

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191331** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.10.22

(22) Дата подачи заявки
2019.11.26

(51) Int. Cl. **C05F 11/08** (2006.01)
C05G 3/00 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

**(54) КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ СВОЙСТВ
РИЗОСФЕРЫ И ЗДОРОВЬЯ РАСТЕНИЙ**

(31) 62/771,703

(32) 2018.11.27

(33) US

(86) PCT/US2019/063355

(87) WO 2020/112844 2020.06.04

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

(72) Изобретатель:

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

(74) Представитель:

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

(57) Изобретение относится к композициям и способам для улучшения иммунитета, здоровья, роста и урожайности растений, а также для улучшения свойств ризосферы посредством применения полезных микроорганизмов и/или побочных продуктов, выделяемых ими при росте. В частности, настоящее изобретение позволяет улучшать здоровье, рост и/или урожайность растений посредством нанесения (внесения) композиции на основе дрожжей на растение (например, корни) и/или в окружающую растение среду (например, почву). В частности, в одном из примеров осуществления настоящего изобретения применяют дрожжи-убийцы *Wickerhamomyces anomalus* и/или близкородственный вид дрожжей.



A1

202191331

202191331

A1

КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ СВОЙСТВ РИЗОСФЕРЫ И ЗДОРОВЬЯ РАСТЕНИЙ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка претендует на приоритет предварительной патентной
5 заявки US 62/771703, поданной 27 ноября 2018 г., содержание которой полностью
включено в настоящую заявку посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Некоторые общие проблемы сельского хозяйства все еще продолжают
препятствовать способности сельхозпроизводителей получать максимальные
10 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
затруднения, испытываемые растениями при поглощении питательных веществ и
15 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
бактериальных инфекций гибли целые сельскохозяйственные угодья, что приводило
20 к снижению производства и повышению цен на цитрусовую продукцию по всему
миру.

Позеленение цитрусовых, которое также известно как болезнь Huanglongbing
(сокращенно – HLB) или болезнь желтого дракона, является неизлечимой
инфекцией, вызываемой грамотрицательной бактерией *Candidatus Liberibacter*
25 *asiaticus*. Это заболевание вызывает опустошение миллионов акров культур
цитрусовых в Соединенных Штатах и других частях мира. На инфицированных
деревьях вырастают горькие зеленые плоды неправильной формы, непригодные
для продажи. Это заболевание распространяется инфицированным насекомым,
азиатской листоблошкой цитрусовых, которая серьезно угрожает будущему всех
30 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 листве, инфекция обычно уже вызывает значительные повреждения в корневой системе, приводя к потере до 50% плотности корневых волокон.

5 По мере развития симптомов в кроне, корневая плотность продолжает постепенно снижаться. Вероятно, это объясняется закупориванием лубяной ткани, что затрудняет движение сахаров к корневой системе. Корни жизненно необходимы для выживания и роста растения. Потеря значительной части корней сильно
10 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
15 система растения и из которой она поглощает воду и питательные вещества. Для введения 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
20 болезней. Однако при сниженной усваивающей способности, когда, например, повреждена корневая система растения, 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
25 загрязнения окружающей среды, их ответственное использование является важной экологической и коммерческой задачей. Слишком сильная зависимость от определенных химических удобрений, пестицидов и антибиотиков и их долговременное применение может изменять экосистемы почв, снижать их стрессоустойчивость, повышать популяцию устойчивых вредителей, замедлять рост
30 и снижать 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 взаимоотношений.

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 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 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. В частности, имеется необходимость создания продуктов для добавления в почвы с целью улучшения роста и урожайности сельскохозяйственных культур, в особенности, если иммунитет растений снижен.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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.

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 здоровья и/или роста корневой системы растения, а также за счет стимулирования естественной иммунной и других метаболических систем растения, которые вносят

свой вклад в поддержание здоровья и урожайности растений. В некоторых примерах осуществления применение способов может улучшать способность ризосферы к удержанию питательных веществ и/или влаги.

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). Таким образом, в одном из примеров осуществления настоящее изобретение может быть применено для улучшения иммунитета и/или иммунного ответа растения.

Один из примеров осуществления настоящего изобретения относится к композициям для обработки почвы, включающим микроорганизм и/или побочный продукт, выделяемый при его росте. Изобретение также относится к способам культивирования микроорганизма и/или побочного продукта, выделяемого при его росте.

В одном из примеров осуществления композиция для обработки почвы включает микроорганизмы, характеризующиеся как непатогенный штамм дрожжей. Предпочтительно, композиция включает непатогенный штамм "дрожжей-убийц" (т.е. дрожжевой штамм-убийцу), такой как *Wickerhamomyces anomalus* или другой родственной дрожжевой штамм.

В одном из примеров осуществления композиция включает один или более побочных продуктов, выделяемых дрожжами при росте или метаболиты дрожжей. Например, *W. anomalus* может продуцировать ряд метаболитов, включая такие ферменты, как фитаза и экзо-бета-1,3-глюканаза, а также биологические поверхностно-активные вещества, включающие фосфолипиды и/или гликолипиды.

В одном из примеров осуществления в композицию могут быть включены дополнительные микроорганизмы, при условии, что они совместимы с дрожжами и/или побочными продуктами роста дрожжей. 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 на момент обработки, а также других факторов. Таким образом, композиция может 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 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 микроорганизмы являются живыми.

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 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 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.

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.

Один из примеров осуществления относится к способам улучшения здоровья, роста и/или урожайности растений, где способ включает приведение композиции для обработки почвы, включающей дрожжи и/или выделяемые ими при росте побочные продукты, в контакт с растением и/или с окружающей его средой. Предпочтительно дрожжи представляют собой *Wickerhamomyces anomalus* или вид микроорганизмов того же рода и/или семейства.

В некоторых примерах осуществления композицию для обработки почвы приводят в контакт с частью растения. В одном из конкретных примеров осуществления композицию приводят 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). Композиция может быть нанесена на семена растения до или во время посадки или на любую другую часть растения и/или в окружающую его среду.

В одном из примеров осуществления применение способа может улучшить здоровье, рост и/или урожайность растения посредством улучшения здоровья и/или роста корней растения. Это может быть достигнуто за счет, например, улучшения общей благоприятности ризосферы, в которой развиваются корни растения. В частности, в одном из примеров осуществления способы могут быть применены для повышения способности ризосферы к удержанию питательных веществ и/или влаги. В некоторых примерах осуществления композиции и способы согласно настоящему изобретению улучшают усвоение питательных веществ и/или поглощение воды растениями.

Кроме того, в одном из примеров осуществления способ может быть применен для инокуляции ризосферы растения полезным микроорганизмом. Например, дрожжи, содержащиеся в композиции для обработки почвы, могут колонизировать ризосферу растения и оказывать на растение полезное влияние

через поверхность раздела корни-почва, где полезное влияние включает защиту, питание и метаболическую сигнальную функцию, которая поддерживает непосредственное взаимодействие между геномами микроорганизмов и растения.

В другом примере осуществления способ может быть применен для улучшения способности полезных микроорганизмов колонизировать ризосферу. В другом примере осуществления способ может быть применен предотвращения и/или снижения способности колонизировать ризосферу почвенными микроорганизмами, оказывающими пагубное влияние, или микроорганизмами, которые могут конкурировать с полезными почвенными микроорганизмами.

Кроме того, в одном из примеров осуществления способ может быть применен для предоставления растению питательного вещества и/или для устранения и/или предотвращения дефицита питательного вещества у растения. Например, в одном из примеров осуществления, если дрожжи, содержащиеся в композиции для обработки почвы, не активны, или если они погибают, то их клетки предоставляют широкий спектр питательных веществ, белков, витаминов и минералов, которые могут использоваться растениями и/или другой микрофлорой почвы.

В другом примере осуществления способ может быть применен для доставки к растению фосфора в виде фосфатов. Это происходит благодаря тому, что *W. anomalus* может продуцировать фитазу – фермент, способный превращать фитиновую (инозитгексафосфорную) кислоту, присутствующую в почве, в биодоступные для растения фосфаты (например, поглощаемые корнями). Соответственно, способ может быть применен для устранения и/или предотвращения дефицита фосфора у растений.

Предпочтительно, способы согласно изобретению могут быть применены для улучшения здоровья, роста и/или урожайности растений, имеющих пониженный иммунитет в результате воздействия инфекции, вызываемой патогенным или биотическим агентом, или в результате воздействия стрессогенного фактора окружающей среды, такого как, например, засуха. Таким образом, способы согласно изобретению также могут быть применены для повышения иммунитета или улучшения иммунного ответа растений.

В некоторых примерах осуществления микроорганизмы, содержащиеся в композиции, действуют синергически с другими ингредиентами и/или

необязательными дополнительными микроорганизмами в целях улучшения здоровья, роста и/или урожайности растений.

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 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, одним или более наноудобрениями, такими как Aqua-Yield, NanoGro™ и/или с 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 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 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. 1 представлены результаты сравнительного исследования молодых цитрусовых деревьев, обработанных композицией, включающей *W. anomalus* ("STR10"), и необработанных контрольных деревьев. Высоту, диаметр (толщину) 5 ствола и показатель роста (ПР) измеряли в течение периода, составляющего 6 месяцев после обработки.

На Фиг. 2 представлены результаты сравнительного исследования молодых цитрусовых деревьев, обработанных композицией, включающей *W. anomalus* ("STR10"), и необработанных контрольных деревьев, в котором в течение периода, 10 составляющего 18 месяцев, измеряли высоту деревьев.

На Фиг. 3 представлены результаты сравнительного исследования молодых цитрусовых деревьев, обработанных композицией, включающей *W. anomalus* ("STR10"), и необработанных контрольных деревьев, в котором в течение периода, составляющего 18 месяцев, измеряли показатель роста (ПР).

15 На Фиг. 4 представлены результаты сравнительного исследования молодых цитрусовых деревьев, обработанных композицией, включающей *W. anomalus* ("STR10"), и необработанных контрольных деревьев, в котором в течение периода, составляющего 18 месяцев, измеряли диаметр ствола.

20 На Фиг. 5А-5В представлены результаты сравнительного исследования молодых цитрусовых деревьев, обработанных композицией, включающей *W. anomalus* ("STR10"), и необработанных контрольных деревьев, в котором определяли процентную долю деревьев, на которых наблюдали рост новых побегов (5А), и среднее количество побегов на одном дереве (5В).

25 На Фиг. 6 представлены результаты сравнительного исследования молодых цитрусовых деревьев, обработанных композицией, включающей *W. anomalus* ("STR10"), и необработанных контрольных деревьев, в котором определяли среднее количество плодов на одном дереве.

30 На Фиг. 7А-7В представлены результаты сравнительных исследований растений салата-латука, обработанных композицией, включающей *W. anomalus* ("STR10"), и необработанных контрольных растений (7А), и растений салата-латука, обработанных STR10 плюс композицией, включающей *Trichoderma harzianum* и

Bacillus amyloliquefaciens ("ThBa"), и необработанных контрольных растений (7B), в котором определяли среднюю массу (г) кочанов салата-латука.

На Фиг. 8A-8B представлены результаты сравнительного исследования растений арахиса, обработанных композицией, включающей *W. anomalus* ("STR10"), и необработанных контрольных растений, в котором определяли среднее количество цветков на 30 кв. футов (что приблизительно составляет 2,8 м²) (8A) и средний размер кроны (дюймы) (8B).

На Фиг. 9A-9B представлены результаты сравнительных исследований растений цуккини, обработанных композицией, включающей *W. anomalus* ("STR10"), STR10 плюс композицией, включающей *Trichoderma harzianum* и *Bacillus amyloliquefaciens* ("ThBa"), и необработанных контрольных растений, в котором определяли содержание азота (9A) и содержание магния (9B) в ткани листьев.

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 урожай 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, в одном из примеров осуществления настоящее изобретение может быть применено для улучшения здоровья, роста и/или урожайности цитрусовых растений, инфицированных, например, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (болезнью позеленения цитрусовых) и/или *Xanthomonas axonopodis* (раком цитрусовых).

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 КОЭ (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 роста микроорганизмов, непитательные усилители роста и/или агенты,
- 30 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.

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

Употребляемый в настоящей работе термин “биопленка” означает сложный агрегат, состоящий из микроорганизмов, таких как бактерии, в котором клетки склеены друг с другом. В некоторых примерах осуществления клетки секретируют
10 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.

Употребляемый в настоящей работе термин “выделенное” или “очищенное”
15 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.
20 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
25 виде, например, биологически чистой культуры или в виде спор (или других форм штамма) в комбинации с носителем.

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
30 культура была отделена от всех остальных 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. (масса сухого вещества) представляющего интерес соединения. Предпочтительно препарат содержит по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99%, масс. представляющего интерес 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 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 веществу, участие которого в конкретном виде метаболического процесса необходимо. Метаболит может представлять собой органическое соединение, которое является исходным материалом (например, глюкоза), промежуточным веществом (например, ацетил-СоА) или конечным продуктом (например, н-бутанол) метаболизма. Примеры метаболитов включают, без ограничений, биологические поверхностно-активные вещества, биополимеры, ферменты, кислоты, растворители, спирты, белки, витамины, минералы, микроэлементы и аминокислоты.

Употребляемый в настоящей работе термин “модулировать” означает “вызывать изменения” (например, повышение или понижение). Такие изменения обнаруживаются стандартными способами, известными в данной области техники.

Следует понимать, что цитируемые в настоящей работе диапазоны представляют собой сокращенные записи всех значений, находящихся в пределах 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, 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.

5 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%.

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
15 средства. “Биологическое поверхностно-активное вещество” представляет собой поверхностно-активное вещество, производимое живым организмом.

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
20 средств, пищевых добавок, для декоративных целей и других целей. Согласно настоящему изобретению, сельское хозяйство также может включать садоводство, ландшафтный дизайн, устройство садов, консервацию растений, лесоводство и лесовосстановление, восстановление пастбищ и прерий, плодоводство, разведение декоративных древесных пород и агрономию. Дополнительно в сельское хозяйство
25 включены уход за почвой, ее мониторинг и сохранение.

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 улучшенное прорастание и/или всхожесть семян, повышенную способность отражать атаки вредителей и/или заболевания и повышенную способность переживать воздействие факторов экологического стресса, таких как засуха и/или переувлажнение. Усиление роста растения и/или увеличение биомассы растения означает увеличение размера и/или массы растения в надземной и подземной

части (например, увеличение кроны/листового объема, высоты, диаметра ствола, длины ветвей, длины побегов, содержания белка, размера/плотности корней и/или общего показателя роста) и/или повышение способности растения достигать требуемого размера и/или массы. Улучшенные урожаи означают улучшение конечных продуктов, производимых растениями сельскохозяйственной культуры, например, увеличение количества и/или размера плодов, листьев, корней и/или клубней у одного растения и/или повышение качества плодов, листьев, корней и/или клубней (например, улучшение вкуса, текстуры, повышение градуса по Бриксу, повышение содержания хлорофилла и/или улучшение цвета).

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 развиться 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 “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 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 быть одноклеточными или многоклеточными организмами, примеры которых включают, без ограничений, вирусы, грибки, бактерии, паразиты, простейшие 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 улучшения свойства почвы и/или ризосферы. 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 увеличения биомассы растений могут быть применены 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, для предотвращения 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 “абиотический стрессогенный фактор” означает неживое состояние, которое оказывает отрицательное воздействие на живой организм в определенной окружающей среде. Для того, чтобы оказывать значительное негативное влияние на жизнедеятельность популяции или физиологию индивидуального организма, абиотический стрессогенный фактор должен оказывать на окружающую среду влияние, выходящее за пределы нормального диапазона ее вариаций. Примеры абиотических стрессогенных факторов включают, без ограничений, засуху, экстремальные температуры (высокие или низкие), наводнение, сильные ветра, природные катастрофы (например, ураганы, лавины, торнадо), изменения pH почвы, высокую радиацию, уплотнение почвы, промышленные выбросы и другие факторы. Напротив, “биотический стрессогенный фактор” представляет собой повреждение и/или вредоносное воздействие на живой организм другого живого организма. Биотические стрессогенные факторы могут включать, например, повреждение и/или заболевание, вызываемое вредителем, конкуренцию с другими организмами за ресурсы и/или пространство и различную деятельность человека.

Переходный термин “включающий”, который является синонимом термину “содержащий”, имеет неограничивающее или открытое значение и не исключает 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 влияния на основную и новую характеристику (характеристики)” заявляемого изобретения. Употребление термина “включающий” предусматривает наличие
5 примеров осуществления, которые “состоят” или “по существу состоят из” указанного компонента (компонентов).

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

Если четко не указано иное или иное не следует из контекста, употребляемый в настоящей работе термин “приблизительно” включен в диапазон нормального допуска, известного в данной области техники, например, в величину,
15 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
20 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.

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

Композиции для обработки почвы

Один из примеров осуществления настоящего изобретения относится к композициям для обработки почвы, включающим микроорганизм и/или побочный
30 продукт, выделяемый им при росте. Композиция для обработки почвы может быть применена для улучшения здоровья, роста и/или урожайности растений, даже если растения были инфицированы патогеном или заболеванием. В частности, композиции согласно изобретению могут быть применены для улучшения здоровья

и/или роста корней растения и/или для повышения иммунитета растения. В некоторых примерах осуществления композиции для обработки почвы также может быть применена для инокуляции корней и/или ризосферы растения, в которой произрастают корни, полезным микроорганизмом.

5 Так, в предпочтительных примерах осуществления композиции на основе микроорганизмов согласно настоящему изобретению нетоксичны и могут быть нанесены (внесены) 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
10 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 включает непатогенные дрожжи. Предпочтительно композиция включает
15 непатогенные “дрожжи-убийцы”, такие как *Wickerhamomyces anomalus* или другие родственные им дрожжи.

В одном из примеров осуществления композиция включает один или более побочных продуктов, выделяемых дрожжами при росте, или метаболитов дрожжей. Например, *W. anomalus* может продуцировать множество различных метаболитов,
20 включая ферменты, такие как фитаза и экзо-бета-1,3-глюканаза, а также биологические поверхностно-активные вещества, включающие фосфолипиды и/или гликолипиды.

В некоторых примерах осуществления композиция может дополнительно включать один или более дополнительных микроорганизмов, которые могут быть
25 полезны для улучшения свойств ризосферы и/или улучшения здоровья растений. Вид и соотношение дополнительных микроорганизмов и/или других ингредиентов в композиции может быть уточнен в соответствии, например, с видом обрабатываемого растения, типом почвы, в которой произрастает растение, здоровьем растения на момент обработки, а также от других факторов. Таким
30 образом, композиция может быть оптимизирована для обработки любой сельскохозяйственной культуры.

Например, в одном из примеров осуществления композиция дополнительно включает грибок *Trichoderma* spp., такой как, например, *T. harzianum*, *T. viride*, *T.*

hamatum и/или *T. reesei*. В одном из примеров осуществления композиция дополнительно включает бактерию *Bacillus* spp., такую как, например, *B. subtilis* и/или *B. amyloliquefaciens*.

В одном из примеров осуществления композиция дополнительно включает микроорганизм, способный фиксировать, солюбилизовать и/или мобилизовывать азот, калий, фосфор (или фосфат) и/или питательные микроэлементы, содержащиеся в почве. В один из примеров осуществления могут быть включены азотфиксирующие бактерии, такие как, например, *Azotobacter vinelandii*. В другой пример осуществления могут быть включены калиймобилизующие бактерии, такие как, например, *Frateuria aurantia*.

В одном из примеров осуществления микроорганизм или комбинация микроорганизмов в композиции согласно изобретению составляет приблизительно от 5 до 20% или приблизительно от 8 до 15% или приблизительно от 10 до 12% от общей массы композиции. 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 (колониеобразующих единиц/мл) каждого микроорганизма.

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

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.

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 неочищенной форме. Биологические поверхностно-активные вещества в

неочищенной форме могут включать, например, биологические поверхностно-активные вещества и другие продукты клеточного роста, содержащиеся в среде ферментации, которые образуются в результате культивирования микроорганизма, вырабатывающего биологическое поверхностно-активное вещество. Композиция, 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, маннозилэритритоллипидов и трегалозолипидов), липопептидов (например, сурфактина, итурина, фенгицина, артрофактина и лихенизина), флаволипидов, фосфолипидов (например, кардиолипидов) 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
5 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,
10 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 (% масс.) приблизительно от 0,01% до 100%, приблизительно от 1% до 90%, приблизительно от 5% до приблизительно 80% или приблизительно от 10% до
15 приблизительно 75%.

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.

20 В одном из примеров осуществления, если в композицию включена комбинация штаммов микроорганизма, разные штаммы микроорганизма выращивают по отдельности и затем смешивают друг с другом, получая композицию для обработки почвы.

В одном из примеров осуществления композицию предпочтительно
25 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,
30 микрокапсул, масел или аэрозолей.

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
- 15 и/или микроорганизма, такими 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, гуamat 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 применяться, например, совместно с природными и/или химическими пестицидами (например, азоксистробинном,
- 25 ипконазолом, металаксилом, трифлуксистробинном, клотианидином, VOTiVO, тиаметоксамом, циантринилипролом, флудиоксонилом, тиоксазафеном, гликолипидами, липопептидами, ДЭТА (англ. DEET, от "N,N-diethyl-3-methylbenzamide"), диатомитовой землей (кизельгуром), цитронеллой, эфирными маслами, минеральными маслами, экстрактом чеснока, экстрактом чилийского
- 30 перца), репеллентами, гербицидами, удобрениями, веществами для обработки воды, неионными поверхностно-активными веществами и/или почвоулучшителями, которые совместимы с применяемым микроорганизмом или комбинацией микроорганизмов.

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, биоцид, 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 конечной композиции на основе микроорганизмов составляет приблизительно от 3,0 до 8,0 или приблизительно от 3,5 до 7,0.

До момента применения композиция необязательно может храниться. Предпочтительно продолжительность хранения 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.

Тем не менее, композиции на основе микроорганизмов могут быть применены без дополнительной стабилизации, консервации и хранения. Предпочтительно, непосредственное применение таких композиций на основе микроорганизмов позволяет сохранять высокую жизнеспособность микроорганизмов, снижать возможность загрязнения посторонними веществами и нежелательными микроорганизмами и сохранять активность побочных продуктов, получаемых в результате роста микроорганизмов.

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

5 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
10 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 перечисленных способов.

15 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 модифицированными вариантами.

20 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 компонентов (например, ферментов и других белков).

25 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 может быть соединена с функциональными контроллерами/датчиками для измерения важных параметров способа культивирования, таких как pH, параметры
30 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

емкости (например, определять численность клеток и фазы роста). В альтернативном варианте из емкости ежесуточно 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.

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 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 глубинной ферментации обогащенный кислородом воздух может представлять собой обычный окружающий воздух, подаваемый ежесуточно 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.

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, 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 или более 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.

5 В одном из примеров осуществления способ культивирования микроорганизмов осуществляют при температуре от приблизительно 5°C до приблизительно 100°C, предпочтительно от 15°C до 60°C, более предпочтительно от 25°C до 50°C. В другом примере осуществления культивирование может быть
10 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 культивирования, такое как реактор/емкость, может быть отделено от установки для
15 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. Например, перед введением в емкость обычный окружающий воздух может быть
20 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
25 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 культивирование штамма микроорганизма согласно настоящему изобретению в
30 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

5 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 КОЭ/мл.

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

В одном из примеров осуществления всю композицию, полученную культивированием микроорганизмов, извлекают по завершении культивирования

15 (например, после достижения требуемой плотности клеток или плотности определенного метаболита). В такой периодической процедуре после сбора первой партии начинают получение абсолютно новой партии продукта.

В другом примере осуществления за один раз извлекают лишь часть продукта ферментации. В этом примере осуществления биомасса, содержащая

20 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

25 режиме.

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

30 культивировали.

Предпочтительно продукты на основе микроорганизмов могут быть получены в отдаленных зонах. Установки для выращивания микроорганизмов могут работать

в отсутствие электрической сети, например, используя солнечную энергию, ветер и/или гидроэлектрическую энергию.

Штаммы микроорганизмов

Микроорганизмы, подходящие для применения согласно настоящему изобретению, могут представлять собой, например, непатогенные для растений штаммы бактерий, дрожжей и/или грибов. 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 грибов, 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 некоторых примерах осуществления микроорганизм представляет собой любые дрожжи, известные как “дрожжи-убийцы”, отличающиеся тем, что они вырабатывают токсичные белки или гликопротеины, к которым сам штамм имеет иммунитет. Такие дрожжи могут включать, например, *Candida* (например, *C.*

nodaensis), *Cryptococcus*, *Debaryomyces* (например, *D. hansenii*), *Hanseniaspora*, (например, *H. uvarum*), *Hansenula*, *Kluyveromyces* (например, *K. phaffii*), *Pichia* (например, *P. anomala*, *P. guilliermondii*, *P. occidentalis*, *P. kudriavzevii*), *Saccharomyces* (например, *S. cerevisiae*), *Torulopsis*, *Ustilago* (например, *U. maydis*),
 5 *Wickerhamomyces* (например, *W. anomalus*), *Williopsis* (например, *W. mrakii*), *Zygosaccharomyces* (например, *Z. bailii*) и другие микроорганизмы.

В некоторых примерах осуществления микроорганизмы представляют собой бактерии, включающие грамположительные и грамотрицательные бактерии. Бактерии могут представлять собой, например, *Agrobacterium* (например, *A.*
 10 *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, *Myxococcus xanthus*, *Stigmatella aurantiaca*, *Sorangium*
 15 *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 настоящего изобретения
 20 применяют дрожжи-убийцы. Предпочтительно, эти дрожжи способны колонизировать корневую систему растения на поверхности раздела корни-почва и оказывать ряд полезных воздействий на ризосферу. Более конкретно, микроорганизмы согласно настоящему изобретению включают *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*). Изобретение также включает применение других
 25 родственных видов, включающих другие члены клад *Wickerhamomyces* и/или *Pichia*, например, *Pichia guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*), *Pichia kudriavzevii* и/или *Pichia occidentalis*.

Микроорганизм *W. anomalus* имеет ряд полезных характеристик, подходящих для применения согласно настоящему изобретению, включая способность
 30 вырабатывать полезные метаболиты. Например, микроорганизм *W. anomalus* способен вырабатывать экзо-β-1,3-глюканазу, фермент, который может регулировать или ингибировать рост широкого спектра патогенных грибов.

В одном из примеров осуществления микроорганизм *Wickerhamomyces anomalus* способен вырабатывать одно или более биологических поверхностно-

активных веществ, включая, например, фосфолипид и/или гликолипид. В некоторых примерах осуществления фосфолипид представляет собой кардиолипин или другой фосфолипид, структурно подобный кардиолипину. В некоторых примерах осуществления гликолипид представляет собой софоролипид.

- 5 Кроме различных побочных продуктов эти дрожжи способны вырабатывать фитазу и предоставлять совокупность белков (составляющих до 50% сухой клеточной биомассы), липидов и источников углерода, а также целый спектр минералов и витаминов (B1; B2; B3 (PP); B5; B7 (H); B6; E).

- 10 В некоторых примерах осуществления микроорганизм представляет собой грибок *Trichoderma* spp., такой как, например, *T. harzianum*, *T. viride*, *T. hamatum* и/или *T. reesei*.

- 15 Кроме защиты растений от патогенов и вредителей, колонизация корней организмом *Trichoderma* spp. может усиливать рост и улучшать развитие корней, производительность сельскохозяйственной культуры, устойчивость к абиотическим стрессам и биодоступность питательных веществ.

- 20 В некоторых примерах осуществления микроорганизм представляет собой бактерию *Bacillus* spp., такую как, например, *B. subtilis* и/или *B. amyloliquefaciens*. В одном из примеров осуществления бактерия представляет собой *B. amyloliquefaciens* subsp. *locus*. В некоторых примерах осуществления микроорганизм *Bacillus* может переводить в растворимое состояние находящиеся в почве соединения фосфора.

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

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

- 30 В одном из примеров осуществления микроорганизм представляет собой азотфиксирующий микроорганизм или дiazотроф, 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*.

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

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.

5 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.

10 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

15 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

20 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,

25 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

30 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 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 (что приблизительно составляет менее 482,8, 402,3, 321,9, 241,4, 160,9, 120,7, 80,5, 40,2, 24,1, 16,1, 8,05, 4,8 или 1,6 км) от участка применения.

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.

5 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 10 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, 15 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 20 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 роще).

Предпочтительно рассмотренные установки для выращивания 25 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 30 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
 5 настоящему изобретению позволяют эффективно использовать 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
 10 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
 15 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

Предпочтительные примеры осуществления относятся к способу улучшения здоровья, роста и/или урожайности растений, в котором композицию для обработки
 20 почвы, включающую дрожжи и/или побочный продукт, выделяемый ими при росте, приводят в контакт с растением и/или с окружающей его средой. Предпочтительно дрожжи представляют собой *Wickerhamomyces anomalus* или родственный им вид. В некоторых примерах осуществления способами согласно изобретению обрабатывают совокупность растений и/или окружающую их среду.

В некоторых примерах осуществления композицию для обработки почвы приводят в контакт с растением или с окружающей его средой после приготовления композиции, например, растворением высушенного порошка или гранул в воде. Для улучшения или стабилизации эффекта от обработки композицией, композиция может быть смешана с подходящими вспомогательными веществами и затем
 25 применена как таковая или, при необходимости, после разбавления.

В одном из примеров осуществления одновременно с дрожжами 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 солюбилизировать азот, калий, фосфор (или фосфат) и/или другие питательные микроэлементы, находящиеся в почве. В одном из примеров осуществления также 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 микроорганизмы, содержащиеся в композиции, оказывают совместное синергическое воздействие, улучшая здоровье, рост и/или урожайность растений и/или улучшая свойства ризосферы.

В некоторых примерах осуществления способы дополнительно включают внесение вместе с композицией материалов, применяемых для улучшения роста 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, 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 развиваются корни 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 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 как, например, засуха. Таким образом, в некоторых примерах осуществления способы согласно изобретению также могут быть применены для усиления здорового иммунитета или иммунной реакции растений.

5 Употребляемый в настоящей работе термин “нанесение (внесение)” композиции или продукта означает приведение композиции или продукта в контакт с целевым 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
10 растением, а также действием метаболита, фермента, биологического поверхностно-активного вещества или другого побочного продукта, выделяемого микроорганизмами при росте. Нанесение (внесение) также может включать “обработку” композицией целевого объекта или участка.

 Нанесение может дополнительно включать контакт продукта на основе
15 микроорганизмов непосредственно с растением, частью растения и/или со средой, окружающей растение (например, почвой или ризосферой). Употребляемый в настоящей работе термин “окружающая среда (окружение)” растения означает почву и/или другую среду, в которой произрастает растение, которая может включать ризосферу. В некоторых примерах осуществления радиус окружающей
20 среды (окружения) не превышает, например, расстояния, составляющего 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
25 1,8 м) от растения.

 Продукт на основе микроорганизмов может быть нанесен в виде обработки семян или поверхности почвы, или нанесен на поверхность растения или части растения (например, на поверхность корней, клубней, стеблей, цветков, листьев или плодов). Продукт может быть распылен, налит, разбрызган, введен или
30 распределен в виде жидкости, сухого порошка, мелкодисперсного порошка, гранул, микрогранул, гранул неправильной формы, смачиваемого порошка, текучего порошка, эмульсий, микрокапсул, масел, гелей, паст или аэрозолей.

 В одном из конкретных примеров осуществления композицию приводят 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
5 окружающую его среду.

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
10 доставляется, например, к корням растений.

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
15 роста растения, примеры которого включают: цветение, плодоношение растения и 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 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,
20 или с помощью распыления по борозде, в которую помещают семена, или с 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 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.
30

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 *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*; *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 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, в сельском хозяйстве, садоводстве, оранжереях, в ландшафтном дизайне и в
 25 подобных условиях. Настоящее изобретение также может быть применено для улучшения одного или более качеств почвы, что позволяет улучшать эксплуатационные характеристики почвы с точки зрения ее использования в сельском хозяйстве, домашнем огородничестве и садоводстве. Кроме того, настоящее изобретение может быть применено для возделывания пастбищ, а также
 30 в профессиональном возделывании ландшафта и травяного покрова.

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, может быть улучшен рост микроорганизмов, фиксирующих питательные вещества, таких как *Rhizobium* и/или *Mycorrhizae*, а также других полезных эндогенных и экзогенных микроорганизмов и/или побочных продуктов их жизнедеятельности, которые способствуют улучшению роста, здоровья и/или урожайности сельскохозяйственных культур. Продукт на основе микроорганизмов также может поддерживать сосудистую систему растения, например, проникая и колонизируя сосудистую систему растения и доставляя, таким образом, метаболиты и питательные вещества, важные для поддержания здоровья и производительности растений.

В другом примере осуществления способ может быть применен для борьбы с колонизацией и/или предотвращения колонизации ризосферы вредными почвенными микроорганизмами или почвенными микроорганизмами, которые могут конкурировать с полезными почвенными микроорганизмами.

В одном из примеров осуществления способ может быть применен для улучшения проникновения полезных молекул через наружные слои клеток корневой системы, например, расположенных на поверхности раздела корни-почва в ризосфере.

Настоящее изобретение может быть применено для улучшения любых 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. Почва может включать почву, находящуюся в ризосфере, или почву, находящуюся вне ризосферы.

В одном из примеров осуществления способ может быть применен для 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 улучшения удержания питательных веществ в пористых и/или истощенных почвах. Кроме того, в одном из примеров осуществления способ может быть применен для предоставления растению питательного вещества и/или для устранения и/или

предотвращения дефицита питательного вещества у растения. Например, в одном из примеров осуществления после гибели дрожжей, содержащихся в композиции для обработки почвы, их клетки являются источником большого количества питательных веществ, белков, витаминов и минералов, которые могут быть использованы растениями или другими почвенными микроорганизмами.

В другом примере осуществления, в котором дрожжи, содержащиеся в композиции для обработки почвы, вырабатывают фитазу, способ может быть применен для обеспечения растения фосфором в виде фосфатов. Фитаза может превращать присутствующую в почве фитиновую кислоту в биодоступные для растений (например, поглощаемые корнями) фосфаты. Соответственно, способ может быть применен для устранения и/или предотвращения дефицита фосфора у растения.

В одном из примеров осуществления способ позволяет устанавливать контроль над патогенными бактериями. В одном из примеров осуществления применение способа позволяет опосредованно улучшать иммунные реакции растения посредством улучшения иммунитета растений и повышения способности сопротивляться инфекциям.

В другом примере осуществления способ позволяет устанавливать контроль над вредителями, которые могут действовать как векторы или переносчики для патогенных бактерий. При большинстве заболеваний растений, вызываемых патогенными бактериями растений (в особенности, заболеваний, которые приводят к развитию пятнистости, рака, ожогов, галлов (злокачественных образований) или мягкой гнили), бактерии могут выходить на поверхность растений-хозяев, образуя капли или массы липких выделений. Бактериальные выделения выделяются через трещины или повреждения инфицированной области или через естественные отверстия, имеющиеся в инфицированной области растения. Эти бактерии затем с большой вероятностью прилипают к лапкам и телам насекомых, таких как мухи, тля, муравьи, жуки, белокрылки и т.д., которые садятся на растения и контактируют с веществом выделений.

Многих из таких насекомых привлекают содержащиеся в бактериальном выделении сахара, которыми они питаются и дополнительно размазывают по тельцу и ротовым органам. При перемещении насекомых на другие части растения или на другое восприимчивое к инфекции растение-хозяин, насекомые переносят на своем тельце множество бактерий. Если оказывается, что насекомые садятся на

свежее повреждение или на природное отверстие растения, и на поверхности растения достаточно влаги, то бактерии могут начать размножаться, проникать внутрь растения и инициировать новую инфекцию. Таким образом, способы согласно изобретению позволяют предотвращать распространение бактерий, оказывающих патогенное действие на растения, 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 могут быть применены совместно с сельскохозяйственными соединениями, характеризующимися как ингибиторы отложений, таких как, например, гидроксипропанфосфоновая кислота;

бактерицидными средствами, такими как, например, стрептомицина сульфат и/или Galltrol® (*A. radiobacter*, штамм K84);

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

- 5 удобрениями, такими 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;

- 10 фунгицидами, такими 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, этридиязол, тиофанат-метил, фенамидон, фенаримол, флудиоксонил, флуопиколоид, флутоланил, ипродион, манкоцеб, манеб, мефаноксам, флудиоксонил, мефеноксам, металаксил, миклобутанил, оксатиапипролин, пентахлорнитробензол (квинтоцен), фосфорная
- 15 кислота, пропамокарб, пропанил, пираклостробин, *Reynoutria sachalinensis*, *Streptomyces* spp. (например, штамм K61 *S. griseoviridis*, *S. lydicus* WYEC 108), сера, мочевиная, тиабендазол, тиофанат-метил, тирам, триадимефон, триадименол и/или винклозолин;

- 20 регуляторами роста, такими как, например, анцимидол, хлормекват хлорид, диаминозид, паклобутразол и/или униконазол;

гербицидами, такими как, например, глифосат, оксифлуорфен и/или пендиметалин;

- 25 инсектицидами, такими как, например, ацефат, азадирактин, *B. thuringiensis* (например, subsp. *Israelensis*, штамм AM 65-52), *Beauveria bassiana* (например, штамм GHA), карбарил, хлорпирифос, циантранилипрол (cyantraniliprole), циромазин, дикофол, диазинон, динотефуран, имидаклоприд, *Isaria fumosorosea* (например, Арорка штамм 97), линдан и/или малатион;

средствами для обработки воды, такими как, например, пероксид водорода (30-35%), фосфоновая кислота (5-20%) и/или хлорит натрия;

- 30 а также гликолипидами, липопептидами, ДЭТА, диатомитовой землей, цитронеллой, эфирными маслами, минеральными маслами, экстрактом чеснока, экстрактом острого перца (чили) и/или любым известным пестицидом

коммерческого и/или собственного производства, совместимость которого была показана специалистом, ознакомленным с настоящей работой.

В некоторых примерах осуществления продукты на основе микроорганизмов могут быть применены для повышения эффективности действия других соединений, например, для улучшения проникновения лекарственного соединения в растение или во вредителя. 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: показателя роста, массы корней, высоты растения, диаметра ствола, роста побегов, количества побегов, плотности кроны, градуса по шкале Брикса, содержания хлорофилла, количества плодов, массы плода, массы корней, общей биомассы растения, 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.

Целевые растения

Употребляемый в настоящей работе термин “растение” включает, без
5 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,
10 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
15 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
20 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
25 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,
30 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, 5 горох или сою); масличные культуры (например, масличный рапс, горчицу, мак, 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 10 мандарины); овощи (например, шпинат, салат-латук, спаржу, капусту, морковь, лук, томаты, картофель или болгарский перец); лавровые (например, авокадо, сассафрас лекарственный или камфору); а также табак, орехи, травы, специи, медицинские растения, кофе, баклажаны, сахарный тростник, чай, перец, культурный виноград, хмель, семейство подорожниковых, каучуконосы, цветы на 15 срез и декоративные растения.

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 25 включают *Citrus maxima* (помело), *Citrus medica* (сладкий лимон), *Citrus micrantha* (папеда), *Citrus reticulata* (мандарин), *Citrus paradisi* (грейпфрут), *Citrus japonica* (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), 30 *Citrus inodora* (лайм Russel River), *Citrus warburgiana* (дикий лайм Новой Гвинеи), *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 настоящий), *Citrus x aurantium* (апельсин горький), *Citrus x latifolia* (персидский лайм), *Citrus x limon* (лимон), *Citrus x limonia* 35 (лимон кантонский красный), *Citrus x sinensis* (апельсин сладкий), *Citrus x tangerina*

(танжерин), лимон империял, танжело, оранжело, тангор, гибрид мандарина kinnow, гибрид kiyomi, танжело Minneola, оробланко, гибрид агли (ugli), рука Будды (цитрон пальчатый), цитрон, апельсин-бергамот, апельсин-королек, каламондин, клементин, лимон Мейера и юдзу.

- 5 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
- 10 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*
- 15 *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 excelsa*, *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.,
- 20 *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*,
- 25 *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*),
- 30 *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*
- 35 *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*,
 5 *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.,
 10 *Tagetes* spp., *Tamarindus indica*, *Theobroma cacao*, *Trifolium* spp., *Tripsacum dactyloides*, *Triticosecale rimpau*, *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*
 15 *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*),
 20 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*), макадамию (*Macadamia integrifolia*), миндаль (*Prunus amygdalus*), сахарную свеклу (*Beta vulgaris*), сахарный тростник (*Saccharum* spp.),
 30 овес, ячмень, овощные растения, декоративные растения и хвойные растения.

Целевые овощные растения включают томаты (*Lycopersicon esculentum*),
 35 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.),
 5 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 (*Pinus taeda*), сосна Эллиота (*Pinus elliotii*), сосна орегонская (*Pinus ponderosa*),
 10 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 balsamea*); и тую, такую как туя гигантская (*Thuja plicata*) и каллитропис нутканский
 15 (*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.

Целевые виды газонной травы включают, без ограничений: мятлик
 20 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*); овсяницу жестковатую (*Festuca longifolia*); мятлик луговой (*Poa pratensis*); ежу
 25 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*); тимopheевку (*Phleum pretense*); полевицу собачью (*Agrostis canine*); бескильницу расставленную (*Puccinellia distans*);
 30 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 (*Paspalum vaginatum*); бутелоуа изящную (*Bouteloua gracilis*); бизонову траву
 35 (*Buchloe dactyloids*); бутелоуа 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, 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, стручковую фасоль, чечевицу, турецкий горох и т.д.

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

15 Все растения и части растений могут быть обработаны в соответствии с изобретением. В этом контексте под растениями понимают все растения и популяции растений, такие как полезные и бесполезные 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 комбинациями таких способов, и включают трансгенные растения и сорта растений.

20 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, 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.

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

ОПИСАНИЕ ПРИМЕРОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

30 Для лучшего понимания настоящего изобретения и его многочисленных преимуществ ниже приведены примеры, предназначенные для иллюстрации

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.

5

Пример 1

Твердофазная ферментация микроорганизмов *Wickerhamomyces Anomalous*

Для получения биомассы *Wickerhamomyces* sp. применяли среду на основе риса. Приблизительно 200 граммов риса смешивали с 600 мл среды GUY (глюкоза, мочевины и экстракт дрожжей (от англ. Glucose-Urea-Yeast), pH 5,71) или с 250 мл концентрированной среды GY (глюкоза и экстракт дрожжей, pH 5,69) и водой. Среда распределяли по кюветам из нержавеющей стали в виде слоя толщиной приблизительно от 1 до 2 дюймов (что приблизительно составляет от 2,54 до 5,08 см) и стерилизовали.

После стерилизации кюветы инокулировали посевной культурой. Для улучшения роста микроорганизмов необязательно могут быть включены добавочные питательные вещества, включающие, например, соли и/или источники углерода, такие как патока, крахмалы, глюкоза и сахароза.

Затем посевную культуру *Wickerhamomyces* распыляли или наносили пипеткой на поверхность субстрата, и кюветы инкубировали при температуре от 28°C до 30°C в закрытом реакторе. Для стабилизации температуры через реактор прокачивали воздух из окружающей среды. В результате инкубации в течение 48-72 часов может быть получено 1×10^9 клеток/грамм или более микроорганизма *Wickerhamomyces*.

Пример 2

25

Получение продукта на основе микроорганизмов

Для хранения и транспортировки продукта, включающего продукт, содержащий по меньшей мере 1×10^8 КОЕ/мл *Wickerhamomyces anomalous*, смешанный с оставшейся средой для ферментации микроорганизма (например, 10,0% инокулята микроорганизма и 90% об. среды для ферментации), может быть применен герметизируемый пакет. К продукту могут быть добавлены другие компоненты, например, питательные микроэлементы, питательные макроэлементы, пребиотики и/или другие, аналогичным образом получаемые микроорганизмы.

Затем продукт разбавляют водой в смесительном резервуаре до концентрации, составляющей от 1×10^6 до 1×10^7 КОЕ/мл. Один пакет может быть применен для обработки приблизительно от 1 до 10 акров (что приблизительно составляет от 0,4 га до 4 га) сельскохозяйственной культуры или сада цитрусовых.

- 5 Для ускорения начального роста микроорганизмов в композиции, композиция может быть смешана с и/или нанесена одновременно с дополнительными “стартовыми” материалами. Они могут включать, например, пребиотики и/или наноудобрения (например, Aqua-Yield, NanoGro™).

Один из примеров состава стартовой композиции включает:

- 10 Растворимый поташ (K_2O) (от 1,0% до 2,5% или приблизительно 2,0%)
- Магний (Mg) (от 0,25% до 0,75% или приблизительно 0,5%)
- Серу (S) (от 2,5% до 3,0% или приблизительно 2,7%)
- Бор (B) (от 0,01% до 0,05% или приблизительно 0,02%)
- Железо (Fe) (от 0,25% до 0,75% или приблизительно 0,5%)
- 15 Марганец (Mn) (от 0,25% до 0,75% или приблизительно 0,5%)
- Цинк (Zn) (от 0,25% до 0,75% или приблизительно 0,5%)
- Гуминовую кислоту (от 8% до 12% или приблизительно 10%)
- Экстракт ламинарии (от 5% до 10% или приблизительно 6%)
- Воду (от 70% до 85% или приблизительно 77% до 80%).
- 20 Инокулят микроорганизма и/или необязательные способствующие росту “стартовые” материалы смешивают с водой в резервуаре оросительной системы и доставляют в почву.

Пример 3

Полевые исследования молодых цитрусовых деревьев во Флориде

- 25 Влияние композиции на рост молодых цитрусовых деревьев во Флориде оценивали после обработки деревьев композицией согласно примерам осуществления настоящего изобретения, включающей *W. anomalus* (“STR10”). Измеряли толщину (диаметр) ствола, высоту и показатель роста, которые

сравнивали с соответствующими показателями контрольных деревьев, выращенных в соответствии со стандартной практикой сельхозпроизводителей. Указанные факторы представляют собой важные для сельхозпроизводителей параметры, позволяющие оценивать жизненный тонус недавно посаженных неплодоносящих цитрусовых деревьев. Более интенсивный рост означает, что деревья имеют лучшее здоровье и начнут плодоносить раньше. Это может быть предпочтительнее, поскольку для достижения цитрусовыми деревьями зрелости может пройти пять лет или более.

Результаты исследования, представленные на Фиг. 1, показывают, что по истечении периода, составляющего 6 месяцев, у молодых деревьев, обработанных STR10, наблюдали увеличение средней высоты на 41%, увеличение средней толщины ствола на 126% и увеличение показателя роста на 65%. В контрольной группе наблюдали увеличение средней высоты на 28%, увеличение среднего диаметра ствола на 57% и увеличение среднего показателя роста на 37%.

Пример 4

Полевые исследования молодых цитрусовых деревьев во Флориде

Изменение роста молодых цитрусовых деревьев во Флориде оценивали после их обработки композицией согласно примерам осуществления настоящего изобретения, включающей *W. anomalus* ("STR10").

Высота

Композицию вносили в почву раз в два месяца, проводя в сумме семь обработок, включающих нанесение 1,5 л композиции на акр (что приблизительно составляет 3,7 л/га).

Высоту деревьев измеряли и сравнивали с высотой контрольных деревьев, выращенных в соответствии со стандартной практикой сельхозпроизводителей. Результаты исследования, представленные на Фиг. 2, показывают, что по истечении 18 месяцев у молодых деревьев, обработанных композицией согласно изобретению, наблюдали общее увеличение средней высоты, на 15% превышающее увеличение высоты контрольных деревьев (увеличение на 76% у обработанных деревьев по сравнению с увеличением на 61% у контрольных деревьев).

Показатель роста

Композицию вносили в почву раз в два месяца, проводя в сумме семь обработок, включающих нанесение 1,5 л композиции на акр (что приблизительно составляет 3,7 л/га).

- 5 Показатель роста (ПР) измеряли и сравнивали с показателем контрольных деревьев, выращенных в соответствии со стандартной практикой сельхозпроизводителей. Результаты исследования, представленные на Фиг. 3, показывают, что по истечении 18 месяцев у молодых деревьев, обработанных композицией согласно изобретению, наблюдали общее повышение ПР, на 26%
10 превышающее увеличение ПР контрольных деревьев (увеличение на 205% у обработанных деревьев по сравнению с увеличением на 179% у контрольных деревьев).

Толщина (диаметр) ствола

- 15 Композицию вносили в почву раз в два месяца, проводя в сумме семь обработок, включающих нанесение 1,5 л композиции на акр (что приблизительно составляет 3,7 л/га).

- 20 Диаметр ствола измеряли и сравнивали с диаметром контрольных деревьев, выращенных в соответствии со стандартной практикой сельхозпроизводителей. Результаты исследования, представленные на Фиг. 4, показывают, что в течение 18 месяцев у молодых деревьев, обработанных композицией согласно изобретению, наблюдали общее увеличение диаметра, которое на 25% превышало увеличение диаметра у контрольных деревьев (увеличение на 200% у обработанных деревьев по сравнению с увеличением на 175% у контрольных деревьев).

Рост побегов

- 25 Композицию вносили в почву раз в два месяца, проводя в сумме четыре обработки, включающие нанесение 1,5 л композиции на акр (что приблизительно составляет 3,7 л/га).

- 30 Определяли количество деревьев с ростом новых побегов, которое сравнивали с количеством аналогичных контрольных деревьев, выращенных в соответствии со стандартной практикой сельхозпроизводителей. Результаты исследования, представленные на Фиг. 5А, показывают, что у 100% обработанных

деревьев наблюдали рост новых побегов, в то время как среди контрольных деревьев только 20% имели новые побеги.

Также определяли среднее количество побегов у обработанных деревьев в сравнении со средним количеством побегов у необработанных контрольных деревьев. Результаты исследования, представленные на Фиг. 5В, показывают, что среднее число новых побегов на обработанных деревьях составило 39, а среднее число новых побегов на контрольных деревьях составило 2.

Количество плодов на одном дереве

Композицию вносили в почву раз в два месяца, проводя в сумме шесть обработок, включающих нанесение 1,5 л композиции на акр (что приблизительно составляет 3,7 л/га).

Определяли среднее количество плодов, которое сравнивали со средним количеством плодов контрольных деревьев, выращенных в соответствии со стандартной практикой сельхозпроизводителей. Результаты исследования, представленные на Фиг. 6, показывают, что у обработанных деревьев среднее количество плодов на одном дереве составило 82 штуки, в то время как у контрольных деревьев среднее количество плодов на одном дереве составило 34 штуки.

Пример 5

STR10 + Дополнительные микроорганизмы при обработке салата-латука

Опыт 1

Композицию, включающую *Wickerhamomyces anomalus* ("STR10"), вносили в почву, в которую был посажен салат-латук Buttercrunch, и среднюю массу кочана салата-латука сравнивали со средней массой кочана необработанного контрольного салата-латука. Композицию вносили раз в две недели, выполняя в сумме 3 нанесения, каждое в концентрации 34 жидк. унций/акр (что приблизительно составляет 1 литр/акр, т.е. 2,5 л/га).

Как показано на Фиг. 7А, средняя масса кочана (г) обработанного салата-латука на 105% превышала массу кочана контрольного салата-латука.

Опыт 2

Композиции согласно примерам осуществления настоящего изобретения раз в две недели вносили в почву, в которую был посажен салат-латук Buttercrunch, выполняя всего три обработки, и сравнивали результаты с параметрами необработанного контрольного салата-латука. В первых двух обработках композицию, включающую *Wickerhamomyces anomalus* ("STR10"), вносили в концентрации 34 жидк. унций/акр (что приблизительно составляет 1 литр/акр, т.е. 2,5 л/га). Для третьей обработки в концентрации 3 жидк. унций/акр (что приблизительно составляет 0,089 л/акр, т.е. 0,22 л/га) применяли композицию, включающую *Trichoderma harzianum* и *Bacillus amyloliquefaciens* ("ThBa").

Как показано на Фиг. 7В, средняя масса кочана обработанного салата-латука на 95% (г) превышала среднюю массу кочана контрольного салата-латука.

Пример 6

STR10 + стартовые материалы для обработки арахиса Georgia

Один раз, при высадке на поле растений арахиса вносили 5 жидк. унций/акр (что приблизительно составляет 0,15 л/акр, т.е. 0,37 л/га) композиции, включающей *Wickerhamomyces anomalus* ("STR10") наряду с 6,4 жидк. унций/акр (что приблизительно составляет 0,19 л/акр, т.е. 0,47 л/га) "стартовой" композиции, рассмотренной выше в Примере 2. Предпочтительно стартовая композиция включает по меньшей мере гуминовую кислоту и экстракт ламинарии. Сравнивали среднее количество цветков на 30 кв. футов (на приблизительно 2,8 м²) и средний размер кроны (дюймы) обработанных растений арахиса с теми же параметрами необработанных контрольных растений арахиса.

Как показано на Фиг. 8А, у обработанных растений арахиса наблюдали на 65% больше цветков, чем у контрольных растений. Дополнительно, как показано на Фиг. 8В, размер кроны обработанных растений арахиса на 20% превышал размер кроны контрольных растений.

Пример 7

Усвоение питательных веществ – цуккини

Обрабатываемые растения цуккини делили на три группы. Обработка первой группы включала первоначальное нанесение на растения 5 жидк. унций/акр (что

приблизительно составляет 0,15 л/акр, т.е. 0,37 л/га) *Wickerhamomyces anomalus* ("STR10") и последующую одну обработку спустя три недели. Обработка второй группы включала первоначальное нанесение на растения 5 жидк. унций/акр STR10 плюс 3 жидк. унций/акр (что приблизительно составляет 0,09 л/акр, т.е. 0,22 л/га) композиции, включающей *Trichoderma harzianum* и *Bacillus amyloliquefaciens* ("ThBa") и последующую одну обработку спустя три недели. Третья обрабатываемая группа была контрольной, содержащей необработанные растения цуккини.

Для определения общего повышения усвоения азота определяли содержание азота в листьях растений каждой из трех групп. Как показано на Фиг. 9А, содержание азота в группе STR10 на 0,19% превышало содержание азота в контрольной группе, и содержание азота в группе STR10/ThBa на 0,94% превышало содержание азота в контрольной группе.

Для определения общего повышения усвоения магния также определяли содержание магния в листьях растений каждой из трех групп. Как показано на Фиг. 9В, содержание магния в группе STR10 на 0,06% превышало содержание магния в контрольной группе, и содержание магния в группе STR10/ThBa на 0,03% превышало содержание магния в контрольной группе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для обработки почвы с целью улучшения иммунитета, роста и/или урожайности растения, отличающаяся тем, что композиция включает дрожжи *Wickerhamomyces anomalus* и/или побочный продукт, выделяемый ими при
5 росте.
2. Композиция по пункту 1, в которой побочный продукт, выделяемый при росте, представляет собой фермент или биологическое поверхностно-активное вещество.
3. Композиция по пункту 2, в которой фермент представляет собой
10 фитазу.
4. Композиция по пункту 2, в которой биологическое поверхностно-активное вещество представляет собой фосфолипид.
5. Композиция по пункту 1, дополнительно включающая один или более дополнительных микроорганизмов, выбранных из *Trichoderma harzianum*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Azotobacter vinelandii* и *Frateruria aurantia*.
15
6. Композиция по пункту 1, дополнительно включающая одно или более из следующих веществ: наноудобрение, экстракт ламинарии, фульвовую кислоту, фумаровую кислоту, хитин, производное хитина, гумат и гуминовую кислоту.
7. Композиция по пункту 1, полученная в виде сухого порошка или сухих
20 гранул, которые смешаны с водой для получения жидкой композиции.
8. Композиция по пункту 1, включающая от 8% об. до 12% об. клеток *Wickerhamomyces anomalus* и от 88% об. до 92% об. ферментативного субстрата, в котором выращивали *Wickerhamomyces anomalus*.
9. Композиция по пункту 1, включающая от 1×10^6 до 1×10^8 КОЕ/мл
25 *Wickerhamomyces anomalus*.
10. Способ улучшения иммунитета, здоровья, роста и/или урожайности растения, где способ включает:

нанесение дрожжей *Wickerhamomyces anomalus* и/или побочного продукта, выделяемого ими при росте, и необязательно

нанесение одного или более из следующих веществ: наноудобрения, экстракта ламинарии, фульвово́й кислоты, фумаровой кислоты, хитина, производного хитина, гумата и гуминовой кислоты

на растение и/или в окружающую его среду.

- 5 11. Способ по пункту 10, в котором дрожжи и/или побочные продукты, выделяемые ими при росте, культивируют способом твердофазной ферментации.
12. Способ по пункту 10, в котором дрожжи и/или побочные продукты, выделяемые ими при росте, культивируют способом глубинной ферментации.
- 10 13. Способ по пункту 10, в котором дрожжи и/или побочный продукт, выделяемый ими при росте, приводят в контакт непосредственно с корнями растения.
14. Способ по пункту 10, в котором дрожжи и/или побочный продукт, выделяемый ими при росте, приводят в контакт с почвой, в которой произрастает растение.
- 15 15. Способ по пункту 10, в котором дрожжи и/или побочный продукт, выделяемый ими при росте, перед нанесением смешивают с водой.
16. Способ по пункту 10, в котором дрожжи и/или побочный продукт, выделяемый ими при росте, наносят на растение и/или вносят в окружающую его среду с помощью оросительной системы.
- 20 17. Способ по пункту 10, дополнительно включающий внесение одного или более дополнительных микроорганизмов наряду с дрожжами и/или побочными продуктами, выделяемыми ими при росте.
18. Способ по пункту 17, в котором один или более дополнительных микроорганизмов выбраны из *Trichoderma harzianum*, *Bacillus amyloliquefaciens*,
25 *Azotobacter vinelandii* и *Frateuria aurantia*.
19. Способ по пункту 10, применяемый для улучшения здоровья и/или роста корней растения.
20. Способ по пункту 10, применяемый для улучшения иммунитета, жизнеспособности и производительности растения.

21. Способ по пункту 10, в котором растение, на которое наносят композицию для обработки почвы, не имеет повреждений или болезней.

22. Способ по пункту 10, в котором растение, на которое наносят композицию для обработки почвы, имеет пониженный иммунитет в результате поражения инфекцией, вызванной патогенным или биотическим агентом, или в результате действия абиотического стрессогенного фактора окружающей среды.

23. Способ по пункту 22, в котором растение представляет собой цитрусовое растение, пораженное болезнью пожелтения цитрусовых и/или раком цитрусовых.

24. Способ по пункту 10, применяемый для улучшения одного или более качеств почвы, в котором дрожжи и/или побочный продукт, выделяемый ими при росте, наносят на почву.

25. Способ по пункту 24, применяемый для улучшения поглощения воды и ее удержания в сухой почве.

26. Способ по пункту 24, применяемый для улучшения дренажа и/или диспергирования воды в водонасыщенной почве.

27. Способ по пункту 24, применяемый для улучшения удержания питательных веществ в истощенной почве.

28. Способ по пункту 10, применяемый для улучшения поглощения питательных веществ корнями растения.

29. Способ по пункту 10, в котором растение представляет собой сельскохозяйственную культуру, выбранную из цитрусовых, томатов, сахарной свеклы, соевых бобов, цуккини, арахиса, дерна, кукурузы, табака, картофеля, дыни, сахарного тростника, винограда, салата-латука, миндаля, лука, моркови, ягод и хлопка.

30. Способ по пункту 10, в котором растение представляет собой дерновое растение, дернообразующую траву, траву пастбищ или дерево.

31. Способ по пункту 10, в котором растение представляет собой декоративное растение, выбранное из цветущего растения и мелкого и крупного кустарника.

32. Способ по пункту 10, применяемый в лесоводстве и/или лесовосстановлении.

33. Способ по пункту 10, применяемый в профессиональном возделывании травяного покрова и/или в профессиональном ландшафтном дизайне.

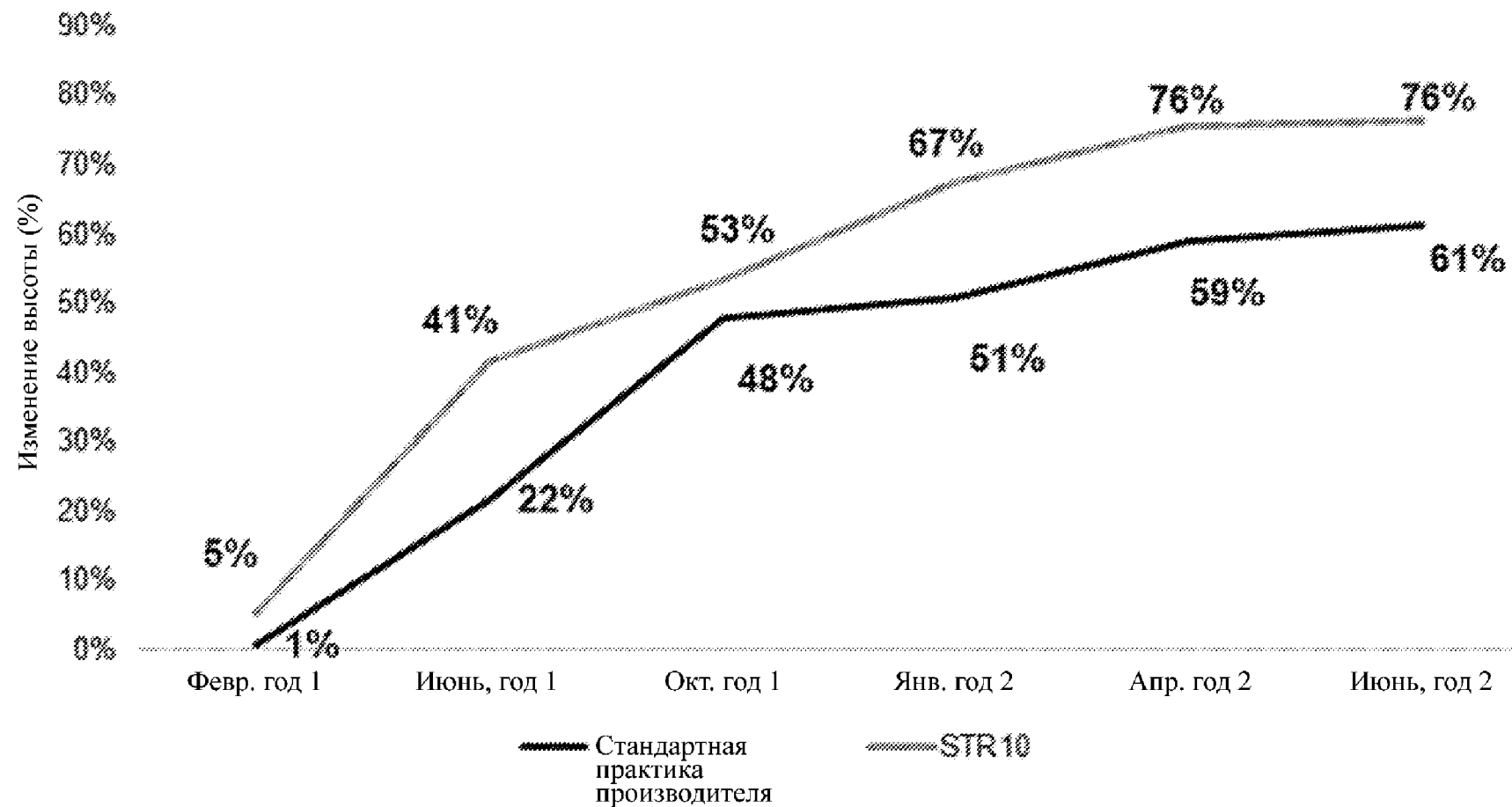
34. Способ по пункту 10, применяемый в возделывании пастбищ.

35. Способ по пункту 10, применяемый в уходе за домом и садом.



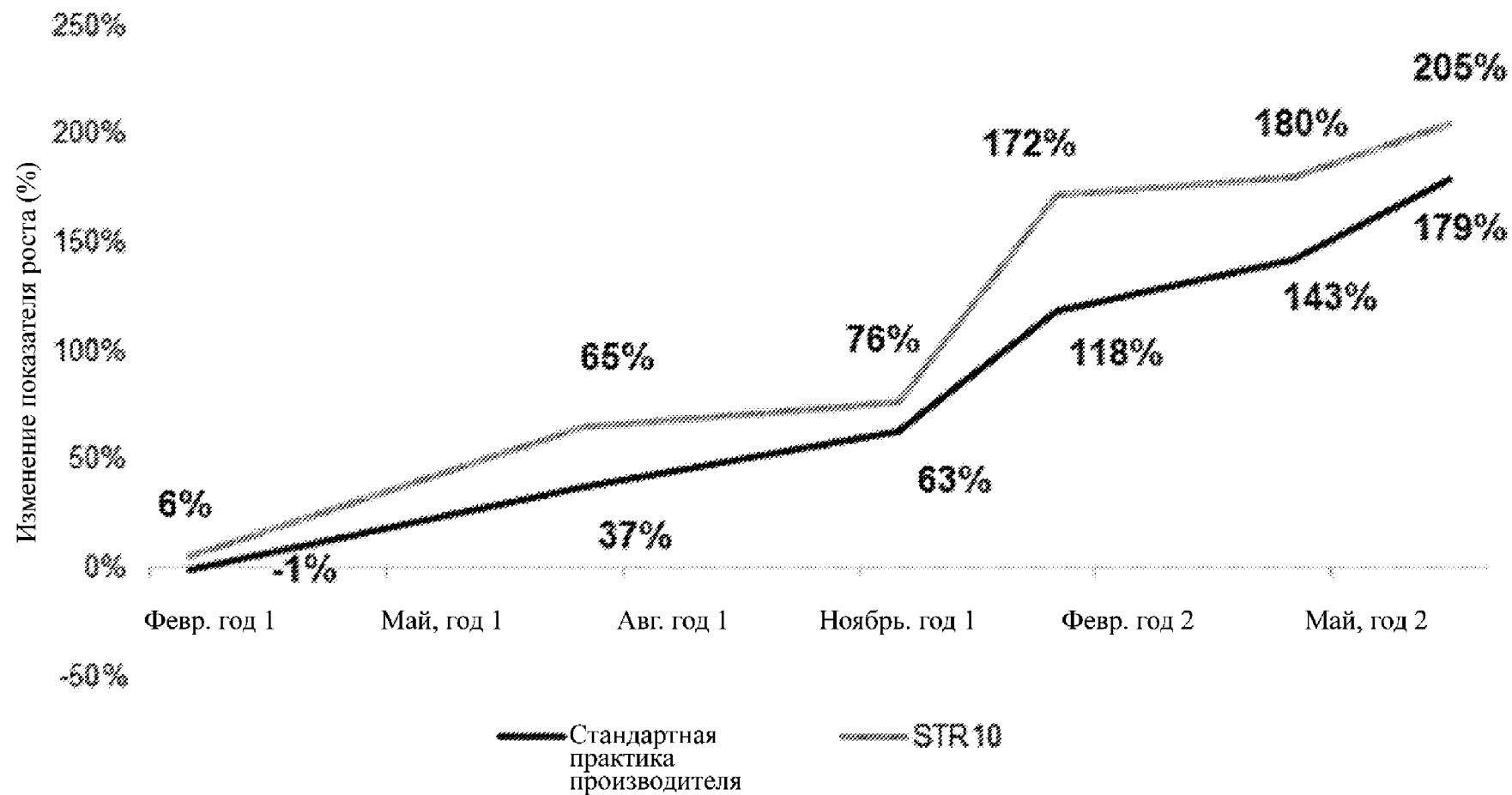
ФИГ. 1

Измерение высоты молодых цитрусовых деревьев
Hendry County, Флорида



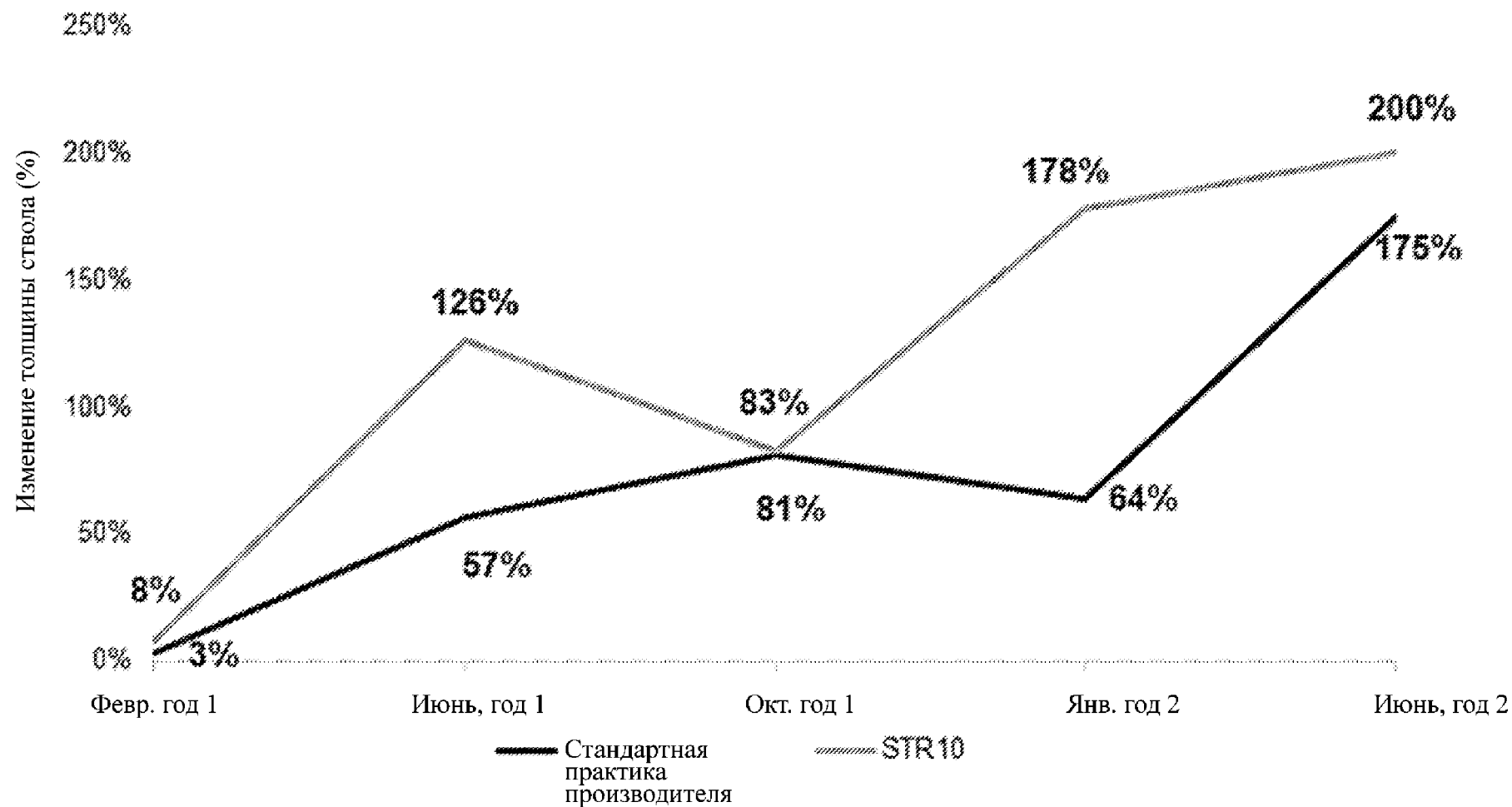
ФИГ. 2

Измерение показателя роста молодых цитрусовых деревьев
Hendry County, Флорида



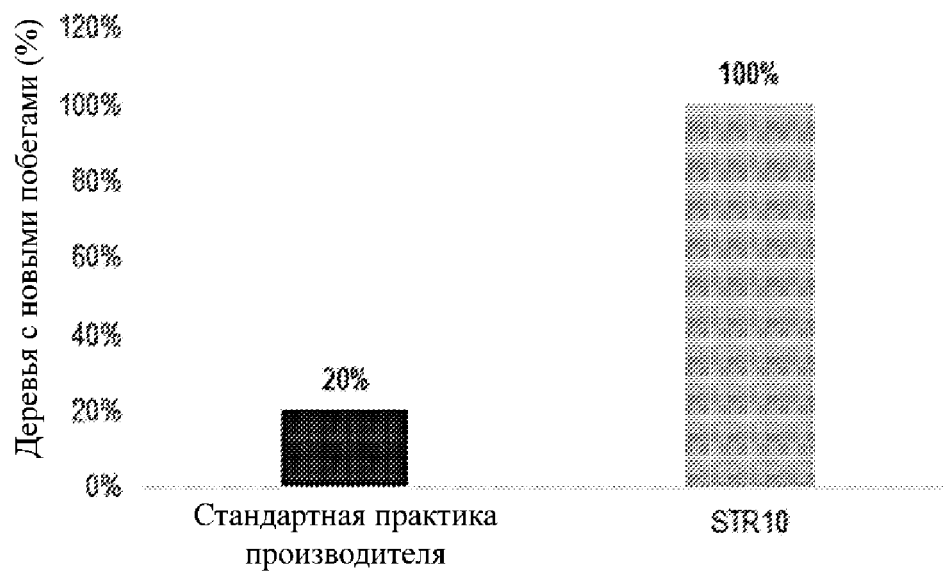
ФИГ. 3

Измерение толщины ствола молодых цитрусовых деревьев
Hendry County, Флорида



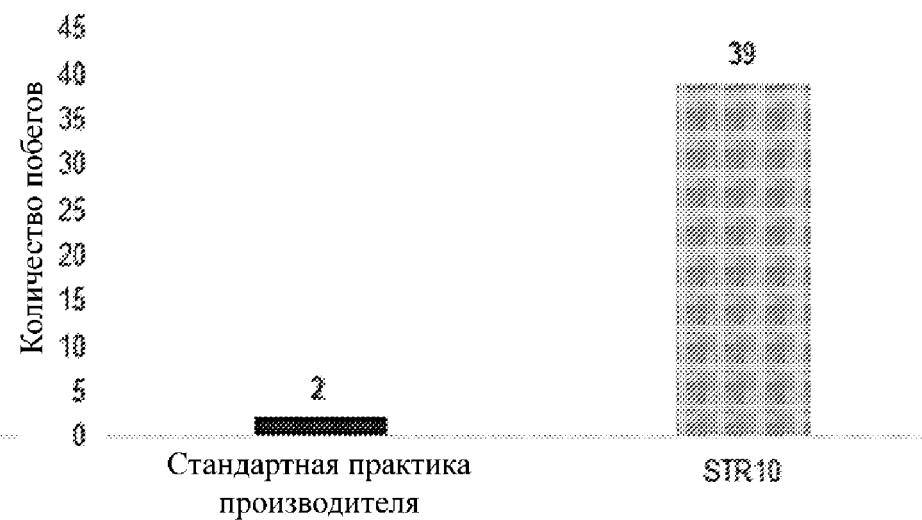
ФИГ. 4

Количество деревьев с новыми побегами
Highlands County, Флорида – Эксперимент
с молодыми апельсиновыми деревьями

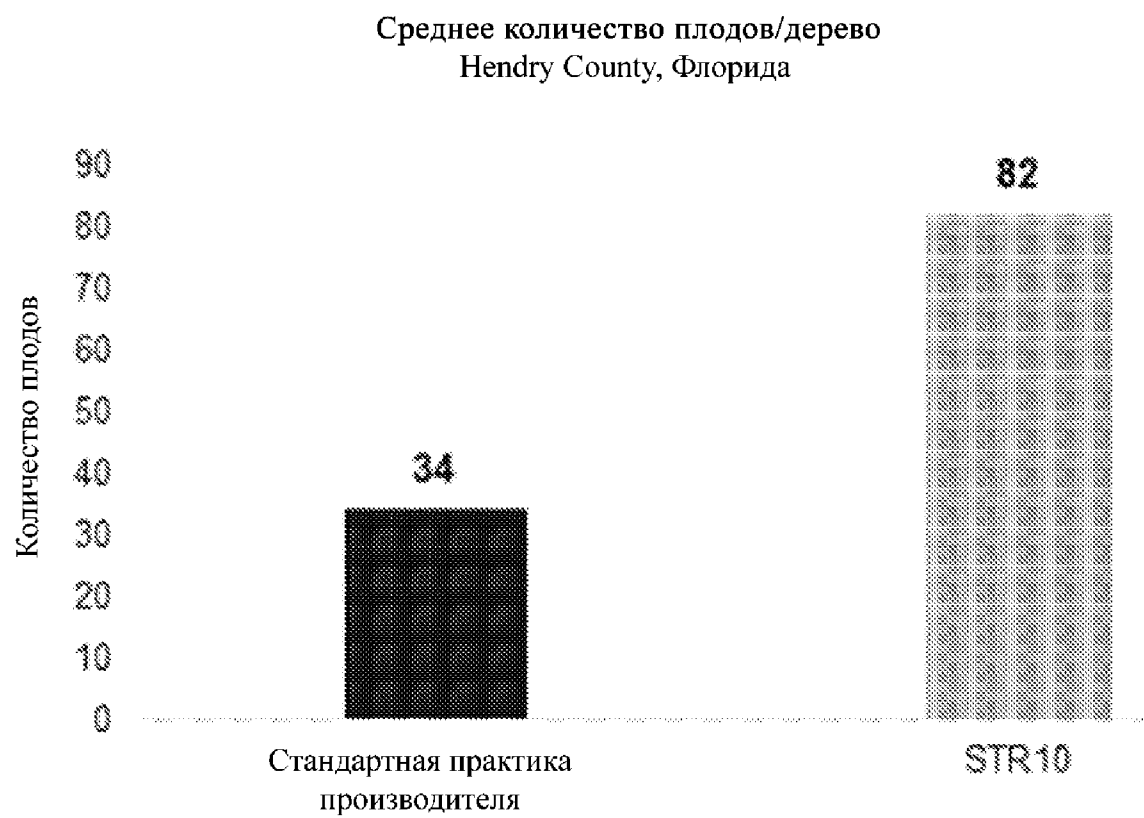


ФИГ. 5А

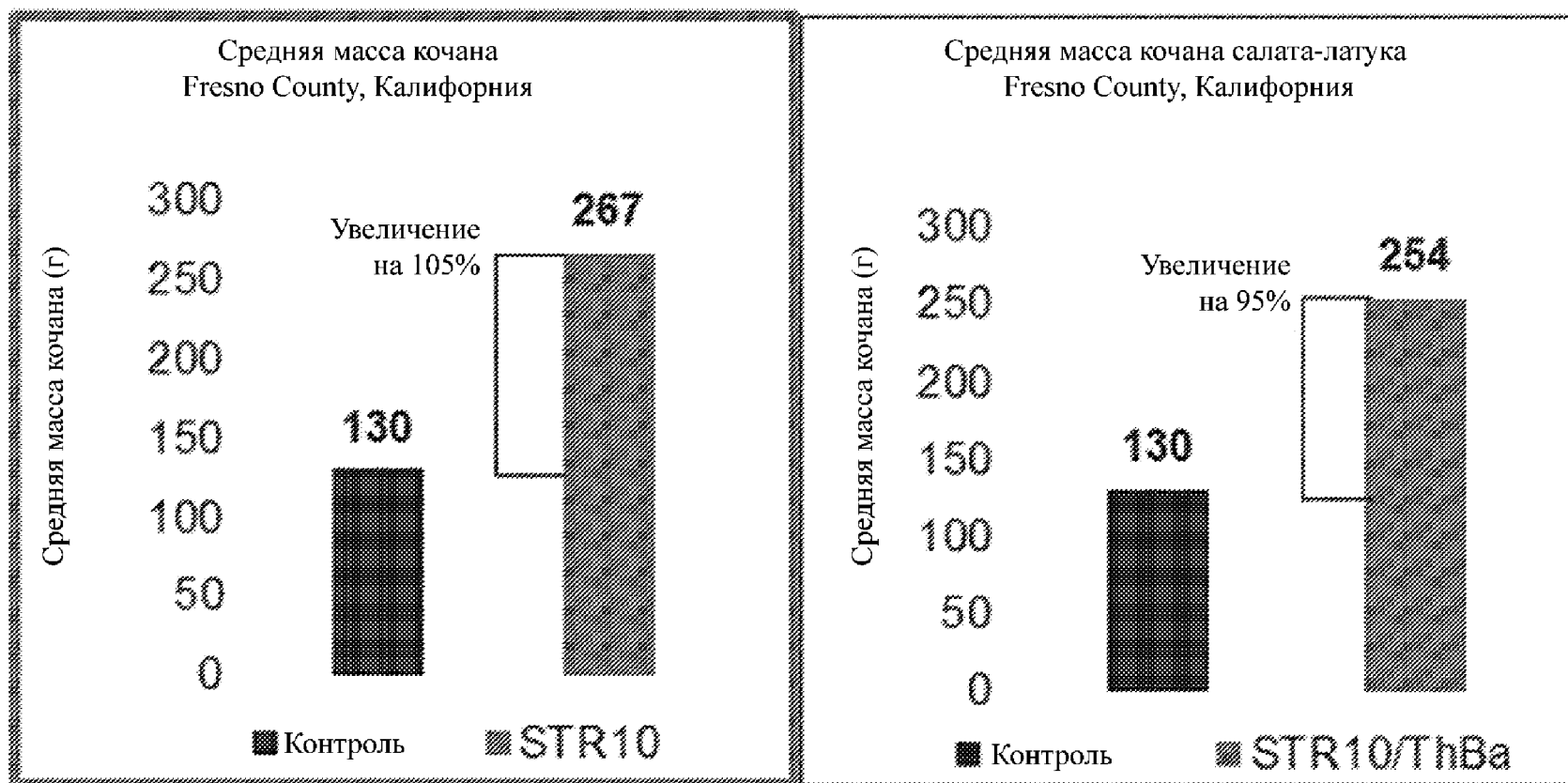
Среднее количество новых побегов
на молодых апельсиновых деревьях
Highlands County, Флорида – Эксперимент
с молодыми апельсиновыми деревьями



ФИГ. 5В

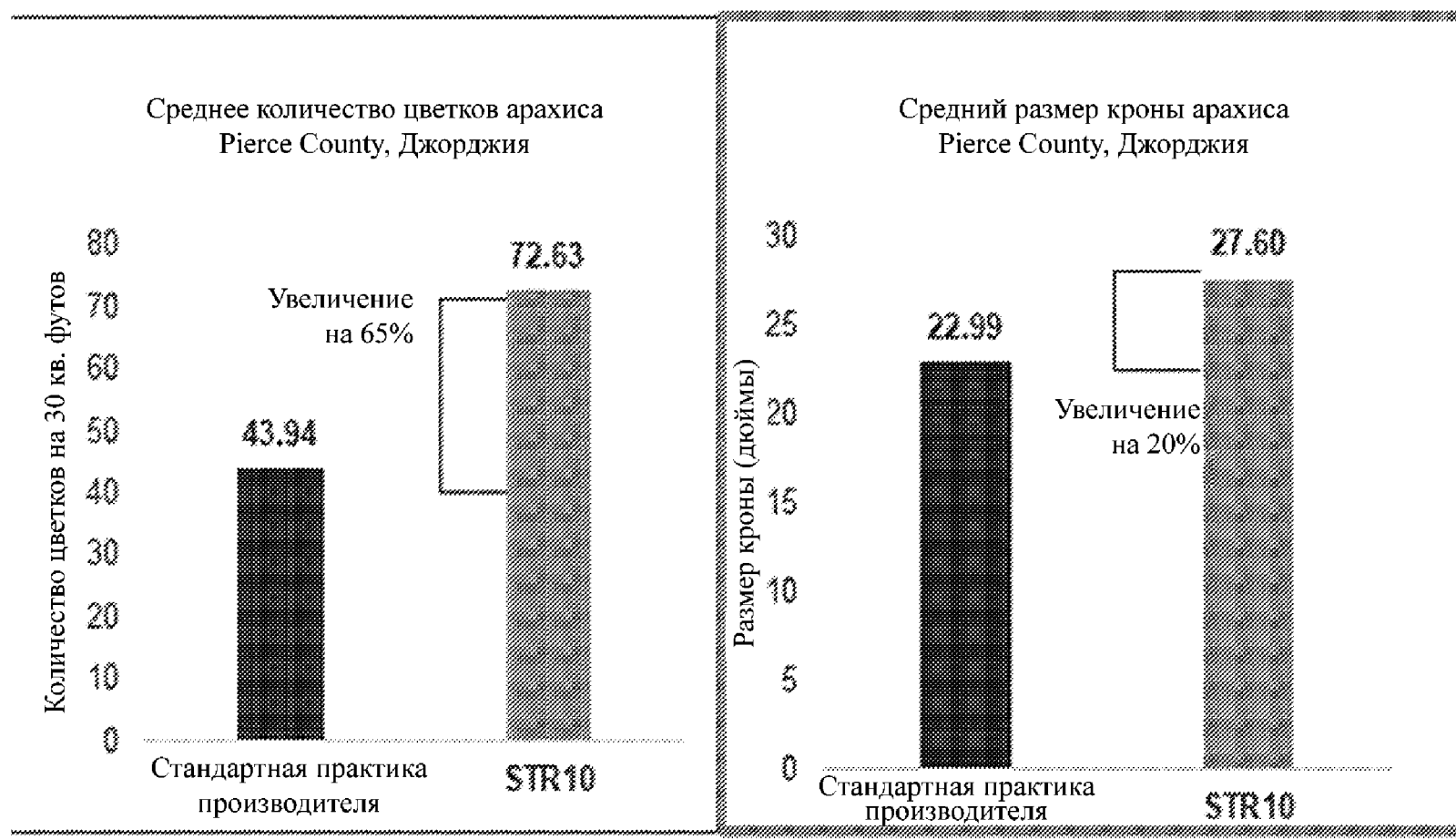


ФИГ. 6



ФИГ. 7А

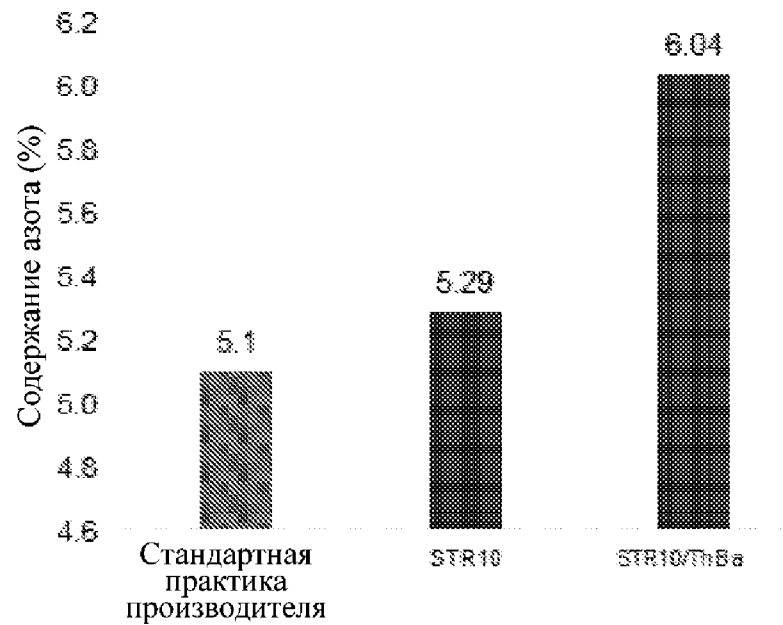
ФИГ. 7В



ФИГ. 8А

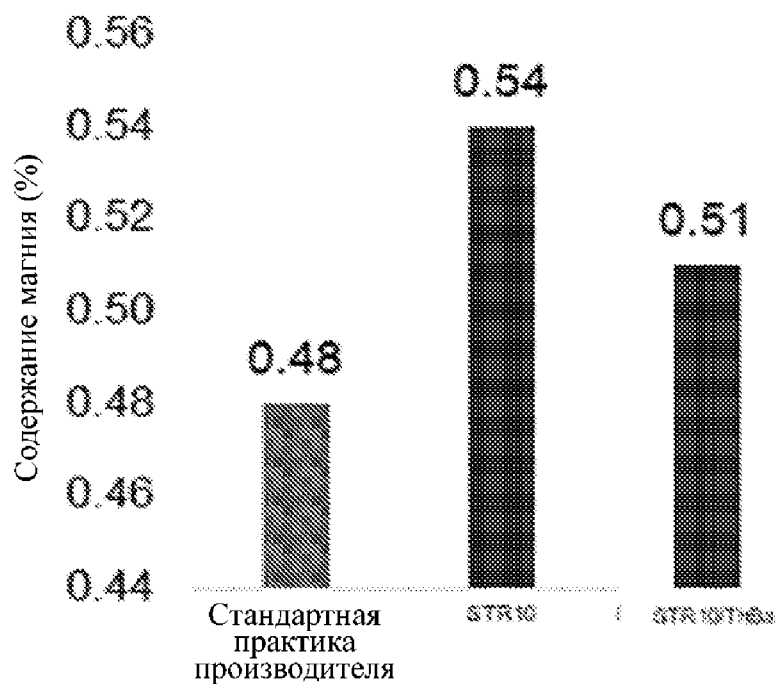
ФИГ. 8В

Содержание азота в листьях цуккини
Ткань – WAP:7
Lake County, Огайо



ФИГ. 9А

Содержание магния в листьях цуккини
Ткань – WAP:7
Lake County, Огайо



ФИГ. 9В