработанной клубники по сравнению с клубникой, выращенной в соответствии со стандартной практикой производителей. Наблюдались видимые различия в размере плодов у обработанной и необработанной клубники (Фиг. 23В). Кроме того, по сравнению с необработанной контрольной группой в обработанных двух группах наблюдали 15% и 17% повышение массы (г) плодов (Фиг. 23С).

Кроме того, сравнивали величины по шкале Брикса, ширину кроны, массу корней, количество плодов, среднее количество корзин/акр и общее количество корзин сравнивали с теми же показателями растений, выращенных в соответствии со стандартной практикой производителей:

у клубники Radiance, которую 2 раза в месяц обрабатывали композицией для обработки почвы с расходом 3 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,2 л/га) наблюдали 11% повышение величины градуса по шкале Брикса (Фиг. 24);

у клубники Brilliance, которую 5 раз в месяц обрабатывали композицией для обработки почвы с расходом 6 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,4 л/га) наблюдали увеличение ширины кроны (дюймы) на 6% (Фиг. 25);

у клубники Brilliance, которую 2 раза в месяц обрабатывали композицией для обработки почвы с расходом 6 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,4 л/га) наблюдали увеличение массы корней (г/растение) на 20% (Фиг. 26);

у клубники Radiance, которую 2 раза в месяц обрабатывали композицией для обработки почвы с расходом 3 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,2 л/га) наблюдали увеличение среднего количества плодов на 7% (Фиг. 27); и

у клубники Radiance, которую 4 раза в месяц обрабатывали композицией для обработки почвы с расходом 3 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,2 л/га) наблюдали увеличение количества корзин/акр на 22% (Фиг. 28А) и общее увеличение количества корзин на 22%.

Пример 15Испытания на поле с кукурузой

Растения кукурузы сорта DKC 56-45, выращиваемой в Walworth County, Висконсин, были обработаны композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения (“Rhizolizer™”) либо один раз при посадке, либо один раз в середине сезона, или дважды (один раз при посадке и один раз в середине сезона). Обработанные группы сравнивали с необработанной контрольной группой (стандартная практика производителей).

Определяли массу корней (г), жизненный тонус растений (по шкале от 1 до 5) и урожай (бушели/акр). Дважды обработанная группа показала наибольшее увеличение массы корней (24%) (Фиг. 29), жизненного тонуса (Фиг. 30) и урожая (5%) (Фиг. 31) по сравнению с растениями, обрабатываемыми в соответствии с обычной практикой производителей.

Пример 16Испытания на поле с хлопком

Две группы растений хлопка, выращиваемых в Lubbock County, Техас, были обработаны композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения (“Rhizolizer™”), и их сравнивали с необработанной контрольной группой растений (стандартная практика производителей).

Каждую группу трижды обрабатывали (раз в две недели) композицией для обработки почвы с расходом 3 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,2 л/га). Расчетные урожаи хлопка, выражаемые в фунтах хлопка с одного акра, в двух обработанных группах были выше на 14% и 10%, соответственно, по сравнению с растениями, обрабатываемыми в соответствии с обычной практикой производителей (Фиг. 32).

Пример 16Испытания на поле с табаком

Растения табака сорта CC1063, выращиваемого в Lenoir County, Северная Каролина, были обработаны композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения (“Rhizolizer™”), и их сравнивали с

необработанными контрольными растениями (стандартная практика производителей).

5 Растения обрабатывали один раз при пересадке (3 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,2 л/га)). Определяли среднее содержание хлорофилла (относительную зеленость), среднюю ширину листа (дюймы) и среднюю длину листа (дюймы). Наблюдали повышение относительной зелености на 4%, увеличение ширины листа на 35% и увеличение длины листа на 18% (Фиг. 33).

Пример 16

Испытания на поле с арахисом

10 Выращиваемый в Bulloch County, Джорджия, арахис Runner был обработан композицией для обработки почвы согласно одному из примеров осуществления настоящего изобретения ("Rhizolizer™"), и растения сравнивали с необработанными контрольными растениями (стандартная практика производителей).

15 Растения обрабатывали один раз при посадке (3 жидких унций/акр (что приблизительно составляет 0,2 л/га)). Расчетные урожаи (фунт/акр) повышались на 4% по сравнению с растениями, обрабатываемыми в соответствии с обычной практикой производителей (Фиг. 34).

Пример 19

Штаммы микроорганизмов

20 Для осуществления настоящего изобретения применяют полезные штаммы микроорганизмов. Штаммы *Trichoderma harzianum* могут включать, без ограничений, следующие штаммы: T-315 (ATCC 20671); T-35 (ATCC 20691); 1295-7 (ATCC 20846); 1295-22 [T-22] (ATCC 20847); 1295-74 (ATCC 20848); 1295-106 (ATCC 20873); T12 (ATCC 56678); WT-6 (ATCC 52443); Rifa T-77 (CMI CC 333646); T-95 (60850); T12m
25 (ATCC 20737); SK-55 (No. 13327; BP 4326 NIBH (Япония)); RR17Bc (ATCC PTA 9708); TSHTH20-1 (ATCC PTA 10317); AB 63-3 (ATCC 18647); OMZ 779 (ATCC 201359); WC 47695 (ATCC 201575); m5 (ATCC 201645); (ATCC 204065); UPM-29 (ATCC 204075); T-39 (EPA 119200); и/или F11Bab (ATCC PTA 9709).

30 Штаммы *Bacillus amyloliquefaciens* могут включать, без ограничений, штаммы FZB24 (EPA 72098-5; BGSC 10A6), TA208, NJN-6, N2-4, N3-8 и штаммы, имеющие учетные номера ATCC (American Type Culture Collection – Американская коллекция

типовых культур: 23842, 23844, 23843, 23845, 23350 (штамм DSM 7), 27505, 31592, 49763, 53495, 700385, ВАА-390, РТА-7544, РТА-7545, РТА-7546, РТА-7549, РТА-7791, РТА-5819, РТА-7542, РТА-7790 и/или РТА-7541.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 5 1. Композиция для обработки почвы для улучшения иммунитета, здоровья, роста и/или урожайности растения, где композиция включает первый микроорганизм и второй микроорганизм и/или побочный продукт, выделяемый при росте первого и/или второго микроорганизма, где как первый микроорганизм, так и второй микроорганизм являются непатогенными образующими споры микроорганизмами, и первый микроорганизм представляет собой грибок *Trichoderma spp.*, а второй микроорганизм представляет собой бактерию *Bacillus spp.*
- 10 2. Композиция по пункту 1, в которой грибок *Trichoderma* представляет собой *Trichoderma harzianum*.
3. Композиция по пункту 1, в которой бактерия *Bacillus* представляет собой *Bacillus amyloliquefaciens*.
- 15 4. Композиция по пункту 3, в которой бактерия *Bacillus* представляет собой *Bacillus amyloliquefaciens subsp. locus*.
5. Композиция по пункту 1, где отношение численностей клеток *Trichoderma / Bacillus* в композиции составляет 1:4.
- 20 6. Композиция по пункту 1, дополнительно включающая один или более дополнительных микроорганизмов, выбранных из *Mycococcus xanthus*, *Azotobacter vinelandii* и *Frateuria aurantia*.
7. Композиция по пункту 1, дополнительно включающая одно или более из следующих веществ: глюкозу, глицерол и глицерин.
- 25 8. Композиция по пункту 1, дополнительно включающая один или более пребиотиков, выбранных из экстракта ламинарии, фульвовой кислоты, хитина, гумата и гуминовой кислоты.
9. Композиция по пункту 1, выполненная в виде сухого порошка или сухих гранул.
10. Способ улучшения иммунитета, здоровья, роста и/или урожайности растения, где способ включает нанесение

первого микроорганизма и/или побочного продукта, выделяемого при его росте, и

второго микроорганизма и/или побочного продукта, выделяемого при его росте,

- 5 на растение и/или окружающую его среду, где первый микроорганизм представляет собой образующий споры грибок *Trichoderma* spp., а второй микроорганизм представляет собой образующую споры бактерию *Bacillus* spp.

11. Способ по пункту 10, дополнительно включающий внесение питательных веществ и/или пребиотиков для выращивания микроорганизмов.

- 10 12. Способ по пункту 10, в котором грибок *Trichoderma* представляет собой *Trichoderma harzianum*.

13. Способ по пункту 12, в котором бактерия *Bacillus* представляет собой *Bacillus amyloliquefaciens*.

- 15 14. Способ по пункту 13, в котором бактерия *Bacillus* представляет собой *Bacillus amyloliquefaciens subsp. locus*.

15. Способ по пункту 10, в котором композицию для обработки почвы, включающую первый микроорганизм и второй микроорганизм и/или один или более побочных продуктов, выделяемых при их росте, наносят на растение и/или окружающую его среду.

- 20 16. Способ по пункту 10, в котором первый микроорганизм, второй микроорганизм и/или побочные продукты, выделяемые при их росте, вводят в контакт непосредственно с корнями растения.

- 25 17. Способ по пункту 10, в котором первый микроорганизм, второй микроорганизм и/или побочные продукты, выделяемые при их росте, вводят в контакт с почвой, в которой произрастает растение.

18. Способ по пункту 10, в котором первый микроорганизм, второй микроорганизм и/или побочные продукты, выделяемые при их росте, перед нанесением смешивают с водой.

19. Способ по пункту 10, в котором первый микроорганизм, второй микроорганизм и/или побочные продукты, выделяемые при их росте, наносят на растение и/или окружающую его среду с помощью системы орошения.

5 20. Способ по пункту 10, в котором первый микроорганизм, второй микроорганизм и/или побочные продукты, выделяемые при их росте, наносят на растение и/или окружающую его среду наряду с источником одного или более питательных веществ, выбранных из азота, фосфора и калия.

10 21. Способ по пункту 10, в котором первый микроорганизм, второй микроорганизм и/или побочные продукты, выделяемые при их росте, наносят на растение и/или окружающую его среду одновременно с пребиотиками, выбранными из экстракта ламинарии, фульвово́й кислоты, хитина, гумата и гуминовой кислоты.

15 22. Способ по пункту 10, в котором первый микроорганизм, второй микроорганизм и/или побочные продукты, выделяемые при их росте, не наносят на растение и/или окружающую его среду одновременно с перечисленными ниже веществами или в течение периода, составляющего от 7 до 10 суток, до или после нанесения (внесения) следующих веществ: беномила, хлорида додецилдиметиламмония, диоксида водорода/пероксиуксусной кислоты, имазазила, пропиконазола, тебуконазола или трифлумизола.

20 23. Способ по пункту 10, в котором здоровый иммунитет растения ухудшен в результате инфицирования патогеном или в результате воздействия фактора экологического стресса.

24. Способ по пункту 23, применяемый для повышения здорового иммунитета растения.

25 25. Способ по пункту 23, в котором растение представляет собой цитрусовое растение, пораженное позеленением цитрусовых и/или раком цитрусовых.

26. Способ по пункту 10, применяемый для улучшения одного или более качеств почвы.

30 27. Способ по пункту 26, применяемый для улучшения удержания воды в сухой почве.

28. Способ по пункту 26, применяемый для улучшения дренажа воды и/или диспергирования воды в переувлажненной почве.

29. Способ по пункту 26, применяемый для улучшения удержания питательных веществ в истощенной почве.

5 30. Способ по пункту 10, применяемый для улучшения абсорбции питательных веществ корнями растений.

31. Способ по пункту 10, в котором растение представляет собой сельскохозяйственное растение.

10 32. Способ по пункту 31, в котором сельскохозяйственное растение выбрано из цитрусового растения, томата, газонной травы, картофеля, сахарного тростника, винограда, арбуза, мускусной дыни, салата-латука, миндаля, лука, моркови, ягод и хлопка.

15 33. Способ по пункту 10, в котором первый микроорганизм, второй микроорганизм и/или побочные продукты, выделяемые при их росте, распыляют на растение и/или окружающую его среду с помощью ручного газонного и садового распылителя.

34. Способ по пункту 33, где способ применяют в домашнем и садовом хозяйстве.

20 35. Способ по пункту 10, в котором первый и/или второй микроорганизмы и/или побочные продукты, выделяемые ими при росте, получают способом твердофазной ферментации.

36. Способ улучшения иммунитета, здоровья, роста и/или урожайности растения, включающий:

25 нанесение композиции для обработки почвы по пунктам 1-9 на растение и/или окружающую его среду и необязательно

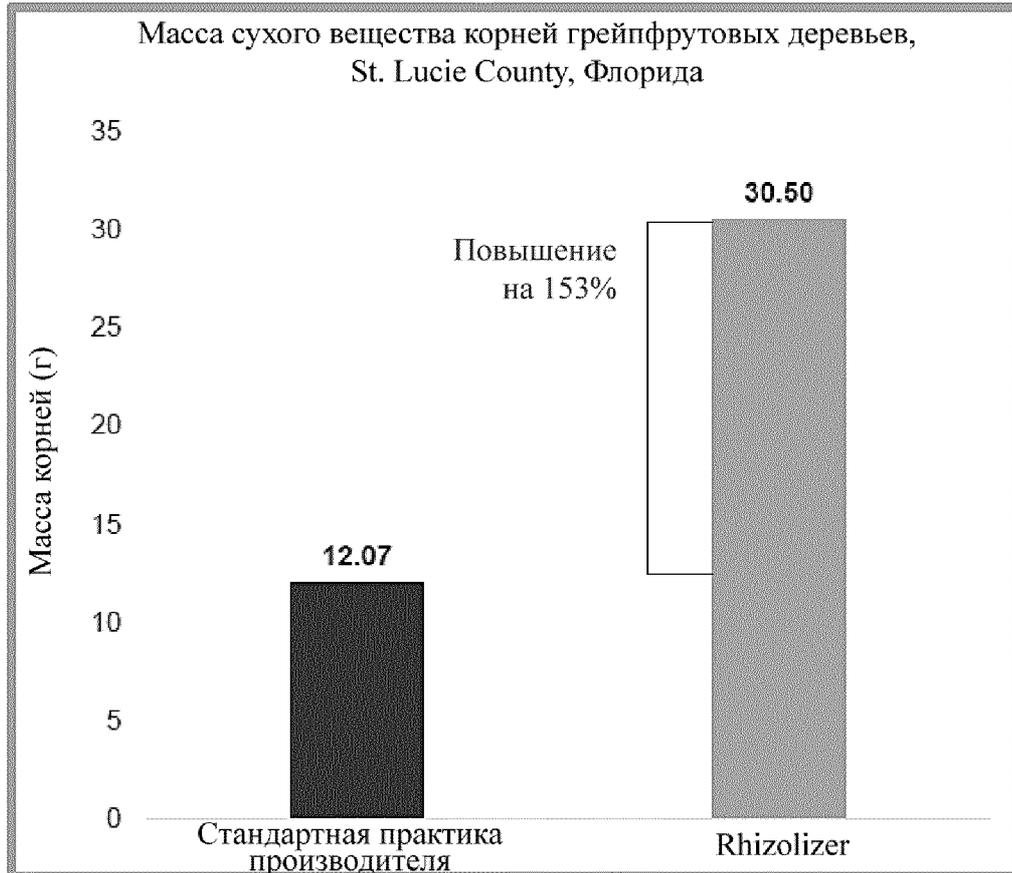
нанесение питательных веществ и/или пребиотиков для выращивания микроорганизмов.



ФИГ. 1А



ФИГ. 1В



Белый грейпфрут
Обработка один раз в квартал, 8 обработок
(1,5 жидких унций/акр (примерно 0,1 л/га))

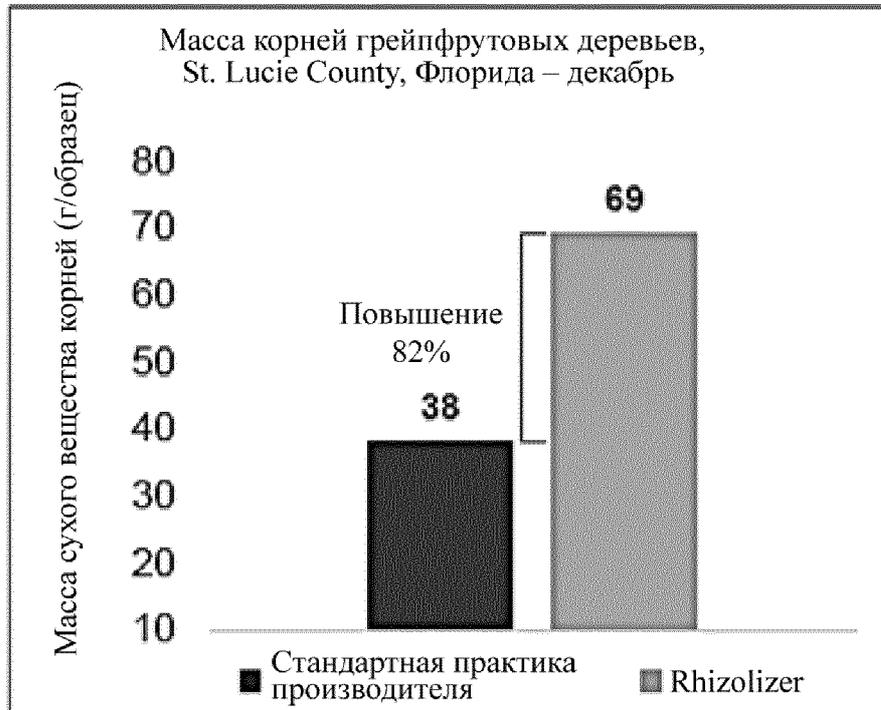
ФИГ. 2

Hamlin
Обработка один раз в квартал, 3 обработки
(1,5 жидких унций/акр (примерно 0,1 л/га))
Различия статистически значимы



ФИГ. 3А

Белый грейпфрут
Обработка один раз в квартал, 3 обработки
(1,5 жидких унций/акр (примерно 0,1 л/га))



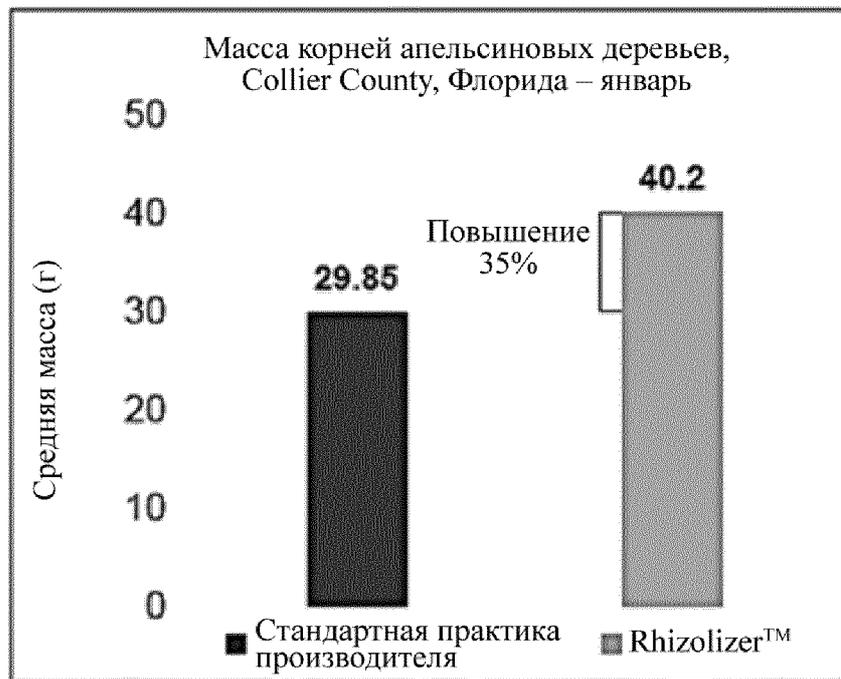
ФИГ. 3В



Hamlin

Обработка один раз в квартал, 4 обработки,
1,5 жидких унций/акр (примерно 0,1 л/га) (3 обработки),
3 жидких унции/акр (примерно 0,2 л/га) (1 обработка)

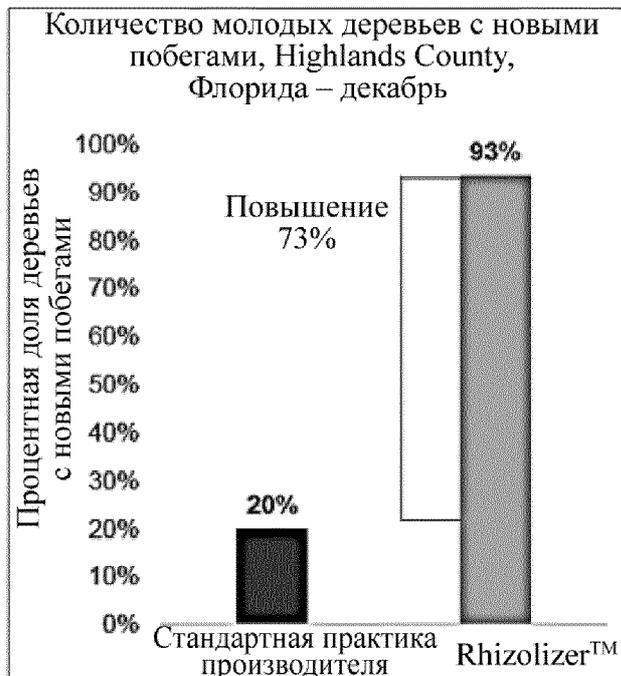
ФИГ. 4А



Valencia

Обработка один раз в квартал, 4 обработки,
1,5 жидких унций/акр (примерно 0,1 л/га) (3 обработки),
3 жидких унции/акр (примерно 0,2 л/га) (1 обработка)

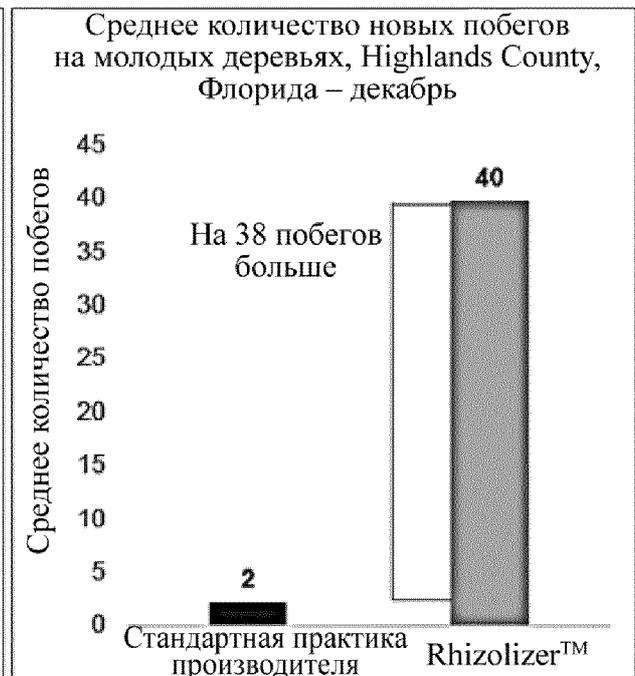
ФИГ. 4В



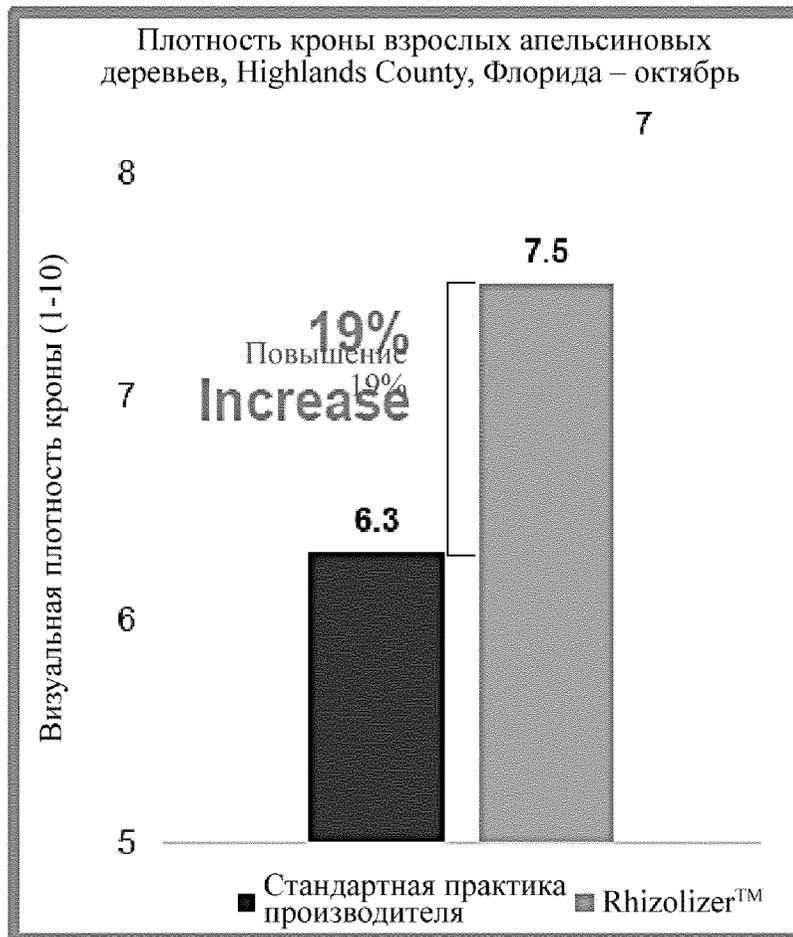
Valencia

Обработка один раз в два месяца, 6 обработок,
1,5 жидких унций/акр (примерно 0,1 л/га)

ФИГ. 5А

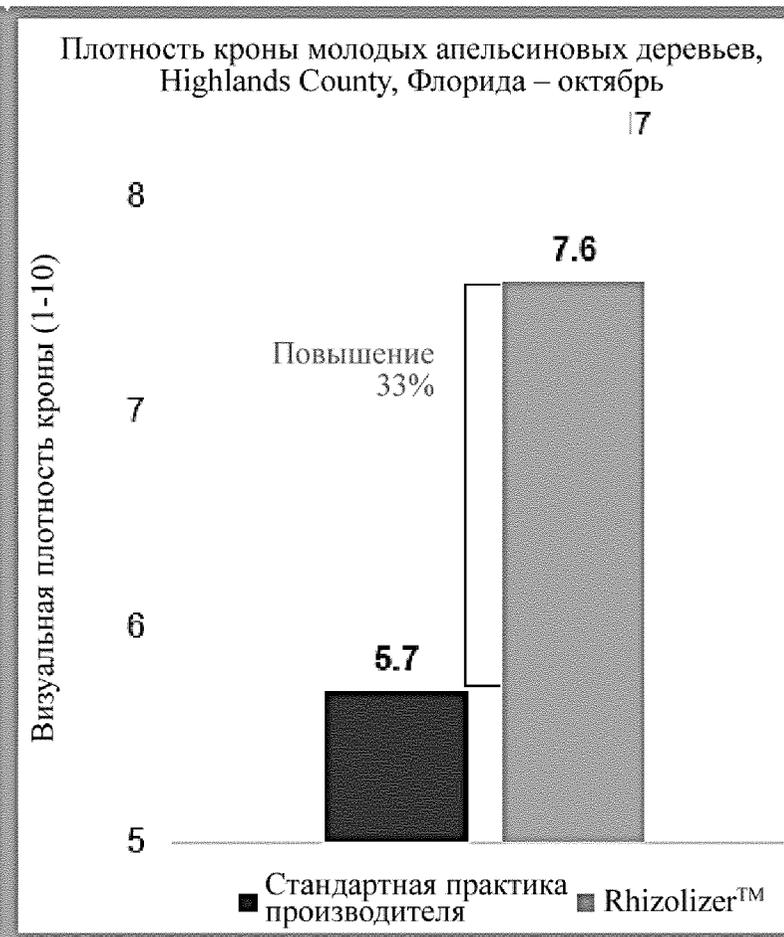


ФИГ. 5В



ФИГ. 6А

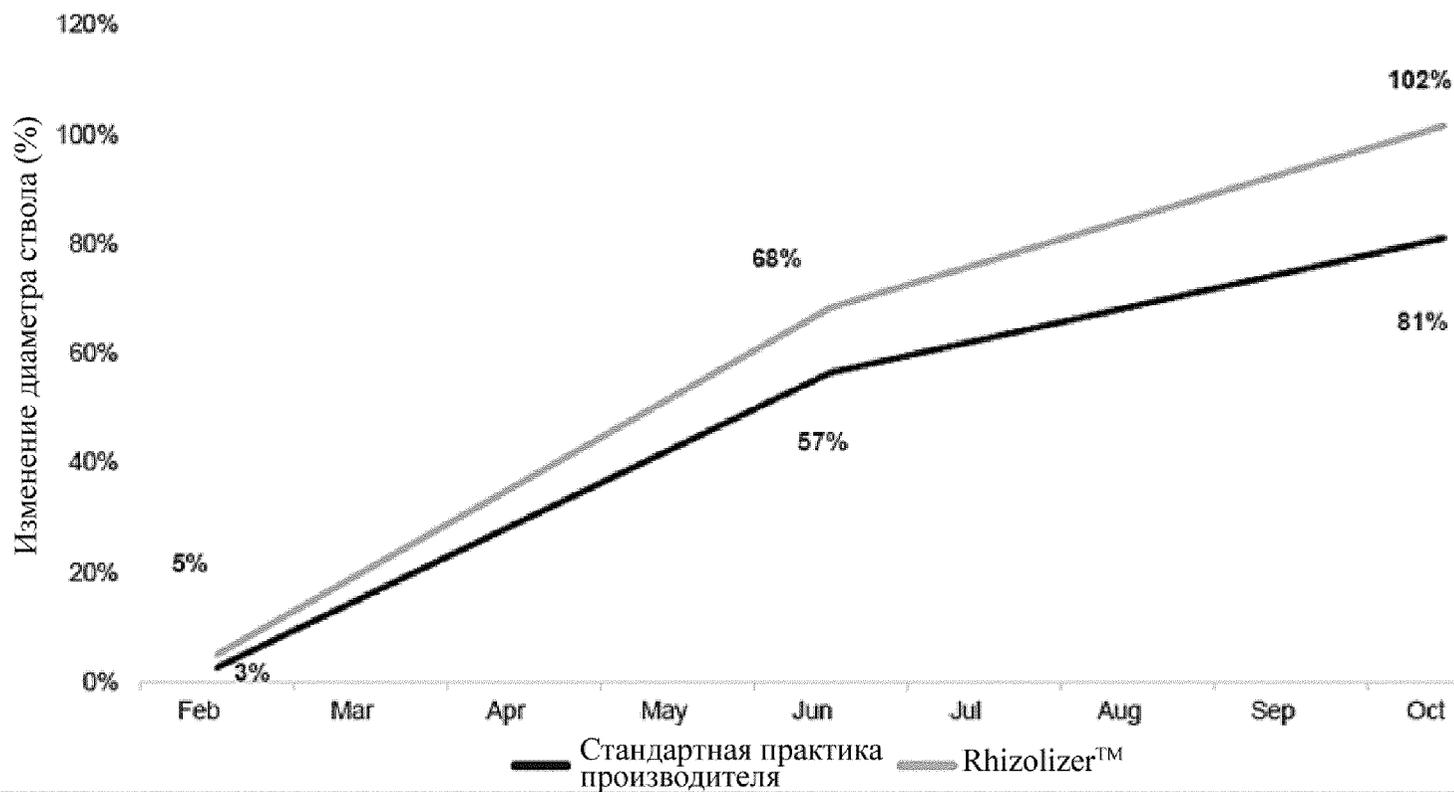
Hamlin
Обработка один раз в квартал, 3 обработки,
1,5 жидких унций/акр (примерно 0,1 л/га)



ФИГ. 6В

Hamlin
Обработка один раз в квартал, 3 обработки,
1,5 жидких унций/акр (примерно 0,1 л/га)

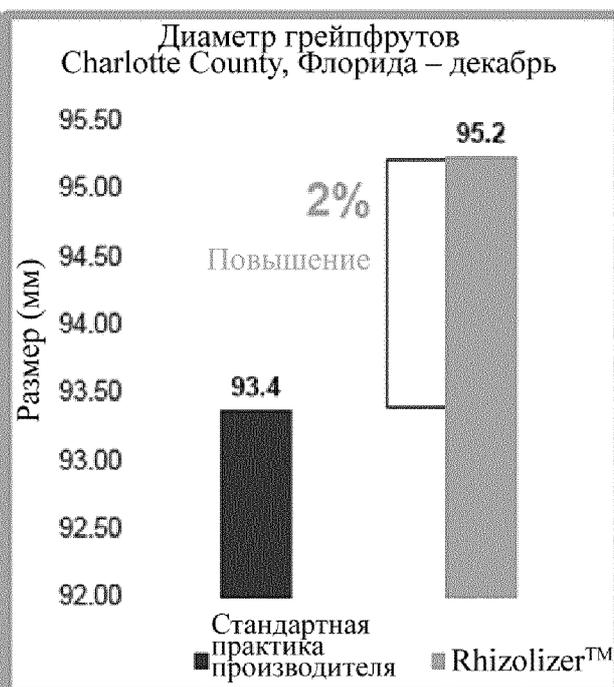
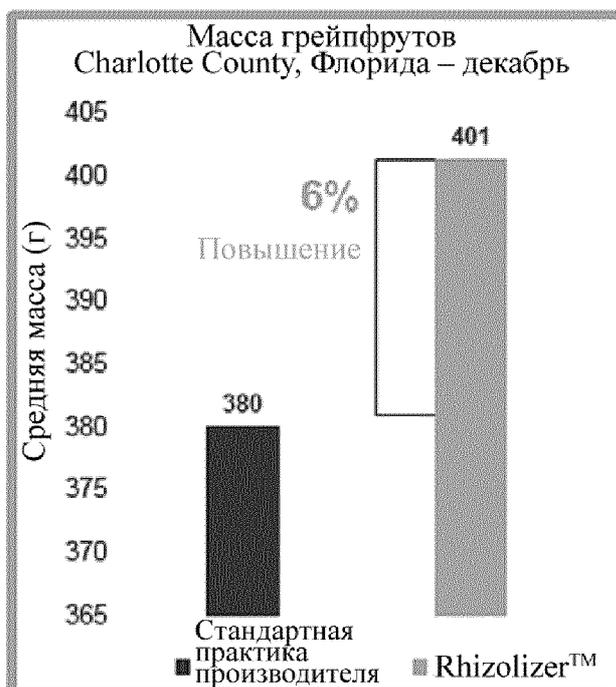
Среднее изменение диаметра ствола у молодых апельсиновых деревьев,
Highlands County, Флорида, наблюдение за молодыми апельсиновыми деревьями



Valencia

Обработка один раз в два месяца, 4 обработки, 1,5 жидких унций/акр (примерно 0,1 л/га)

ФИГ. 7

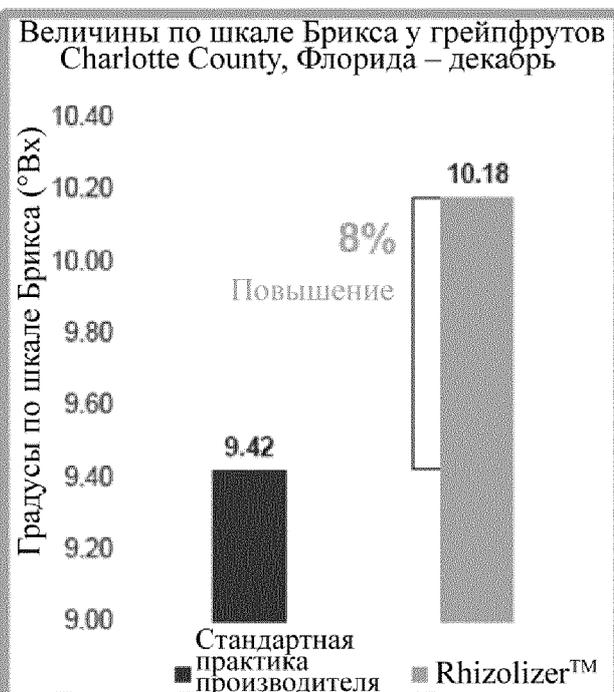
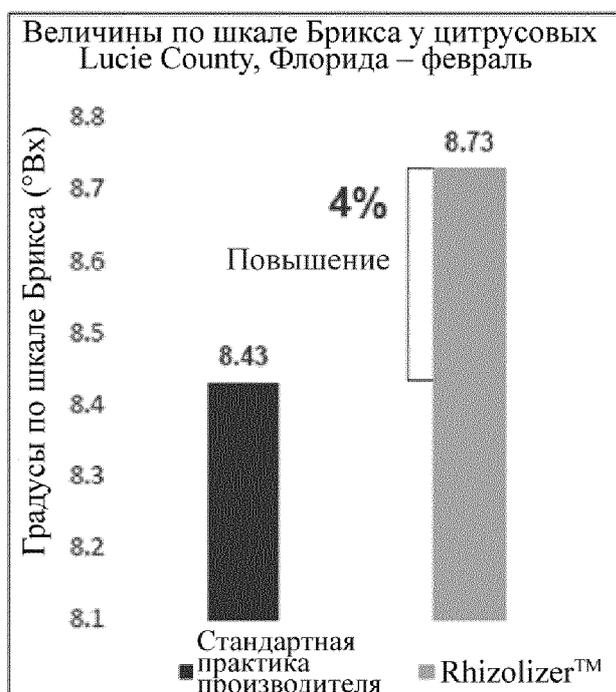


Белый грейпфрут
Обработка один раз в два месяца, 4 обработки,
1,5 жидких унций/акр (примерно 0,1 л/га)
Различия статистически значимы

Грейпфрут Ruby Red (рубиновый красный)
Обработка один раз в два месяца, 4 обработки,
1,5 жидких унций/акр (примерно 0,1 л/га)
Различия статистически значимы

ФИГ. 8А

ФИГ. 8В

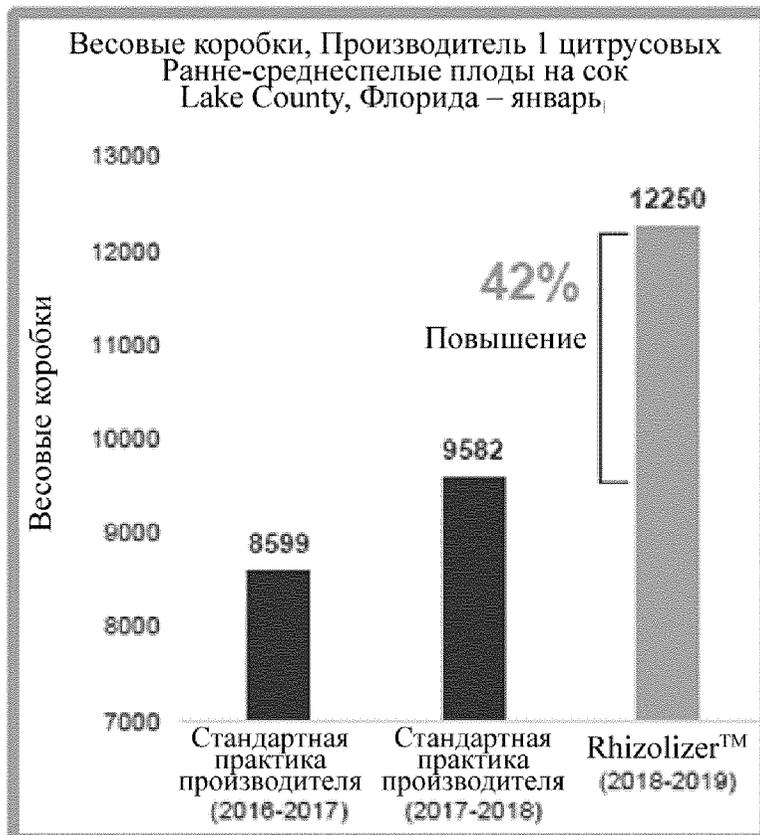


Белый грейпфрут
Обработка один раз в два месяца,
всего 5 обработок, 1,5 жидких унций/акр
(примерно 0,1 л/га)

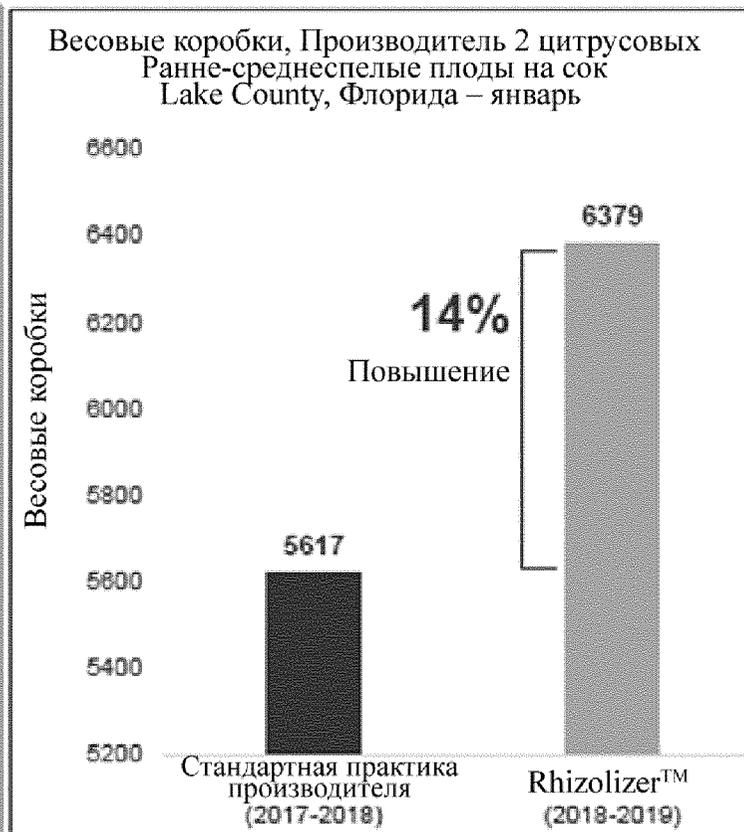
Белый грейпфрут
Обработка один раз в квартал, 3 обработки,
1,5 жидких унций/акр (примерно 0,1 л/га)
Различия статистически значимы

ФИГ. 9А

ФИГ. 9В



ФИГ. 10А

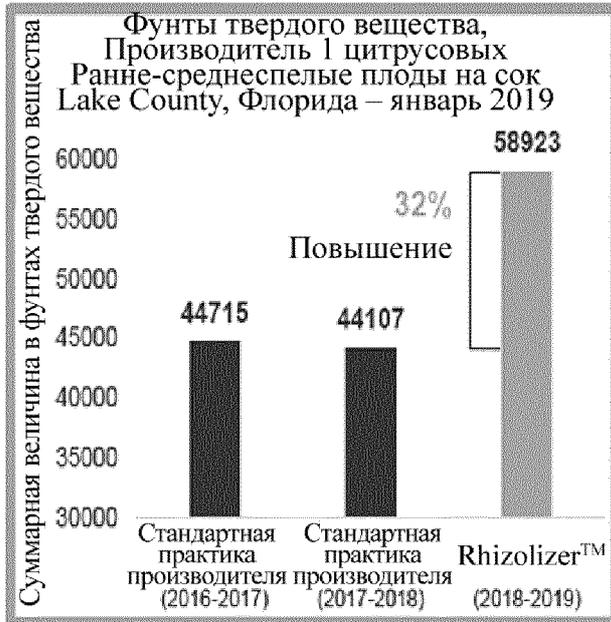


Hamlin
Обработка один раз в квартал, 4 обработки,
1,5 жидких унций/акр (примерно 0,1 л/га)
Величины урожая 2017-2018 гг. завышены
для учета опадания плодов
в результате урагана Ирма

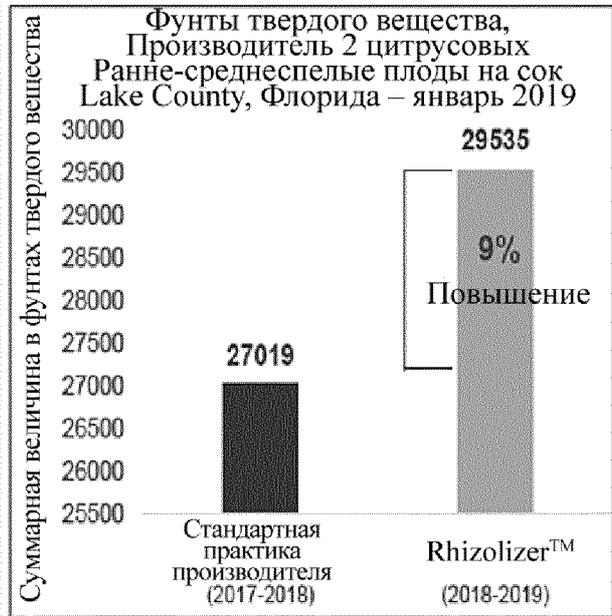
ФИГ. 10В

Hamlin

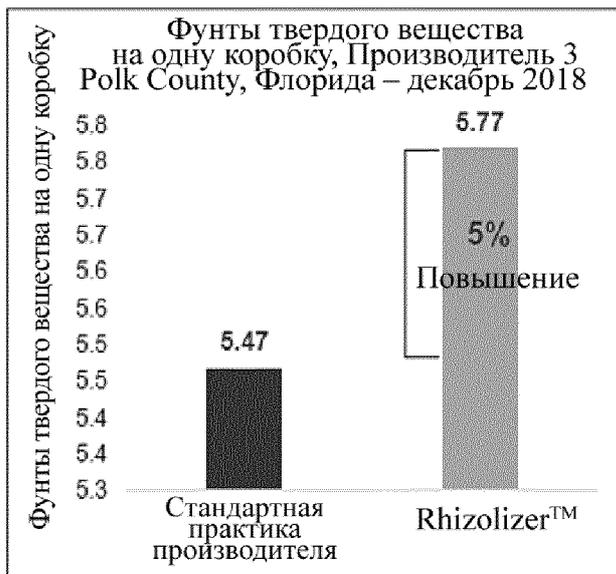
Обработка один раз в квартал, 4 обработки, 1,5 жидких унций/акр (примерно 0,1 л/га)



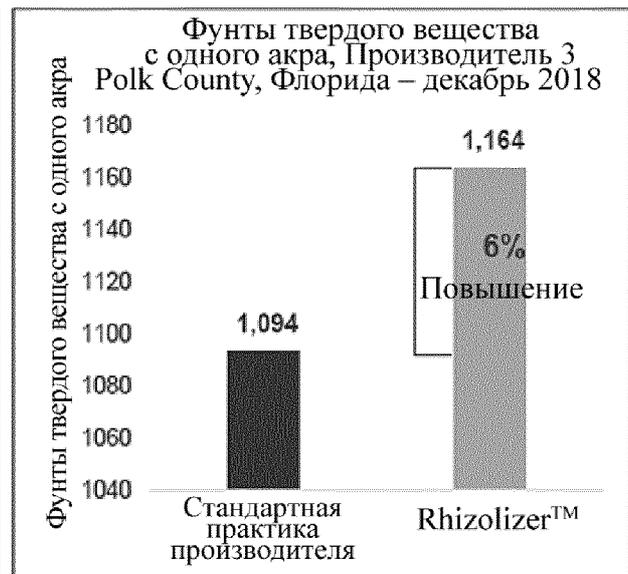
ФИГ. 11А



ФИГ. 11В



ФИГ. 12А



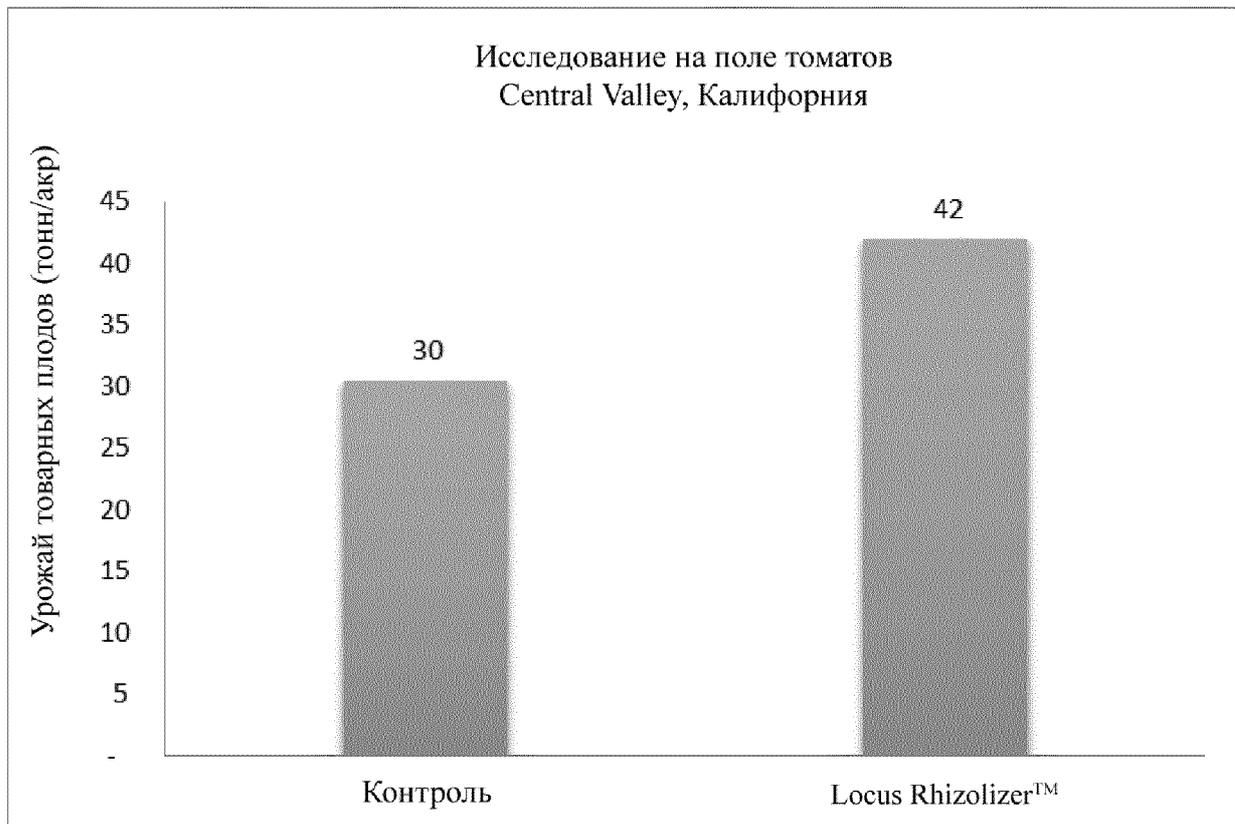
ФИГ. 12В

Hamlin

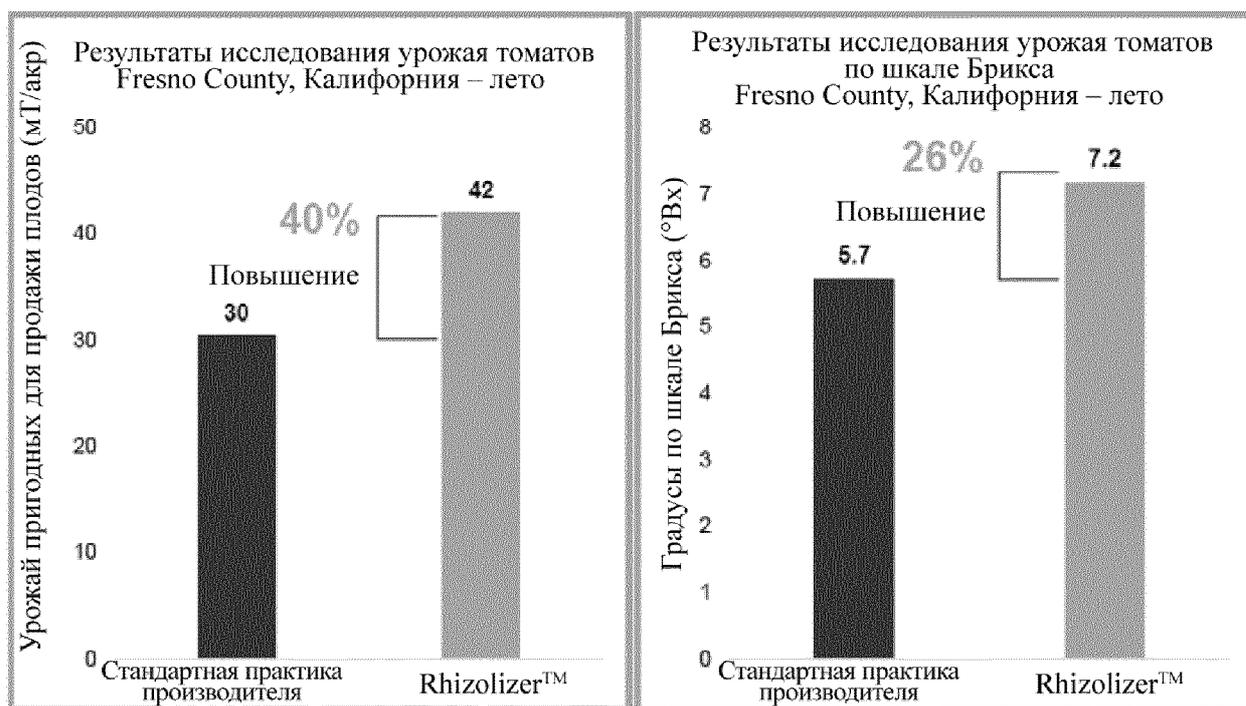
Обработка один раз в два месяца, 4 обработки, 1,5 жидких унций/акр (примерно 0,1 л/га)
Средние различия в количестве фунтов твердого вещества на одну коробку статистически значимы
Величины урожая 2017-2018 гг. завышены для учета опадания плодов в результате урагана Ирма



ФИГ. 13А



ФИГ. 13В

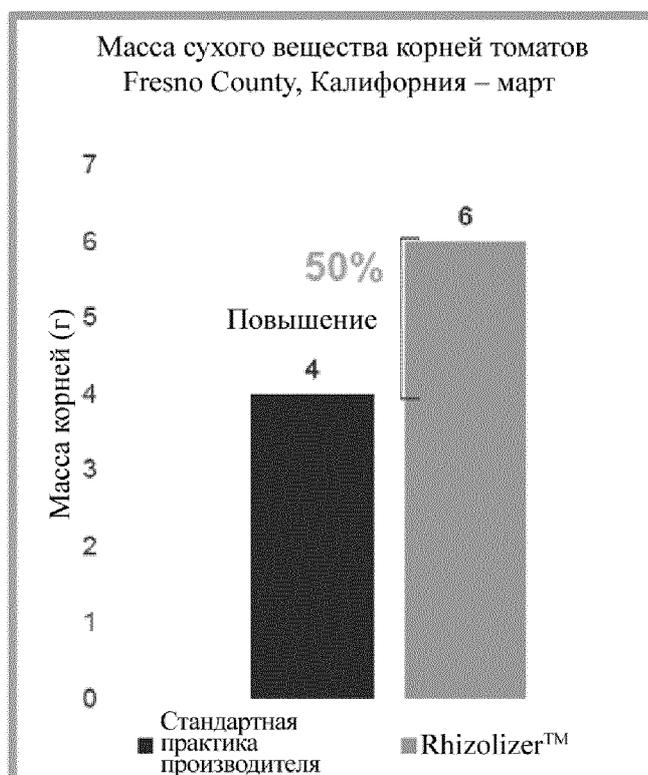


Обработка один раз в месяц, всего 3 обработки, всего 9 жидких унций/акр (примерно 0,6 л/га)
Различия статистически значимы

Обработка один раз в месяц, всего 3 обработки, всего 9 жидких унций/акр (примерно 0,6 л/га)

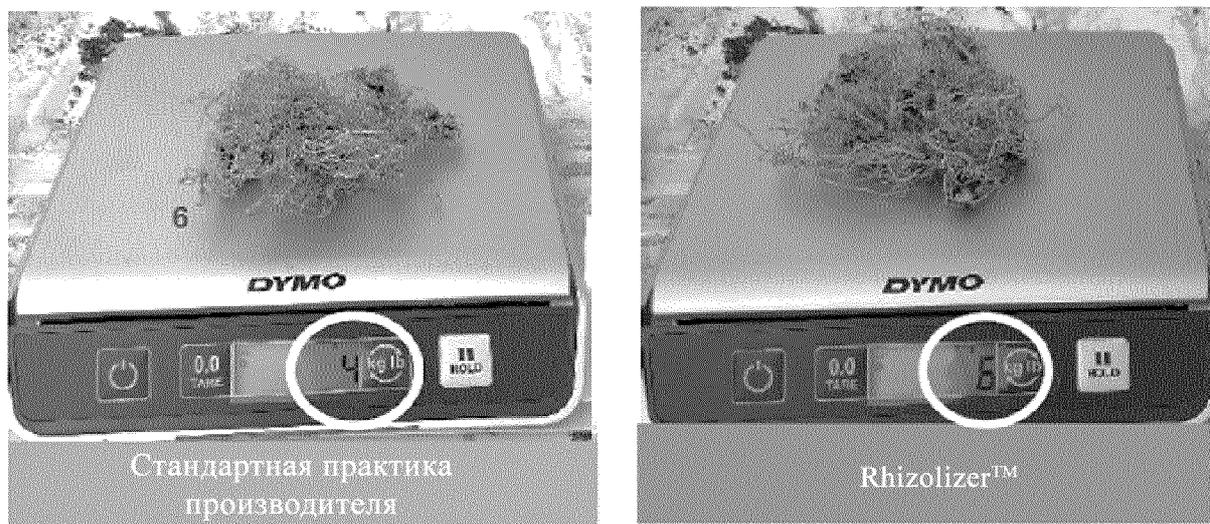
ФИГ. 14А

ФИГ. 14В

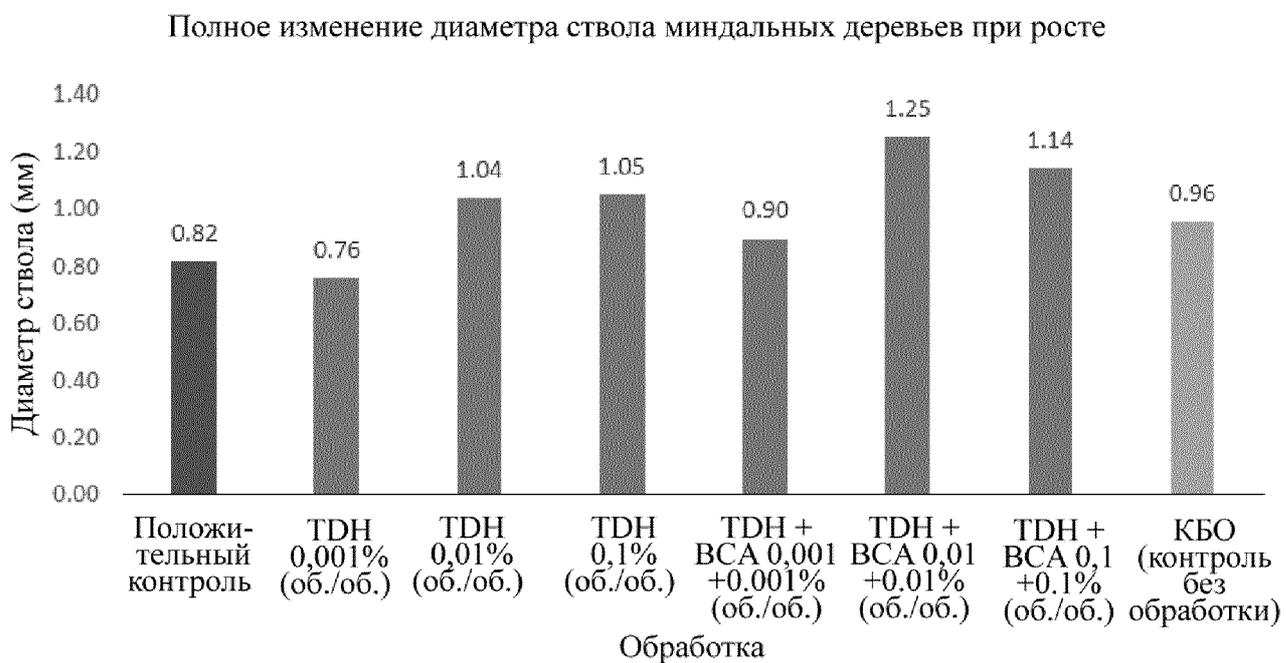


Однократная обработка 3 жидких унции/акр (примерно 0,2 л/га)

ФИГ. 15А

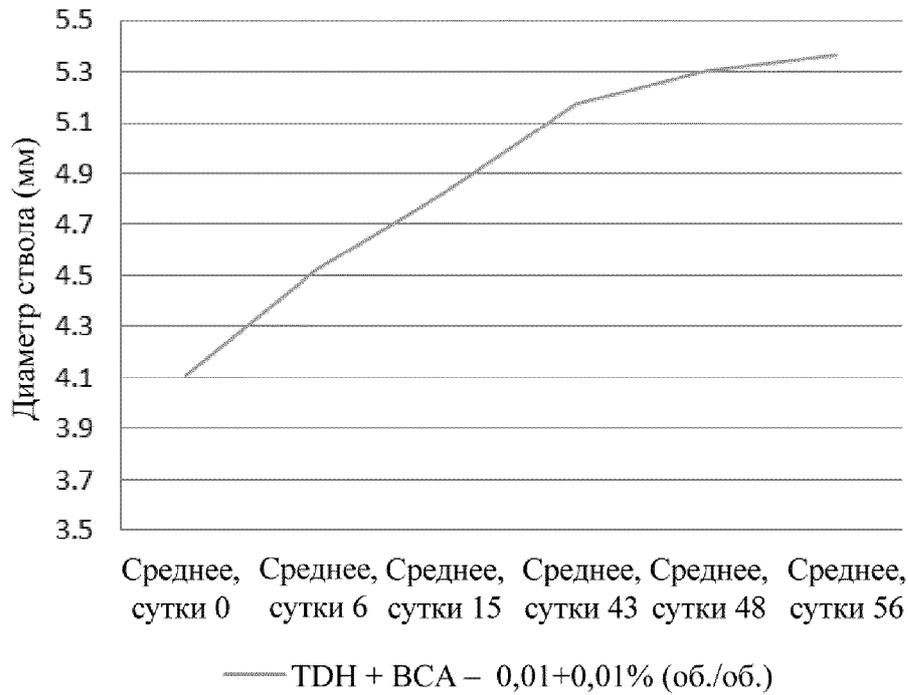


ФИГ. 15В

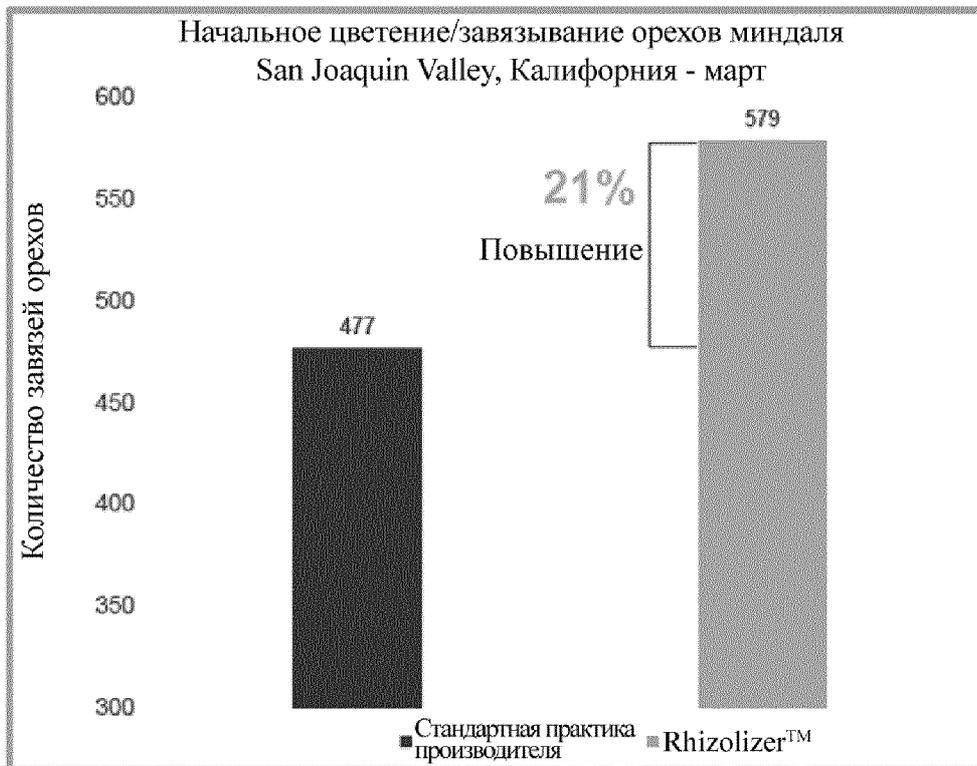


ФИГ. 16А

Исследование миндальных деревьев
Duarte Nursery, Ceres, Калифорния

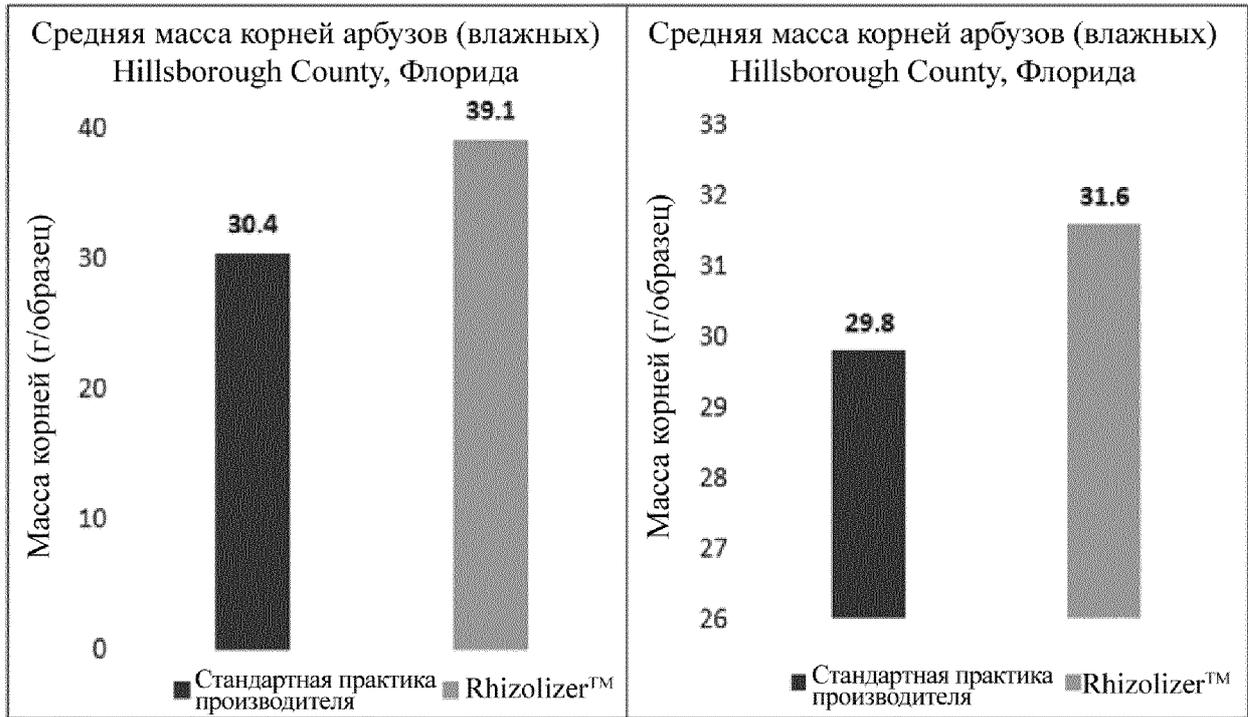


ФИГ. 16В



Сорт Independence, привитой
Обработка после сбора урожая; две обработки;
всего 3 жидкие унции (примерно 0,2 л)

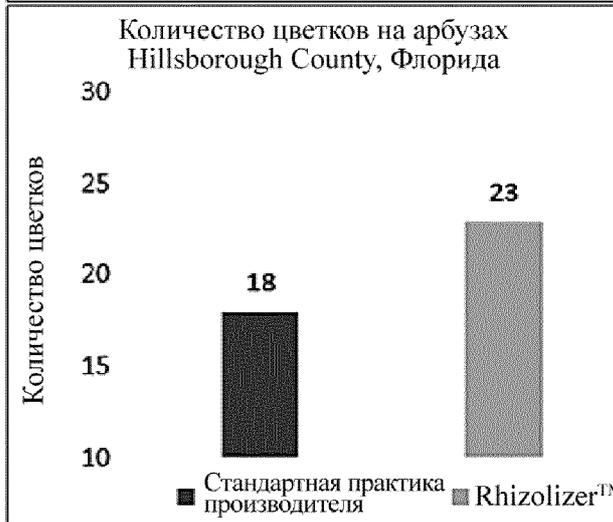
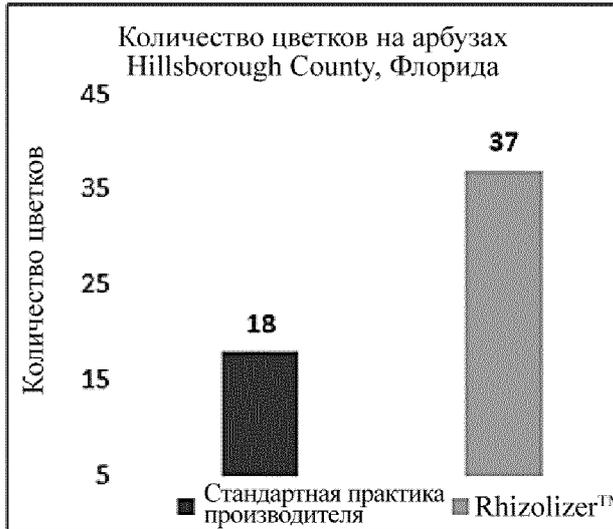
ФИГ. 17



ФИГ. 18А

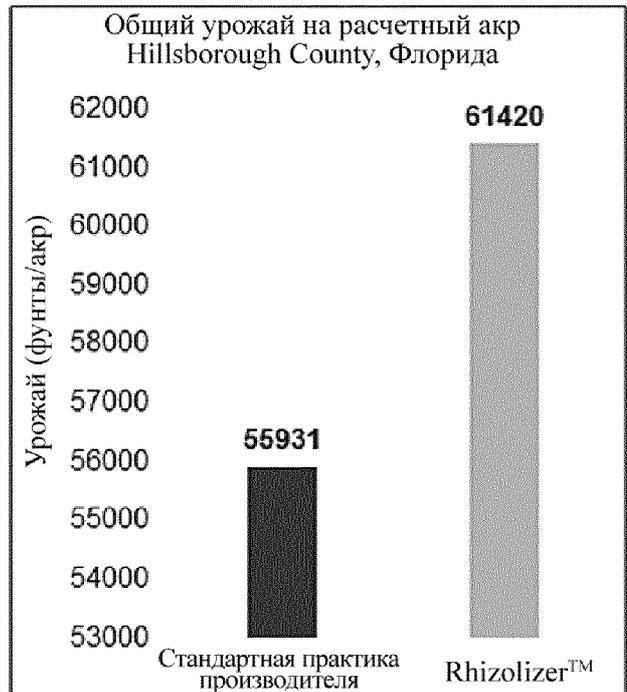
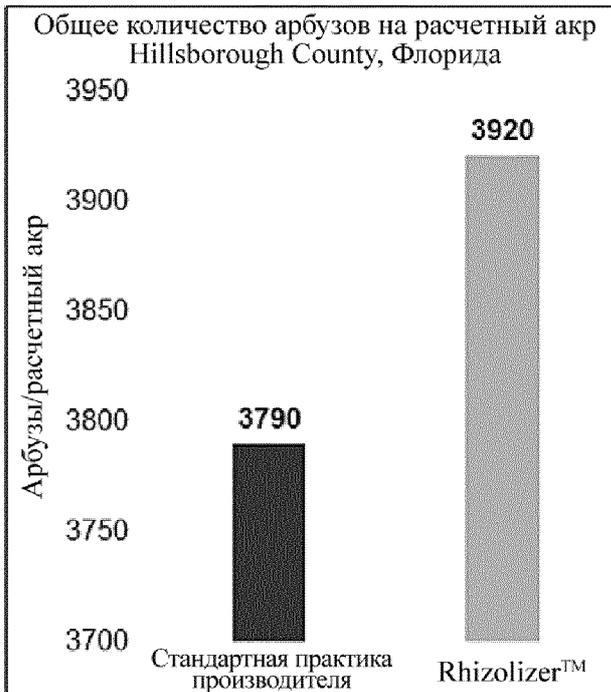


ФИГ. 18В

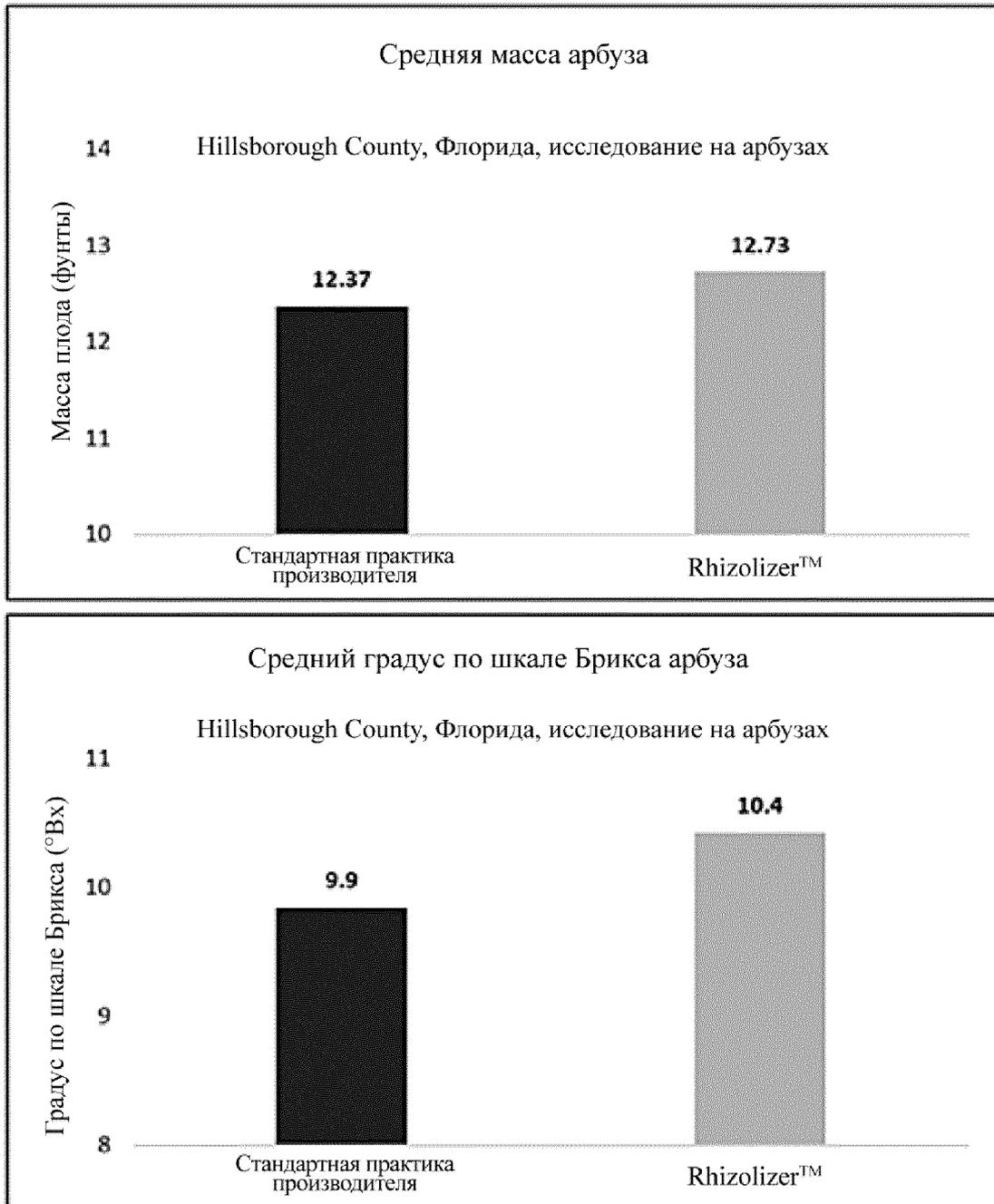


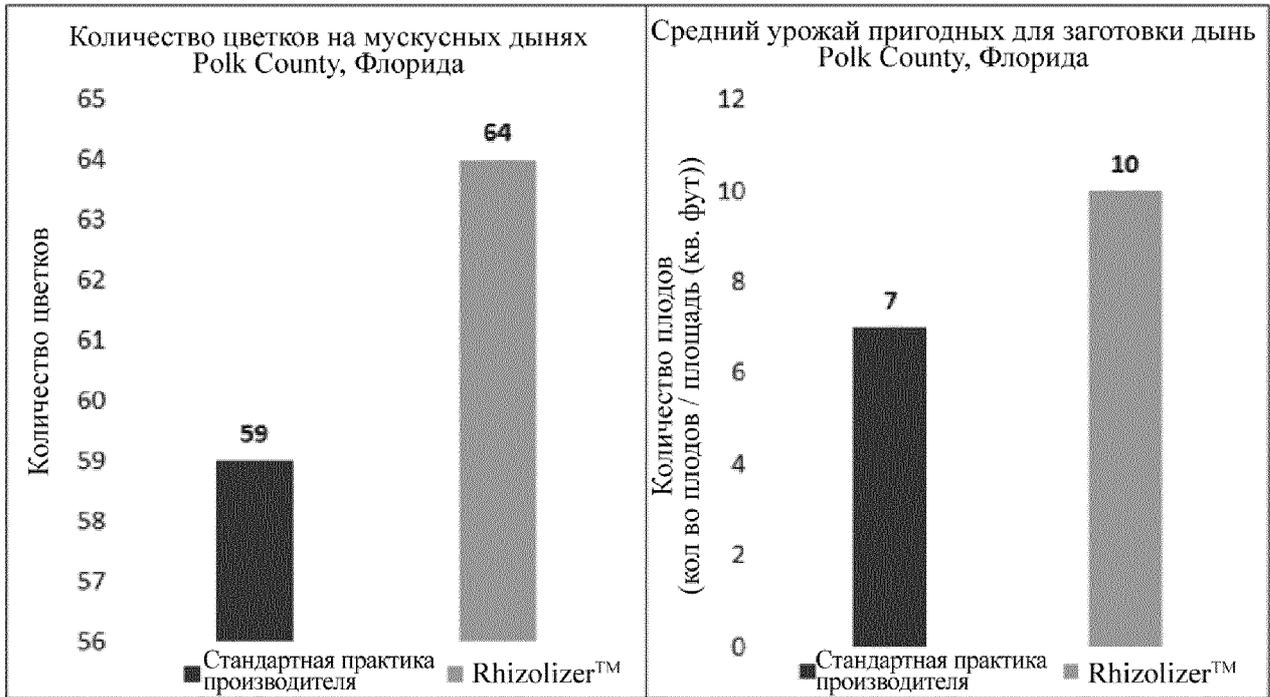
ФИГ. 18С

ФИГ. 18D



ФИГ. 18E

**ФИГ. 18F**



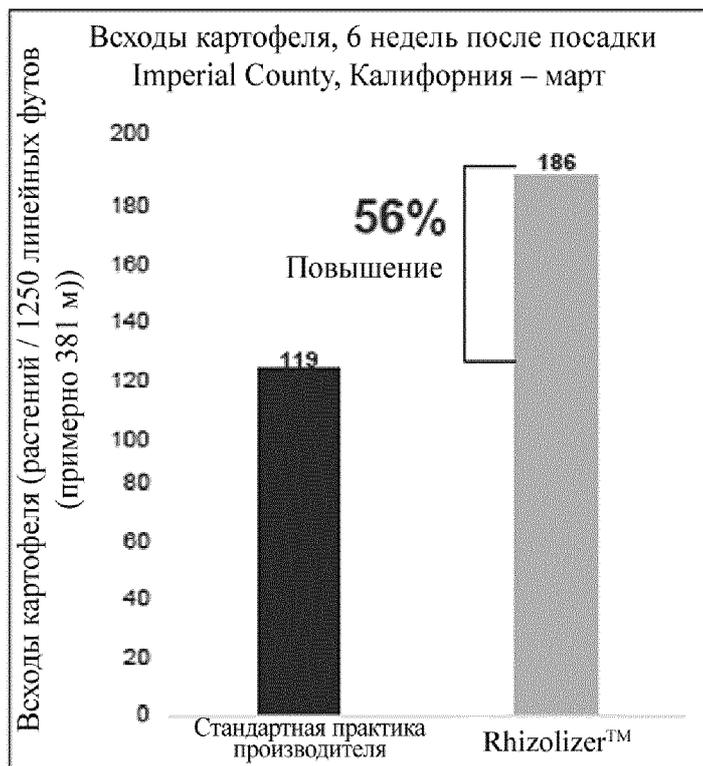
ФИГ. 19А

ФИГ. 19В



Картофель Yellow Rose Russet
 При посадке; одна обработка; 1 жидкая унция/акр
 (примерно 0,067 л/га).
 5 недель после посадки

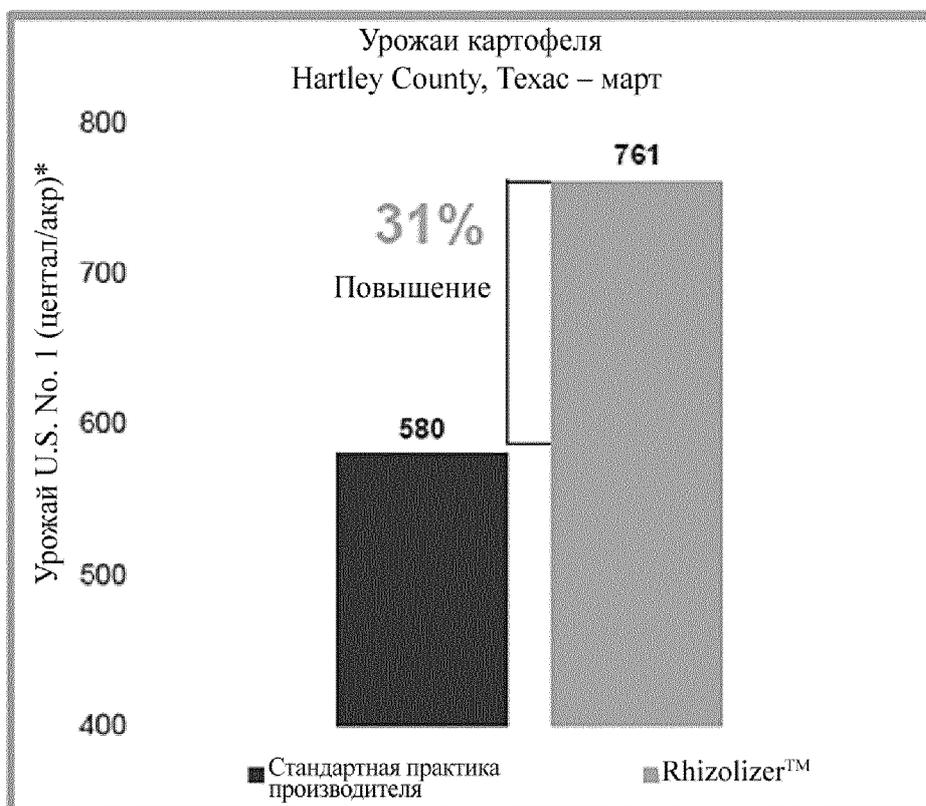
ФИГ. 20А



Картофель Multi Cultivar

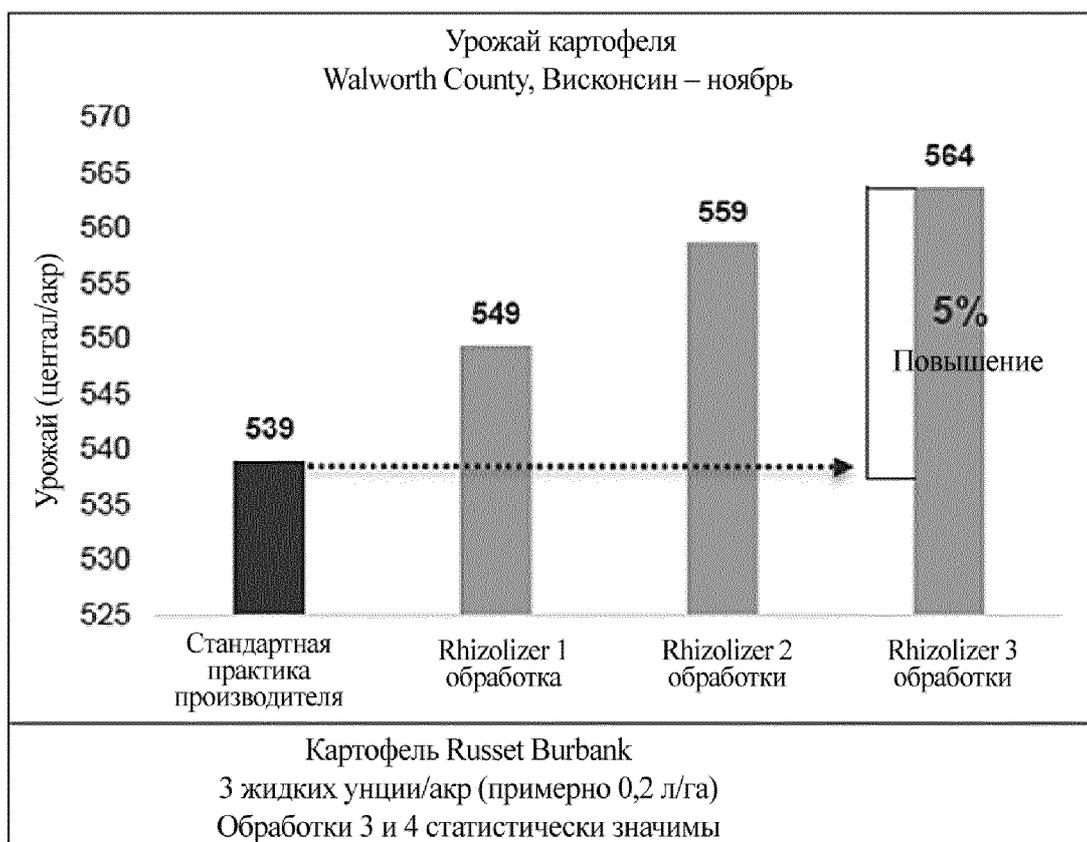
При посадке; одна обработка; 1 жидкая унция/акр (примерно 0,067 л/га).
6 недель после посадки

ФИГ. 20B

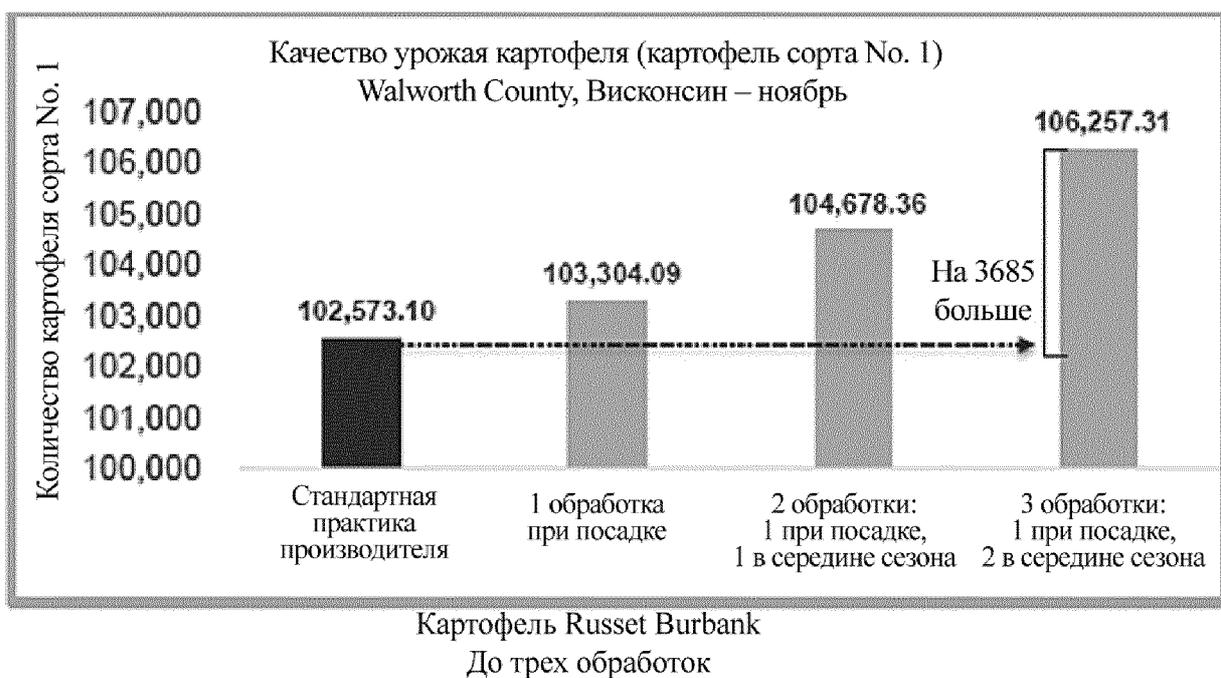


* 1 центал = 45,3 кг; 1 акр = 0,4 га

ФИГ. 21A



ФИГ. 21В

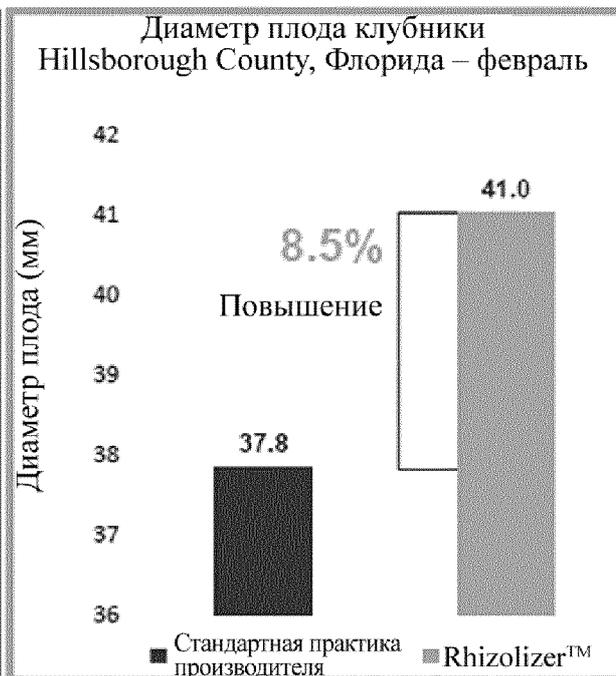
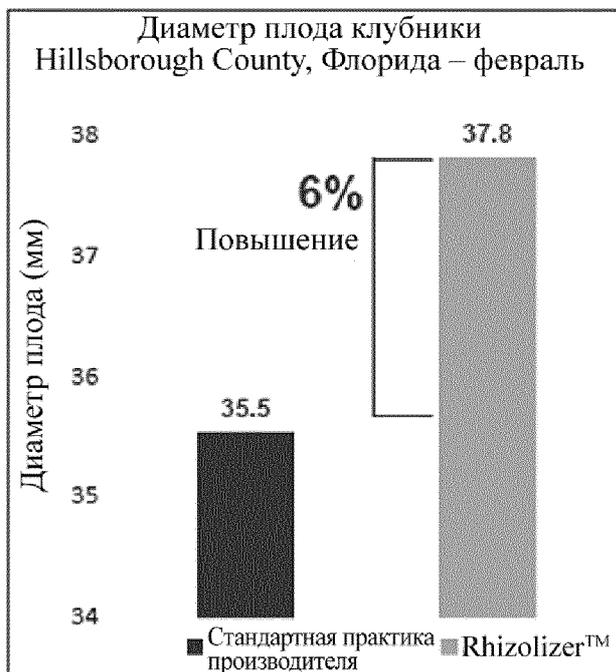


ФИГ. 22А



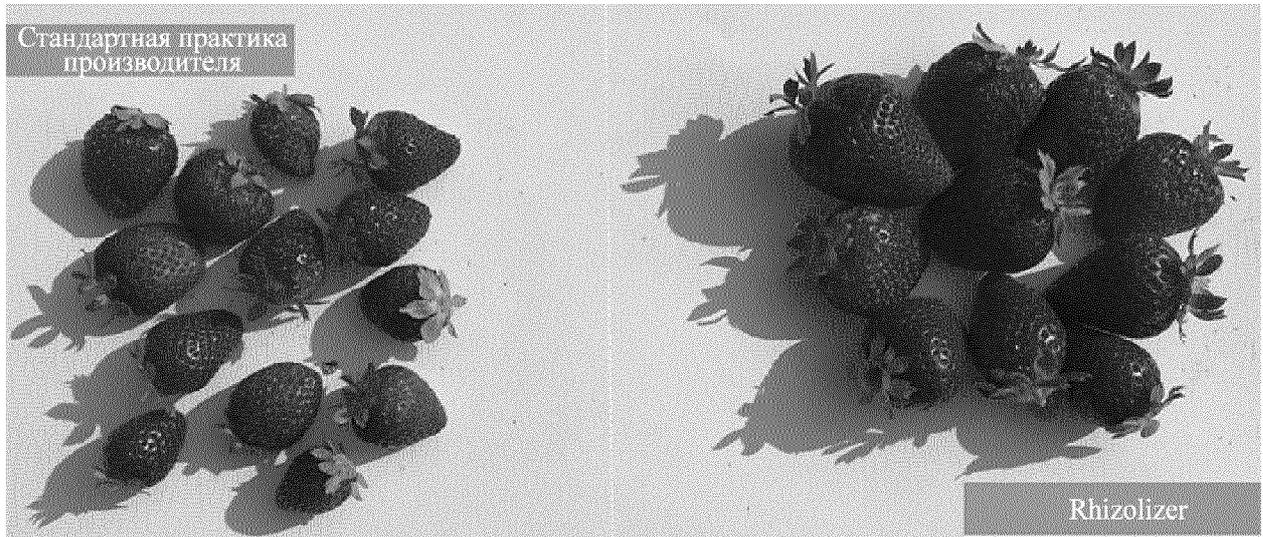
Картофель Colomba
Ежемесячно; три обработки; всего 45 жидких унций (примерно 3 л)

ФИГ. 22В

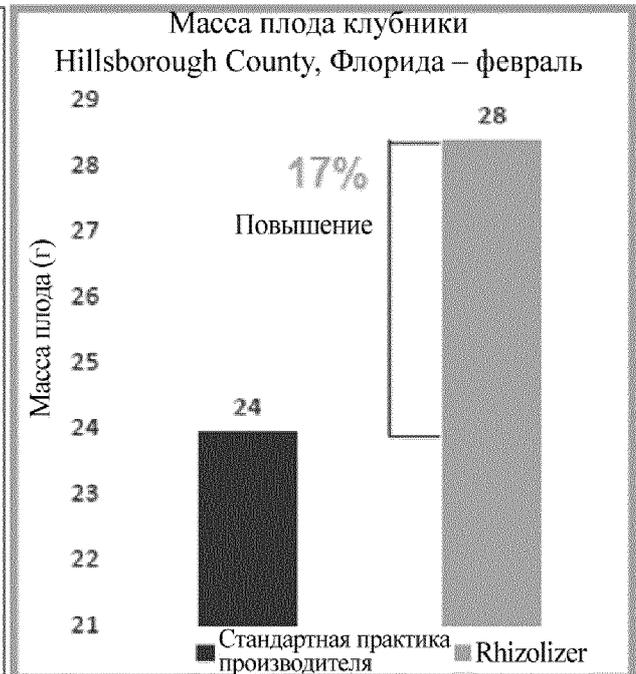
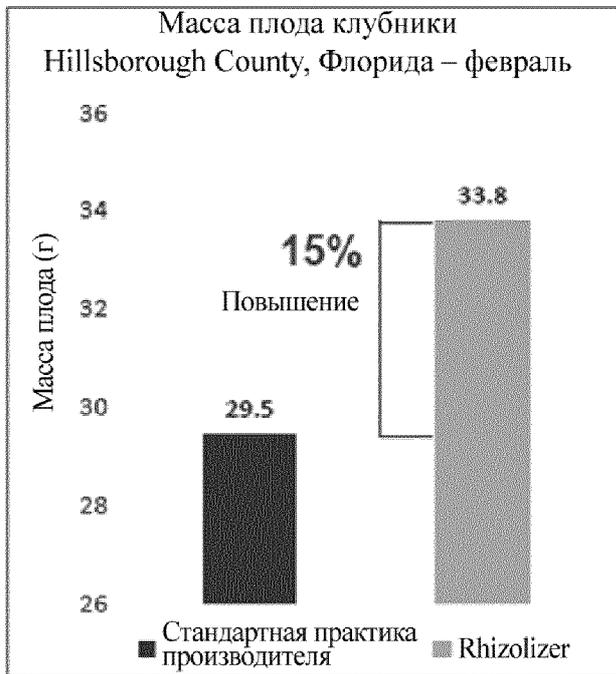


Клубника Radiance
Ежемесячно; две обработки; 3 жидких унции/акр (примерно 0,2 л/га)

ФИГ. 23А



ФИГ. 23B

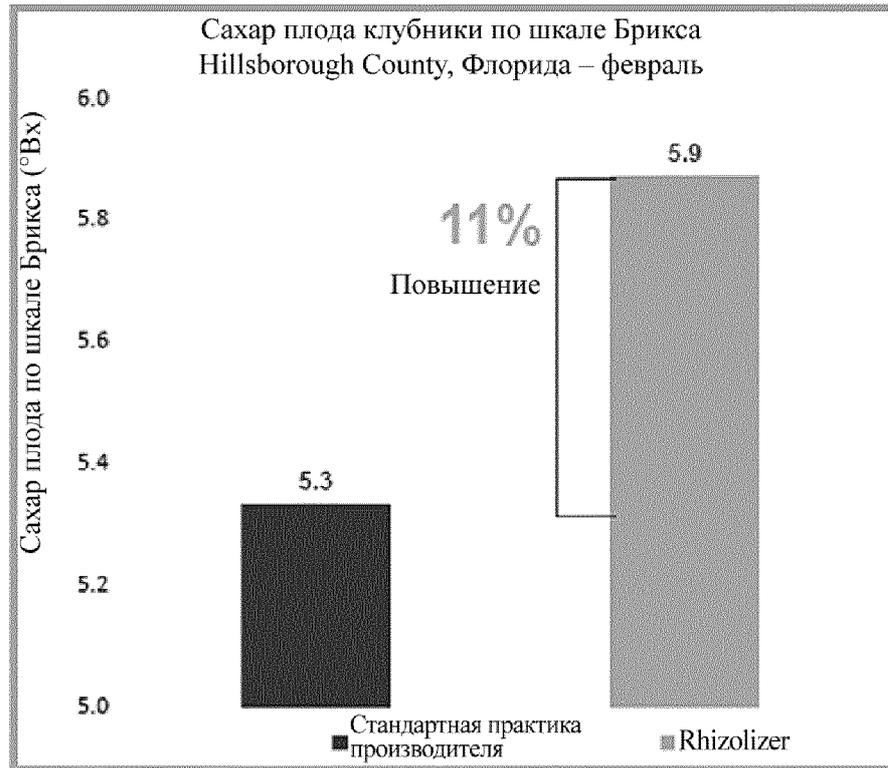


Клубника Radiance

Ежемесячно; две обработки; 3 жидких унции/акр (примерно 0,2 л/га)

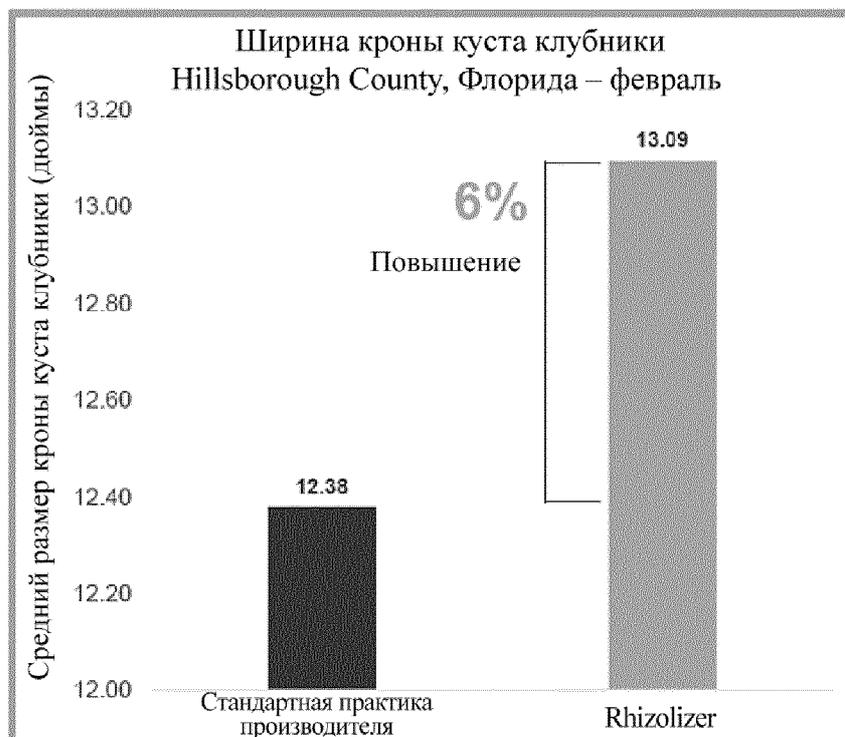
Различия статистически значимы

ФИГ. 23C



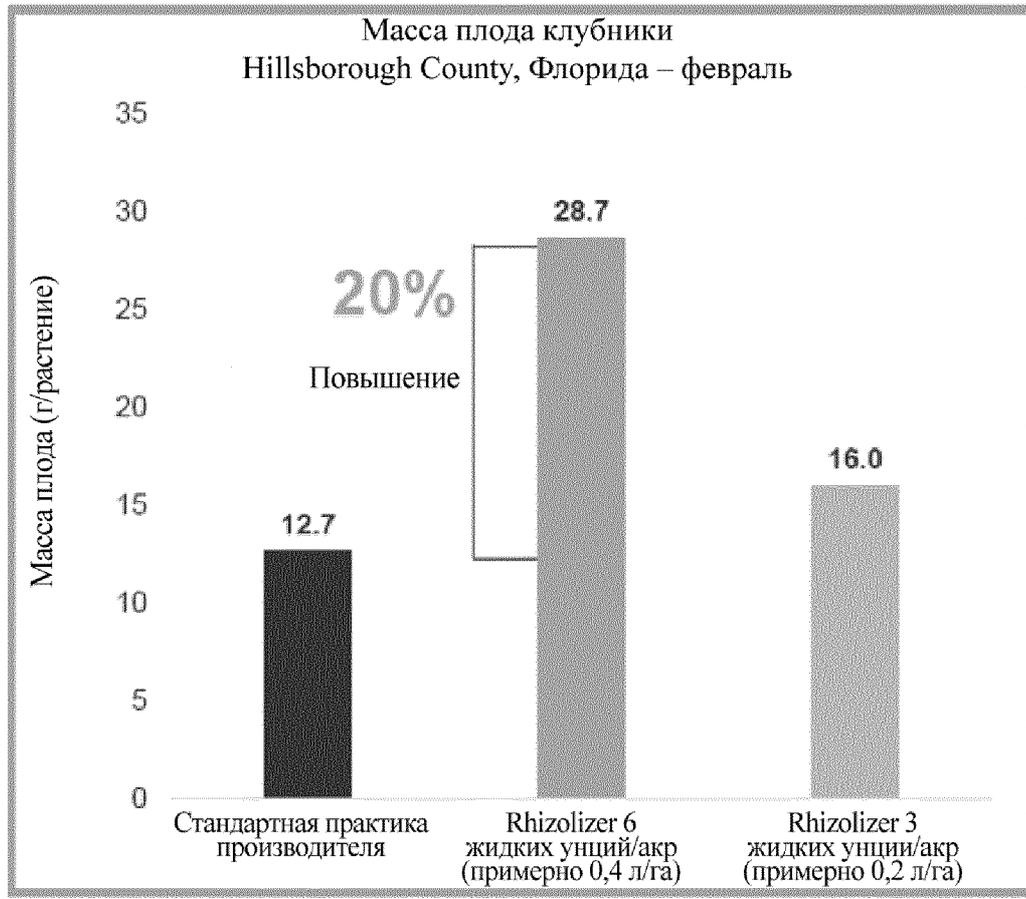
Клубника Radiance
Ежемесячно; две обработки; 3 жидких унции/акр
(примерно 0,2 л/га)
Различия статистически значимы

ФИГ. 24



Клубника Brilliance
Ежемесячно; пять обработок; 6 жидких унций/акр (примерно 0,4 л/га)
Данные статистически значимы

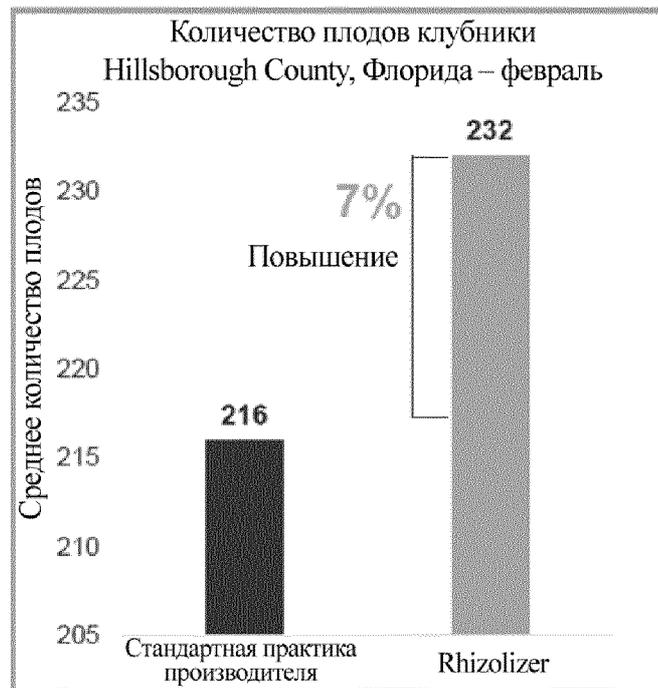
ФИГ. 25



Клубника Brilliance

Ежемесячно; две обработки; 6 и 3 жидких унции/акр (примерно 0,4 и 0,2 л/га)

ФИГ. 26



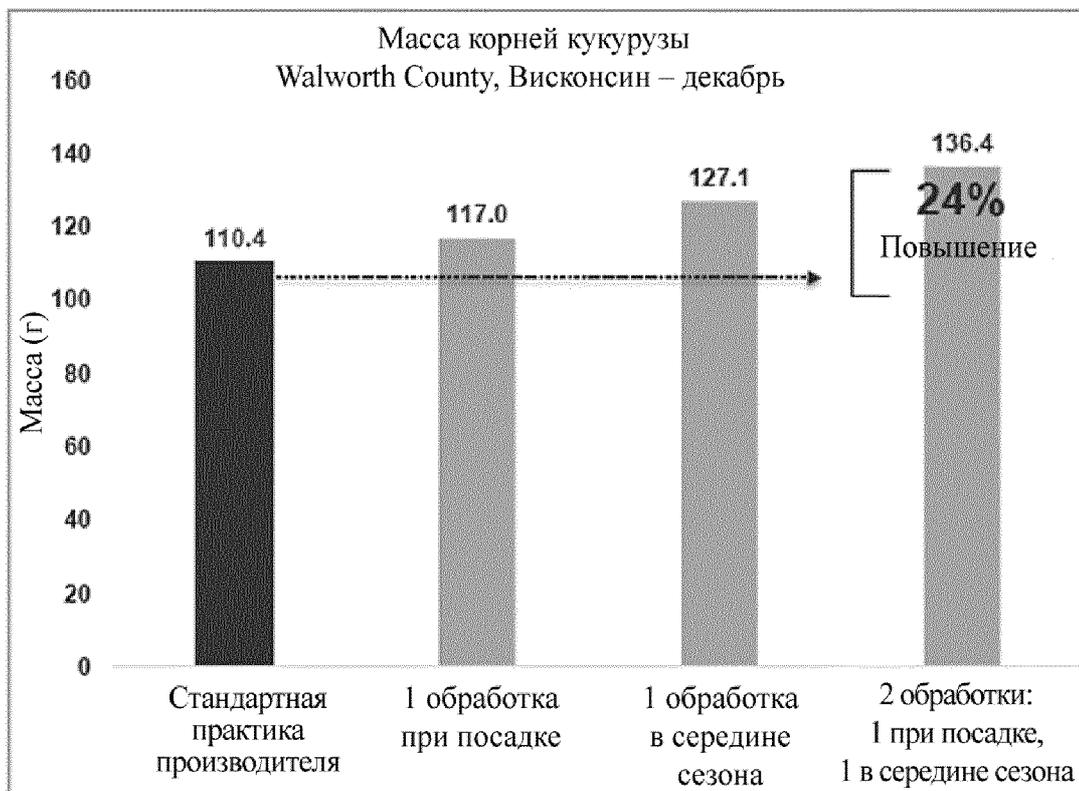
ФИГ. 27



Клубника Radiance
Ежемесячно; 4 обработки; 3 жидких унции/акр (примерно 0,2 л/га)

ФИГ. 28А

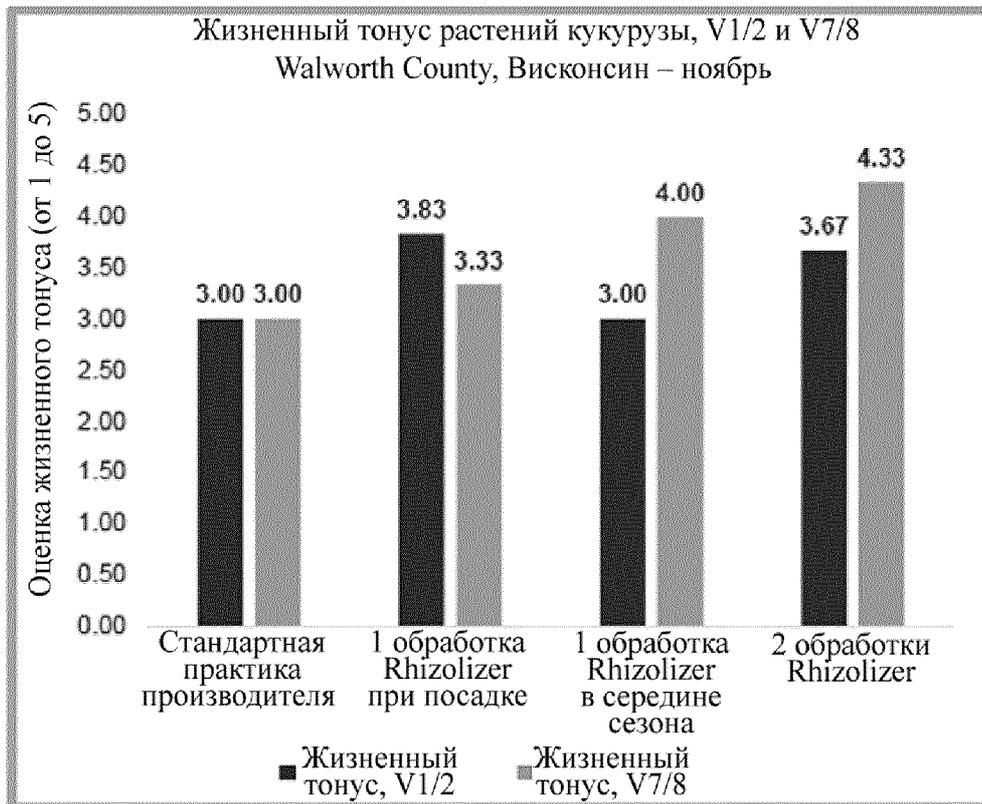
ФИГ. 28В



DKS 56-45

Третья обработка статистически значима при $p=0,1$,
а четвертая обработка значима при $p=0,05$

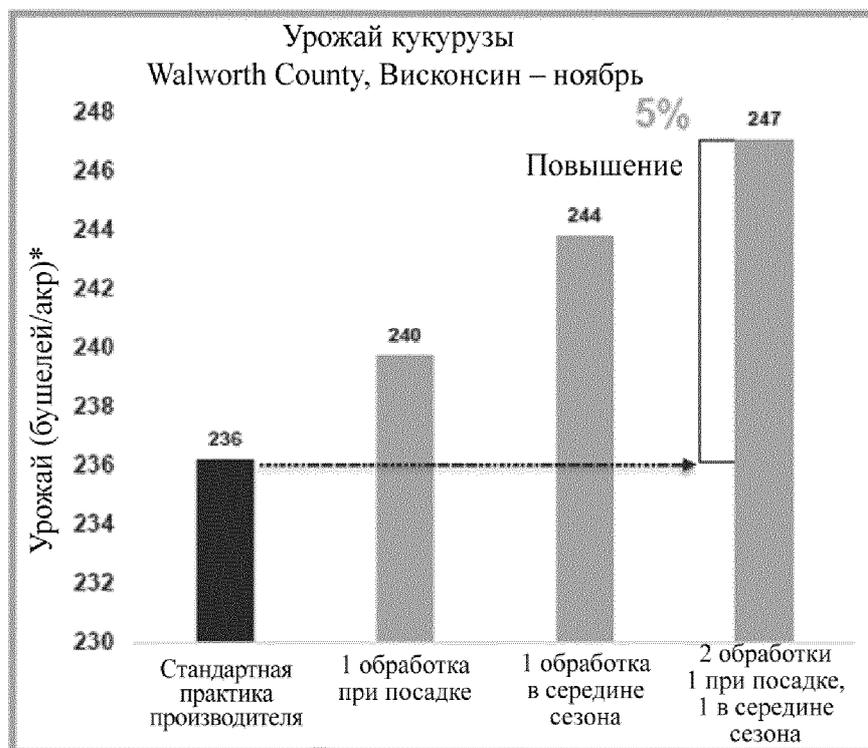
ФИГ. 29



DKS 56-45

Все обработки статистически значимы при V1/2

Обработки 3+4 статистически значимы

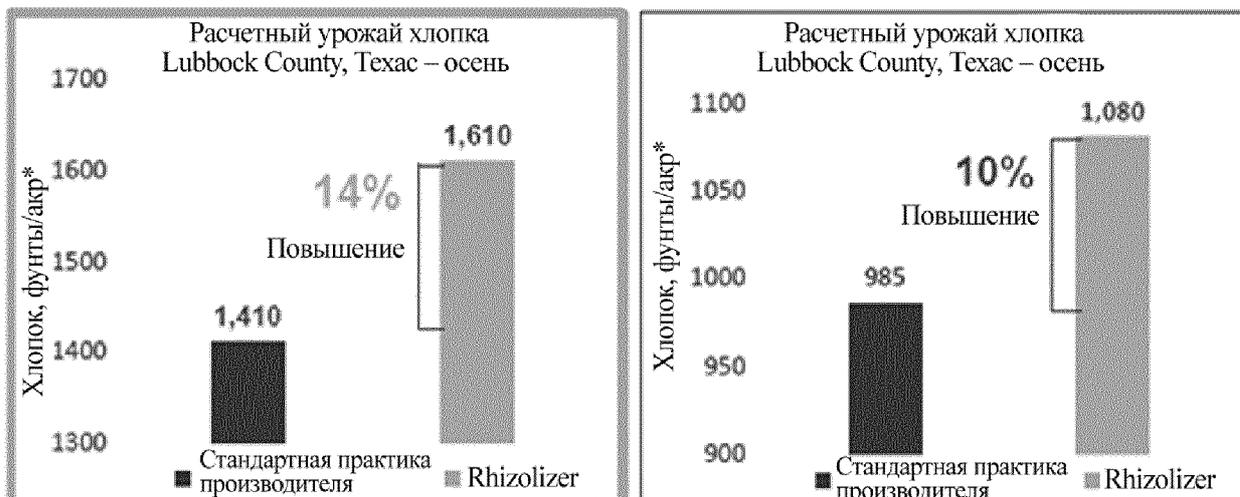
Обработка 2 статистически значима при $p=0,1$ и V7/8**ФИГ. 30**

DKS 56-45

Обработки 3 и 4 статистически значимы при $p=0,1$

* 1 бушель = 35,2 л, 1 акр = 0,4 га

ФИГ. 31



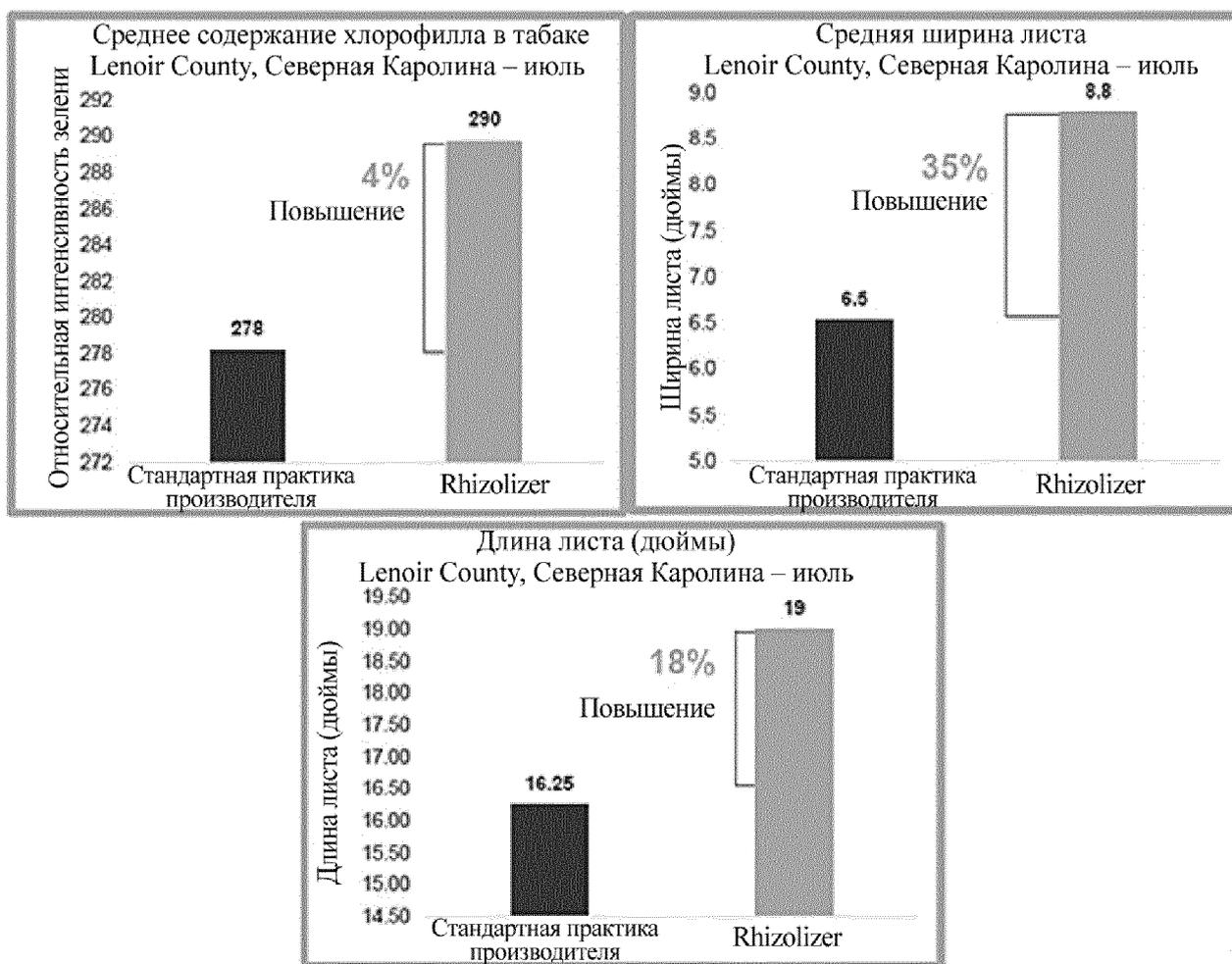
Сорта: DP1322, FM1911, FM2322, РНУ499

Обрабатывали раз в две недели; 3 обработки; 3 жидких унции/акр (примерно 0,2 л/га)

На обеих площадях выращивали четыре разных сорта с разным временем созревания

* 1 фунт = 0,45 кг, 1 акр = 0,4 га

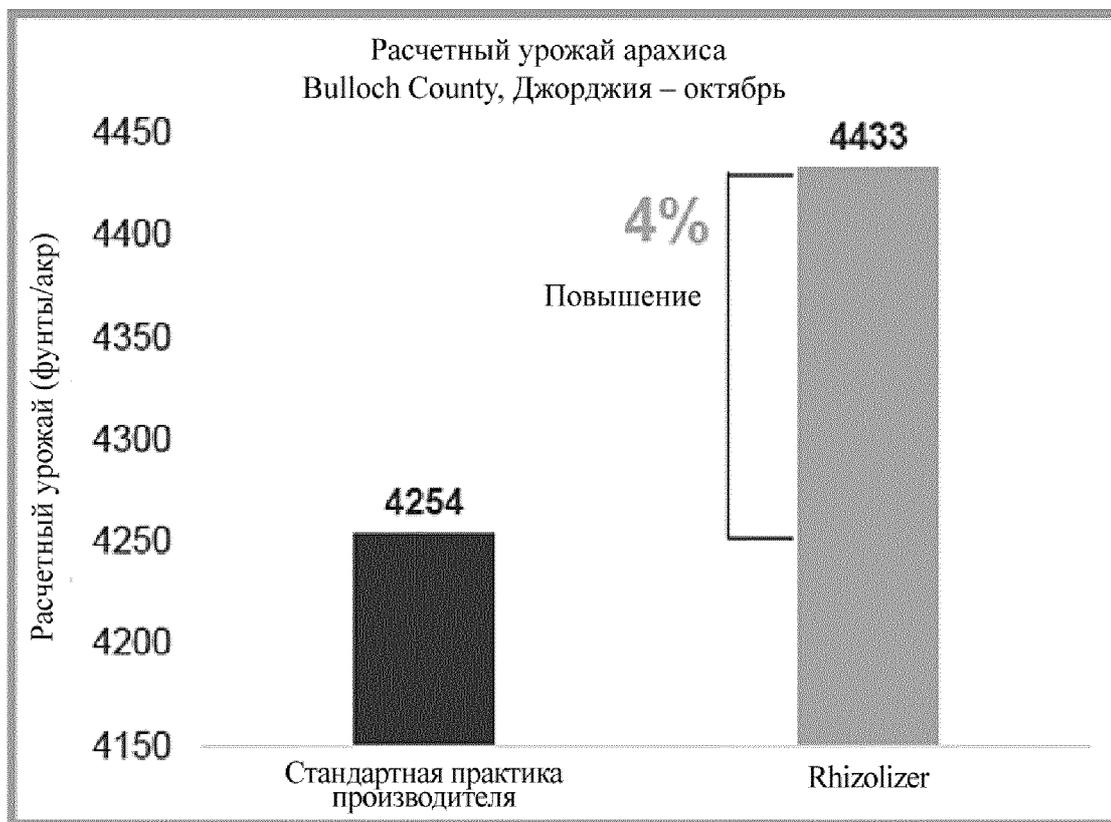
ФИГ. 32



Сорт: CC1063

Обрабатывали один раз при пересадке; 3 жидких унции/акр (примерно 0,2 л/га)

ФИГ. 33



Сорт Runner

При посадке; 1 обработка; 3 жидких унции/акр (примерно 0,2 л/га)

ФИГ. 34