

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042273**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.01.30**

**(21)** Номер заявки  
**202090858**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.09.25**

**(51)** Int. Cl. **A01N 63/02** (2006.01)  
**A01N 25/30** (2006.01)  
**A01G 7/06** (2006.01)

---

**(54) БОРЬБА С ВИРУСАМИ МОЗАИКИ И БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ У РАСТЕНИЙ**

---

**(31)** **62/564,517**

**(32)** **2017.09.28**

**(33)** **US**

**(43)** **2020.07.09**

**(86)** **PCT/US2018/052519**

**(87)** **WO 2019/067380 2019.04.04**

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

**(72)** Изобретатель:  
**Фармер Шон, Алибек Кен,  
Молдакожаев Алибек (US)**

**(74)** Представитель:  
**Тагбергенова А.Т., Тагбергенова М.М.  
(KZ)**

**(56)** **US-A1-20130085067**

HUSSEIN, WALAA et al. "Systemic resistance induction of tomato plants against ToMV virus by surfactin produced from Bacillus subtilis BMG02", American Journal of Microbiological Research, 2016, vol. 4, no. 5, p. 153-158, See pages 153-154

LEE, GAHYUNG et al. "Foliar application of the leaf-colonizing yeast Pseudozyma churashimaensis elicits systemic defense of pepper against bacterial and viral pathogens", Scientific Reports, 10 January 2017, vol. 7, Article no. 39432, p. 1-13 (internal pages), See the entire document

KURTZMAN, CLETUS P. et al. "Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the Starmerella (Candida) bombicola yeast clade", FEMS Microbiology Letters, 2010, vol. 311, no. 2, p. 140-146, See the entire document  
**US-A1-20110274673**

---

**(57)** Обеспечивается способ борьбы с мозаичным вирусом растения с использованием композиции, содержащей микроорганизм *Starmerella bombicola* и побочный продукт его роста, с растением, пораженным мозаичным вирусом, при этом побочный продукт роста представляет собой поверхностно-активный софоролипид биологического происхождения. В определенных вариантах осуществления адгезивное вещество наносится на растение совместно с композицией.

---

**B1**

**042273**

**042273**

**B1**

### Перекрестная ссылка на родственную заявку

В заявке на данное изобретение испрашивается приоритет предварительной заявки US с регистрационным номером 62/564517, поданной 28 сентября 2017 г., которая полностью включена в настоящее описание путем ссылки.

### Описание уровня техники

Вирусы мозаики представляют собой группу патогенов растений, которые оказывают влияние и могут вызывать существенное поражение более чем 150 различных типов растений. Миллионы садовых культур частично поражаются или даже все сельскохозяйственные культуры разрушаются вирусами мозаики. Наиболее распространенные сельскохозяйственные культуры, которые могут инфицироваться вирусами мозаики, включают картофель, бахчевые культуры, бамию, чилийский перец, огурцы, дыню, тыкву, помидоры, табак, розы, тюльпаны, свеклу, сливы, бобовые и многие другие.

Существуют различные виды вирусов, которые подпадают под категорию "мозаичные" болезни, каждый из которых относится к одному из различных родов, например Begomovirus (например, вирус мозаики маниоки), Potyvirus (например, вирус "оспы" сливы), Tobamovirus (например, вирус табачной мозаики) и ко многим другим. Примеры видов мозаичных вирусов включают вирус мозаики люцерны, вирус мозаики свеклы, вирус мозаики маниоки, вирус мозаики коровьего гороха, вирус мозаики огурца, сателлитный вирус мозаики проса, вирус "оспы" сливы, вирус мозаики патиссон, вирус табачной мозаики, пестролепестность тюльпанов и вирус желтой мозаики кабачка. В то время как многие из этих вирусов являются оцРНК вирусами, некоторые из них являются оцДНК вирусами или неопределенными вирусами.

Несмотря на то, что многие из этих вирусов имеют название, "связанное" с конкретным растением, в действительности, один и тот же вирус может иметь большое количество хозяев. Например, несмотря на то, что вирус табачной мозаики (ВТМ) назван согласно первому растению, из которого он был открыт (табак), он инфицирует более 150 различных типов растений. Среди растений, поражаемых ВТМ, присутствуют овощи, сорняки и цветы. В особенности ежегодно поражаются этим вирусом помидоры, перец и многие декоративные растения.

Поражение мозаичным вирусом сначала проявляется в форме зеленых листьев, которые покрываются пятнами, скручиваются или деформируются. Обычно на этих листьях развиваются желтоватые пятна, дополнительно к их пятнистому внешнему виду, и растение может останавливаться в росте, в особенности если инфицирование произошло в начале сезона. В семействе тыквенных (тыква, бахчевые культуры, огурцы, патиссон), например, пораженные участки также могут быть покрыты наростами или, альтернативно, кожа плодов может быть выцветшая и сглаженная. В то время как мозаичный вирус может не уничтожить растение, его влияние на рост и общую жизнеспособность растения может оказывать существенное влияние на количество экономически ценных продуктов, обеспечиваемых сельскохозяйственной культурой. Например, плоды могут становиться слишком горькими для пригодности к употреблению в пищу, или может нарушаться цвет, качество или созревание плодов.

Мозаичный вирус перезимовывает на различных растениях, включая остатки растений, которые не были очищены из садов или сельскохозяйственных культур, а также на растениях кошачья мята, лаконос, пустыльник сердечный, молочай и дикий огурец. Тли и огуречные жуки распространяют заболевания, поскольку они питаются на и перелетают между инфицированными растениями и здоровыми растениями. Вирус также может распространяться с помощью активности людей, инвентаря и оборудования. Следовательно, мытье рук и дезинфекция садовых инструментов, колышков, лент, горшков, тепличных стеллажей, и т.д. с помощью отбеливающих средств является важным для сельхозпроизводителей для уменьшения риска загрязнения. Чем раньше в начале сезона распространяется заболевание, тем большее количество растений будет существенно поражено мозаичным вирусом. Кроме того, вирус распространяется в особенности легко во влажных условиях.

Кроме вирусных патогенов растений, также бактериальные патогены растений могут вызвать тяжелые и экономически повреждающие заболевания. Тем не менее в отличие от вирусов, которые инфицируют внутри клеток-хозяев, бактерии растут на поверхностях между клетками, а не проникая в них. Большинство фитопатогенных бактерий относятся к следующим родам: Erwinia, Pectobacterium, Pantoea, Agrobacterium, Pseudomonas, Ralstonia, Burkholderia, Acidovorax, Xanthomonas, Clavibacter, Streptomyces, Xylella, Spiroplasma, и Phytoplasma. Симптомы инфицирования некоторыми из этих вредителей могут включать пятна, мозаичные картины или пустулы на листьях и плодах, вонючую гниль корнеплодов, галлы, избыточный рост, увядание, пятна на листьях, крапинки и "ожоги", паршу, язву и даже гибель растения.

Некоторые фитопатогенные бактерии продуцируют токсины или инъекцируют специальные белки, которые приводят к гибели клетки-хозяина, или они продуцируют ферменты, которые разлагают ключевые структурные компоненты растительных клеток и их стенок. Эти вредители распространяются различными путями и могут переноситься на большие расстояния, например они могут разлетаться с брызгами дождя, или переноситься ветром, птицами или насекомыми и аналогично вирусам могут распространяться вследствие активности людей. Тем не менее, независимо от того, как они распространяются, для проникновения внутри растения бактериальным патогеном нужно отверстие, такое как рана или устье.

Не существует лечений вирусных болезней, таких как мозаичный вирус, после того, как растение

уже инфицировано. Часто такая ситуация имеет место и с бактериальными болезнями, и основное внимание должно уделяться не борьбе с заболеванием, а вместо этого предотвращению инфицирования или распространения. Например, уменьшение количества насекомых, переносимых болезнями, которые контактируют с растениями, или уменьшение количества многолетних сорняков или других растений, которые растут возле сельскохозяйственной культуры или участка, могут быть эффективными профилактическими мерами; тем не менее для этого часто необходимо использовать агрессивные химические пестициды или гербициды. Можно использовать антибиотики для борьбы с определенными бактериями, но это может приводить к появлению резистентных штаммов. Таким образом, наиболее эффективными способами являются применение сконструированных растений, которые резистентны к определенным штаммам вредителя. Однако при этом вследствие огромного количества различных вирусов и видов бактерий, которые могут инфицировать растение, является сложным защитить от различных патогенов с помощью этого способа.

Чрезмерный материальный ущерб может быть следствием широкого распространения инфекций растений и сельскохозяйственных культур от определенных болезней растений, которые могут распространяться в садах, возделываемых полях и теплицах. Это также может оказывать радикальный эффект на поставку продуктовых сельскохозяйственных культур, доступных потребителям. Таким образом, существует потребность в безопасных и экологически безвредных способах борьбы с патогенными вирусами растений, включая мозаичный вирус, а также фитопатогенными бактериями.

#### **Краткое изложение сущности изобретения**

Задачей настоящего изобретения является обеспечение микроорганизмов, а также побочных продуктов их роста, таких как поверхностно-активные вещества биологического происхождения, для применения для борьбы с определенными патогенными инфекциями растений. В особенности настоящее изобретение относится к борьбе с фитопатогенными вирусами, включая мозаичный вирус, а также с фитопатогенными бактериями, используя полезные микроорганизмы и/или их побочные продукты роста. Благоприятно, продукты на основе микроорганизмов и способы согласно настоящему изобретению являются экологически безвредными, нетоксичными и экономически выгодными.

В определенных вариантах осуществления, настоящее изобретение обеспечивает композиции на основе микроорганизмов, где композиции содержат один или несколько полезных микроорганизмов и/или один или несколько побочных продуктов роста микроорганизмов. Композиция также может содержать ферментационную среду, в которой продуцируют полезные микроорганизмы и/или побочные продукты роста. Побочные продукты роста микроорганизмов могут представлять собой те продукты, которые продуцируются микроорганизмами композиции, или они могут продуцироваться где-нибудь в другом месте и добавляться к композиции.

В одном варианте осуществления композиция содержит только микробный побочный продукт роста без полезного микроорганизма. Например, в одном варианте осуществления композиция содержит только ферментативный бульон, в котором культивируют полезный микроорганизм.

Микробные побочные продукты роста могут находиться в очищенной или неочищенной форме. В предпочтительных вариантах осуществления побочный продукт роста представляет собой поверхностно-активное вещество биологического происхождения, выбранный из гликолипидов (например, софоролипиды, рамнолипиды, трегалозолипиды или маннозилэритритоллипиды) и липопептидов (например, сурфактин, итурин, лихенисин и фенгицин). В одном типичном варианте осуществления побочный продукт роста представляет собой софоролипид (SLP).

В некоторых вариантах осуществления неочищенная форма поверхностно-активных веществ биологического происхождения может иметь форму жидкой смеси, содержащей осадок поверхностно-активного вещества биологического происхождения и ферментативный бульон, полученный в результате культивации микроорганизма, продуцирующего поверхностно-активное вещество биологического происхождения. Эта неочищенная форма поверхностно-активного вещества биологического происхождения и бульонный раствор могут содержать от приблизительно 0,001 до приблизительно 75%, от приблизительно 20 до приблизительно 70%, от приблизительно 35 до приблизительно 65%, от приблизительно 40 до приблизительно 60%, от приблизительно 45 до приблизительно 55% или приблизительно 50% чистого поверхностно-активного вещества биологического происхождения.

В определенных вариантах осуществления полезный микроорганизм в соответствии с настоящим изобретением представляет собой микроорганизм, продуцирующий поверхностно-активное вещество биологического происхождения. В специфических вариантах осуществления микроорганизм представляет собой дрожжи, продуцирующие поверхностно-активное вещество биологического происхождения, такие как, например, *Starmerella bombicola*. В другом варианте осуществления микроорганизм представляет собой дрожжи-киллеры, продуцирующие поверхностно-активное вещество биологического происхождения, например *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*). Эти дрожжи способны продуцировать поверхностно-активные гликолипиды биологического происхождения.

В одном варианте осуществления полезный микроорганизм представляет собой непатогенные бактерии, продуцирующие поверхностно-активное вещество биологического происхождения, такие как, например, *Bacillus subtilis* или *Bacillus amyloliquefaciens*. Оба этих вида являются эффективными проду-

центами поверхностно-активных липопептидов биологического происхождения.

Продукты на основе микроорганизмов можно использовать либо отдельно, либо в комбинации с другими компонентами, которые помогают усилить борьбу с мозаичным вирусом и бактериальными патогенами растений.

В определенных вариантах осуществления адгезивное вещество можно добавлять к обработке для пролонгирования адгезии продукта к листьям растений. Например, вещество на основе полисахарида, например ксантановую камедь, можно использовать в качестве адгезива для композиций в соответствии с настоящим изобретением.

В определенных вариантах осуществления композиции согласно настоящему изобретению имеют преимущества по сравнению, например, с очищенными микробными метаболитами. Эти преимущества могут включать одно или несколько из следующих преимуществ: высокие концентрации маннопротеина (эмульсификатор) в составе наружной поверхности клеточной стенки дрожжей; присутствие бета-глюкана (эмульсификатор) в клеточных стенках дрожжей; присутствие поверхностно-активных веществ биологического происхождения в культуре и присутствие растворителей и/или других метаболитов в культуре (например, молочная кислота, этанол и т.д.).

Настоящее изобретение также обеспечивает способ культивирования композиции на основе микроорганизмов. Композиции могут быть получены с помощью процессов культивирования от небольших масштабов до промышленных масштабов. Эти процессы культивирования включают, но не ограничиваясь только ими, глубинное культивирование/ферментацию, твердофазную ферментацию (SSF) и гибриды (например, глубинные матричные системы), модификации и/или их комбинации.

В настоящем изобретении можно использовать различные уникальные установки исходя, например, из способности эффективно доставлять и использовать свежий ферментативный бульон с активным метаболитом; смесь клеток, микробных черенков и/или клеточных компонентов с ферментативным бульоном; композицию с живыми клетками; композиции с клетками высокой плотности, включая живые клетки; продукты на основе микроорганизмов, не требующие времени на приготовление; и продукты на основе микроорганизмов в удаленных расположениях.

В некоторых вариантах осуществления обеспечиваются способы для борьбы с мозаичным вирусом и/или бактериальными патогенами растений, где способы включают контактирование полезного микроорганизма и/или побочного продукта роста микроорганизма с частью растения, которая инфицирована патогеном. В определенных вариантах осуществления способ включает применение композиции на основе микроорганизмов в соответствии с настоящим описанием на растении.

Композиция на основе микроорганизмов может контактировать непосредственно с растением и/или с окружающей средой растения. В определенных вариантах осуществления композиции контактируют с листьями или листовым покровом инфицированного растения. В других вариантах осуществления композиции контактируют с любой частью растения, которое поражено, например корнями, семенами, стеблями, цветами или плодами. Кроме того, композиции могут контактировать с целым растением и/или со средой, окружающей растение, такой как почва.

Микроорганизмы могут быть либо живыми (или жизнеспособными), либо инактивированными во время применения. При использовании живых микроорганизмов микроорганизмы могут расти *in situ* и продуцировать активные соединения на месте. Вследствие этого высокая концентрация микроорганизмов может быть достигнута легко и в течение длительного времени в участке обработки (например, саду). В этом отношении способы могут дополнительно включать добавление материалов для усиления роста микроорганизмов во время применения. В одном варианте осуществления добавляемые материалы представляют собой источники питательных веществ, такие как, например, источники азота, нитрата, фосфора, магния и/или углерода.

В некоторых вариантах осуществления способ включает контактирование пораженного растения с микроорганизмом и/или побочными продуктами роста в ферментационной среде, в которой они продуцируются. В некоторых вариантах осуществления способ включает простое нанесение ферментационной среды и/или побочный продукт роста микроорганизма на растение. Побочные продукты роста могут находиться в очищенной или неочищенной форме. В предпочтительных вариантах осуществления побочный продукт роста представляет собой поверхностно-активное вещество биологического происхождения, такое как гликолипид или липопептид. В одном типичном варианте осуществления поверхностно-активное вещество биологического происхождения представляет собой софоролипид.

Способ может дополнительно включать применение одного или нескольких веществ для усиления эффектов борьбы с патогеном, таких как, например, адгезивное вещество для пролонгирования адгезии продукта, на растении.

Благоприятно, настоящее изобретение можно использовать без высвобождения больших количеств неорганических соединений в окружающую среду. Дополнительно, в обеспечиваемых композициях и способах используют компоненты, которые являются биологически разлагаемыми и токсикологически безопасными. Следовательно, настоящее изобретение может использоваться для борьбы с вирусными и бактериальными патогенами растений в качестве "зеленой" обработки.

### Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает микроорганизмы, а также побочные продукты их роста, такие как поверхностно-активные вещества биологического происхождения, для применения для борьбы с определенными патогенными инфекциями растений. В особенности настоящее изобретение обеспечивает композиции и способы для борьбы с фитопатогенными вирусами, включая мозаичный вирус, а также фитопатогенные бактерии, используя полезные микроорганизмы и/или их побочные продукты роста. Благоприятно, продукты на основе микроорганизмов и способы согласно настоящему изобретению являются экологически безвредными, нетоксичными и экономически выгодными.

Выбранные определения.

Как используется в настоящем документе, ссылка на "композицию на основе микроорганизмов" обозначает композицию, которая содержит компоненты, продуцируемые в результате роста микроорганизмов или других клеточных культур. Таким образом, композиция на основе микроорганизмов может содержать сами микроорганизмы и/или побочные продукты роста микроорганизмов. Микроорганизмы могут находиться в вегетативном состоянии, в форме спор, в мицелиальной форме, в любой другой форме стадии, служащей для размножения, или их смесях. Микроорганизмы могут быть планктонными, или в форме биопленки, или смеси обоих. Побочные продукты роста могут представлять собой, например, метаболит (например, поверхностно-активные вещества биологического происхождения), компоненты клеточной мембраны, экспрессируемые белки, и/или другие клеточные компоненты. Микроорганизмы могут быть интактными или лизированными. Клетки могут полностью отсутствовать или присутствовать, например, в концентрации  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$  или больше клеток или частей на 1 мл композиции.

Как используется в настоящем документе, стадия, служащая для размножения, представляет собой любую часть микроорганизма, из которой новый и/или зрелый организм может развиваться, включая, но не ограничиваясь только ими, клетки, конидии, цисты, споры (например, репродуктивные споры, эндоспоры и экзоспоры), мицелий, почки и семена.

Настоящее изобретение также обеспечивает "продукты на основе микроорганизмов", которые представляют собой продукты, применяемые на практике для достижения заявленного результата. Продукт на основе микроорганизмов может представлять собой только композицию на основе микроорганизмов, собранную из процесса культивирования микроорганизмов. Альтернативно, продукт на основе микроорганизмов может содержать дополнительные компоненты, которые могут быть добавлены. Эти дополнительные компоненты могут включать, например, стабилизаторы, буферы, носители (например, вода или солевые растворы), добавленные питательные вещества для поддержания роста микроорганизмов, непитательные усилители роста и/или агенты, которые облегчают отслеживание микроорганизмов и/или композиции в окружающей среде, в которой их применяют. Продукт на основе микроорганизмов также может содержать смеси композиций на основе микроорганизмов. Продукт на основе микроорганизмов также может содержать один или несколько компонентов композиции на основе микроорганизмов, которые были обработаны другим путем, таким как, но не ограничиваясь только ими, фильтрование, центрифугирование, лизирование, высушивание, очистку и другие.

Как используется в настоящем документе, "собранная" относится к удалению некоторой или всей композиции на основе микроорганизмов из ростового сосуда.

Как используется в настоящем документе, "биопленка" представляет собой комплексный агрегат микроорганизмов, таких как бактерии, где клетки адгезированы друг к другу. Клетки в биопленках физиологически отличаются от планктонных клеток того же самого организма, которые представляют собой единичные клетки, которые могут плавать или распространяться в жидкой среде.

Как используется в настоящем документе, "выделенная(ый)" или "очищенная(ый)" молекула нуклеиновой кислоты, полинуклеотид, полипептид, белок, органическое соединение, такое как небольшая молекула (например, те, которые описаны ниже), или другое соединение по существу не содержит других соединений, таких как клеточный материал, с которым она связана в природе. Например, очищенный или выделенный полинуклеотид (рибонуклеиновая кислота (РНК) или дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)) не содержит генов или последовательностей, которые ее фланкируют во встречающемся в природе состоянии. Очищенный или выделенный полипептид не содержит аминокислот или последовательностей, которые его фланкируют во встречающемся в природе состоянии. Очищенный или выделенный штамм микроорганизмов удален из окружающей среды, в которой он существует в природе. Таким образом, выделенный штамм может существовать в виде, например, биологически чистой культуры или в виде спор (или других форм штамма) в ассоциации с носителем.

Как используется в настоящем изобретении, "биологически чистая культура" представляет собой культуру, которая была выделена из материалов, с которыми она связана в природе. В предпочтительном варианте осуществления культура отделена от всех других живых клеток. В дальнейших предпочтительных вариантах осуществления биологически чистая культура имеет лучшие характеристики по сравнению с культурой того же самого микроорганизма, которая существует в природе. Лучшими характеристиками может быть, например, увеличенная продукция одного или нескольких побочных продуктов их роста.

В определенных вариантах осуществления очищенные соединения составляют по меньшей мере 60% по весу (вес сухого вещества) представляющего интерес соединения. Предпочтительно препарат составляет по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99% по весу представляющего интерес соединения. Например, очищенное соединение представляет собой соединение, которое составляет по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 98, 99 или 100% (мас./мас.) желательного соединения по весу. Чистоту измеряют с помощью подходящего стандартного способа, например путем колоночной хроматографии, тонкослойной хроматографии или высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

"Метаболит" относится к любому веществу, продуцируемому с помощью метаболизма (например, побочный продукт роста), или веществу, которое должно принимать участие в конкретном метаболическом процессе. Метаболит может представлять собой органическое соединение, которое представляет собой исходное вещество (например, глюкоза), промежуточное вещество (например, ацетил-СоА) или конечный продукт (например, н-бутанол) обмена веществ. Примеры метаболита могут включать, но не ограничиваясь только ими, ферменты, токсины, кислоты, растворители, спирты, белки, углеводы, витамины, минералы, микроэлементы, аминокислоты, полимеры и поверхностно-активные вещества.

Диапазоны, представленные в настоящем документе, понимаются как подразумевающие все значения в пределах диапазона. Например, диапазон от 1 до 20 понимается как охватывающий любое число, комбинацию чисел или поддиапазон из группы, включающей 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, а также промежуточные десятичные значения 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. По отношению к поддиапазонам, специфически охватываются "вложенные поддиапазоны", которые распространяются от любой конечной точки диапазона. Например, вложенный поддиапазон типичного диапазона 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.

Как используется в настоящем документе, "уменьшение" относится к отрицательному изменению по меньшей мере на 1, 5, 10, 25, 50, 75 или 100%.

Как используется в настоящем документе, "сравнение" относится к стандартному или контрольному состоянию.

Как используется в настоящем документе, "поверхностно-активное вещество" относится к соединению, которое снижает поверхностное натяжение (или напряжение на границе раздела фаз) между двумя жидкостями или между жидкостью и твердым веществом. Поверхностно-активные вещества могут действовать, например, в качестве детергентов, смачивающих агентов, эмульсификаторов, пенообразующих агентов и диспергирующих агентов. "Поверхностно-активное вещество биологического происхождения" представляет собой поверхностно-активное вещество, продуцируемое живым организмом.

Как используется в настоящем документе, "сельское хозяйство" обозначает культивирование и разведение растений и/или грибов для пищи, клетчатки, биотоплива, лекарственных средств, косметических средств, дополнительных веществ, декоративных целей и других применений. В соответствии с настоящим изобретением сельское хозяйство также может включать растениеводство, ландшафтный дизайн, садоводство, охрану растений, плодоводство и древодводство. Также в сельское хозяйство включают уход, мониторинг и поддержание почвы.

Как используется в настоящем документе, "патогенный" организм представляет собой любой организм, который способен вызвать заболевание в другом организме. Обычно патогенные организмы представляют собой инфекционные агенты и могут включать, например, бактерии, вирусы, грибы, плесневые грибы, простейшие, прионы, паразиты, гельминты и водоросли.

Как используется в настоящем документе, "вредитель" представляет собой любой организм, отличающийся от человека, который является деструктивным, вредным и/или пагубным для людей или деятельности людей (например, сельское хозяйство, растениеводство, производство животноводческой продукции, аквакультура). В некоторых, но не во всех случаях вредитель может представлять собой патогенный организм. Вредители могут вызывать или являться вектором для инфекций, заражений и/или заболеваний или они могут просто питаться или вызывать другое физическое поражение живой ткани. Вредители могут являться одно- или многоклеточными организмами, включая, но не ограничиваясь только ими, вирусы, грибы, бактерии, паразиты и/или нематоды.

Как используется в настоящем документе, "лечение" обозначает устранение, улучшение, уменьшение, ослабление или обратное развитие признака или симптома заболевания, состояния или нарушения. Лечение может включать, но необязательно, полное излечение заболевания, состояния или нарушения, также значение лечения может включать частичное устранение, улучшение, уменьшение, ослабление или обратное развитие. Кроме того, лечение может включать задержку начала признаков или симптомов заболевания, состояния или нарушения или задержку прогрессирования заболевания, состояния или нарушения до более тяжелого заболевания, состояния или нарушения.

Как используется в настоящем документе, термин "борьба", используемый по отношению к патогену или вредителю, обозначает уничтожение, дезактивирование, иммобилизацию или уменьшение популяции патогенов и/или вредителей или придание другим образом патогену и/или вредителю по существу

неспособности вызывать заболевание или другой вред.

Переходный термин "содержащий", который является синонимом "включающий" или "имеющий в своем составе", является инклюзивным или не ограниченным и не исключает дополнительные, неуказанные элементы или стадии способа. В отличие от этого переходная фраза "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или компонент, не указанный в пункте. Переходная фраза "по существу состоящий из" ограничивает объем пункта указанными материалами или стадиями "и теми, которые не оказывают существенного влияния на основную(ые) и новую(ые) характеристику(и)" заявляемого изобретения.

Если специфически не указано иначе или не очевидно из контекста, как используется в настоящем документе, то термин "или" понимается как инклюзивный. Если специфически не указано иначе или не очевидно из контекста, как используется в настоящем документе, то термины, указанные в единственном числе, подразумеваются как охватывающие термины во множественном числе.

Если специфически не указано иначе или не очевидно из контекста, как используется в настоящем документе, то термин "приблизительно" понимается в пределах диапазона нормальной переносимости в данной области техники, например в пределах двух стандартных отклонений среднего значения. Приблизительно может пониматься как находящийся в пределах 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05 или 0,01% указанного значения.

Раскрытие перечня химических групп в любом определении переменной в настоящем документе включает определения этой переменной в качестве единичной группы или комбинации перечисленных групп. Раскрытие варианта осуществления для переменной или аспекта в настоящем документе включает этот вариант осуществления в качестве любого единичного варианта или в комбинации с любыми другими вариантами или их частями.

Все ссылки, процитированные в настоящем документе, таким образом, полностью включены в качестве ссылок.

Композиции на основе микроорганизмов.

Настоящее изобретение обеспечивает композиции на основе микроорганизмов, где композиции содержат один или несколько полезных микроорганизмов и/или один или несколько побочных продуктов роста микроорганизмов. Композиция может содержать ферментационную среду, в которой продуцируют микроорганизмы и/или побочные продукты роста. Побочные продукты роста микроорганизмов могут представлять собой те продукты, которые продуцируются микроорганизмами композиции или они могут продуцироваться где-нибудь в другом месте и добавляться к композиции.

Благоприятно, композиции на основе микроорганизмов в соответствии с настоящим изобретением являются нетоксичными (т.е. токсичность при заглатывании составляет более чем 5 г/кг) и могут применяться в высоких концентрациях, не вызывая раздражения, например, на кожу или в пищеварительном тракте. Таким образом, настоящее изобретение особенно пригодно, если применение композиций на основе микроорганизмов происходит в присутствии живых организмов, таких как фермеры и садоводы.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении используется микроорганизм, продуцирующий поверхностно-активное вещество биологического происхождения. Полезные микроорганизмы могут быть в активной или инактивированной форме или композиция может содержать комбинацию активных и инактивированных микроорганизмов.

В специфических вариантах осуществления микроорганизм представляет собой дрожжи, продуцирующие поверхностно-активное вещество биологического происхождения, такие как, например, *Starmerella bombicola*. В другом варианте осуществления микроорганизм представляет собой дрожжи-киллеры, продуцирующие поверхностно-активное вещество биологического происхождения, например *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*). Эти дрожжи являются эффективными продуцентами поверхностно-активных гликолипидов биологического происхождения.

В одном варианте осуществления, полезный микроорганизм представляет собой бактерии, продуцирующие поверхностно-активное вещество биологического происхождения, такие как *Bacillus subtilis* или *Bacillus amyloliquefaciens*. Эти виды являются эффективными продуцентами определенных поверхностно-активных липопептидов биологического происхождения.

В определенных вариантах осуществления композиция может содержать ферментативный бульон, содержащий живую и/или инактивированную культуру, и/или микробный метаболит, продуцируемый микроорганизмом, и/или любые остаточные питательные вещества. Продукт ферментации можно использовать непосредственно без экстракции или очистки. При необходимости, экстракцию и очистку можно легко осуществить, используя стандартные способы или технологии экстракции и/или очистки, описанные в литературе.

Кроме того, композиция может составлять, например, по меньшей мере по весу, 1, 5, 10, 25, 50, 75 или 100% бульона. Содержание биомассы ферментативного бульона может составлять, например от 5 до 180 г/л или больше или в любом аспекте от 0 до 100%, включая все значения в процентах между ними. В одном варианте осуществления содержание твердых веществ в бульоне составляет от 10 до 150 г/л.

В одном варианте осуществления композиция содержит только микробный побочный продукт роста. Он может находиться в очищенной или неочищенной (например, необработанной) форме.

В некоторых вариантах осуществления побочный продукт роста композиции в соответствии с изо-

бретением представляет собой поверхностно-активное вещество биологического происхождения. Поверхностно-активные вещества биологического происхождения могут представлять собой, например, поверхностно-активные гликолипиды биологического происхождения, включая софоролипиды (SLP), маннозилэритритол липиды (MEL), рамнолипиды (RLP) и/или трегалозолипиды (TL). Поверхностно-активные вещества биологического происхождения также могут представлять собой липопептиды, такие как, например, сурфактин, итурин, фенгидин и/или лихенисин.

В определенных вариантах осуществления гликолипид представляет собой SLP, MEL или их комбинацию. MEL в больших количествах продуцируется, например, *Pseudozyma aphidis*. SLP продуцируются, например, дрожжами *Starmerella* и дрожжами *Pichia*.

В определенных вариантах осуществления поверхностно-активные вещества биологического происхождения представляют собой SLP. Существует по меньшей мере восемь структурно различных софоролипидов. Химический состав SLP образован софорозой и жирной кислотой или сложноэфирной группой. Макролактон и свободнокислотные структуры ацелированы в различных степенях в первичном гидроксильном положении кольца софорозы. Основной компонент софоролипида представляет собой 17-гидроксооктадекановую кислоту и ее соответствующий лактон. Дополнительно, ненасыщенные C-18 жирные кислоты олеиновой кислоты могут переноситься неизменными на софоролипиды.

В некоторых вариантах осуществления природная смесь софоролипидов может синтезироваться путем ферментации *S. bombicola*.

В некоторых вариантах осуществления неочищенная форма поверхностно-активных веществ биологического происхождения может иметь форму жидкой смеси, содержащей осажденное поверхностно-активное вещество биологического происхождения в ферментативном бульоне, полученном в результате культивации микроорганизма, продуцирующего поверхностно-активное вещество биологического происхождения. Этот раствор неочищенной формы поверхностно-активного вещества биологического происхождения может содержать от приблизительно 0,001 до приблизительно 75%, от приблизительно 30 до приблизительно 70%, от приблизительно 35 до приблизительно 65%, от приблизительно 40 до приблизительно 60%, от приблизительно 45 до приблизительно 55% или приблизительно 50% чистого поверхностно-активного вещества биологического происхождения.

В определенных вариантах осуществления концентрация поверхностно-активного вещества биологического происхождения, например SLP, в заявляемой композиции находится в диапазоне от 0,001 до 5,0%, предпочтительно от 0,1 до 0,5% или 0,2%.

Полезные микроорганизмы и композиции на основе микроорганизмов согласно настоящему изобретению имеют различные свойства, которые являются полезными для лечения вирусных и бактериальных фитопатогенных болезней, включая мозаичный вирус. Например, поверхностно-активные вещества биологического происхождения в соответствии с настоящим изобретением могут ингибировать адгезию микроорганизмов к различным поверхностям, предотвращая образование биопленок, и могут иметь эффективные эмульгирующие и деэмульгирующие свойства.

В определенных вариантах осуществления композиции согласно настоящему изобретению имеют преимущества по сравнению, например, с очищенными микробными метаболитами, благодаря одному или нескольким из следующих свойств: высокие концентрации маннопротеина (эмульсификатор) в составе наружной поверхности клеточной стенки дрожжей; присутствие бета-глюкана (также эмульсификатор) в клеточных стенках дрожжей и присутствие поверхностно-активных веществ биологического происхождения, растворитель и/или другие метаболиты в культуре (например, молочная кислота, этанол, и т.д.).

К композиции на основе микроорганизмов могут быть добавлены другие компоненты на усиления ее антипатогенной активности. Предпочтительно эти добавки являются органически или экологически безвредными. Например, в композицию могут быть включены адгезионные вещества, человеческие/животные противовирусные соединения, антибактериальные соединения, эфирные масла, терпены, эмульсификаторы, хелатирующие агенты или любое другое антипатогенное вещество.

Добавки также могут включать буферные агенты, носители, другие композиции на основе микроорганизмов, продуцируемые на том же или другом оборудовании, модификаторы вязкости, консерванты, питательные вещества для роста микроорганизмов, отслеживающие агенты, биоциды, другие микроорганизмы, поверхностно-активные вещества, эмульгирующие агенты, смазывающие вещества, агенты, контролирующие растворимость, средства для регулирования уровня pH, консерванты, стабилизаторы и агенты резистентности к ультрафиолетовому свету.

В одном варианте осуществления композиция может дополнительно включать буферные агенты, включая органические кислоты и аминокислоты или их соли, для стабилизации значения pH на уровне предпочтительного значения. Подходящие буферы включают, но не ограничиваясь только ими, цитрат, глюконат, тартрат, малат, ацетат, лактат, оксалат, аспартат, малонат, глюкогоптонат, пируват, галактарат, глюкарат, тартронат, глутамат, глицин, лизин, глутамин, метионин, цистеин, аргинин и их смеси. Также можно использовать фосфорные и фосфористые кислоты или их соли. Подходяще использовать синтетические буферы, но предпочтительным является применение природных буферов, таких как органические кислоты и аминокислоты или их соли.

В дальнейшем варианте осуществления средства для регулирования уровня рН включают гидроксид калия, гидроксид аммония, карбонат или бикарбонат калия, соляную кислоты, азотную кислоту, серную кислоту и их смеси.

Значение рН композиции на основе микроорганизмов должно быть подходящим для микроорганизма, представляющего интерес. В определенных вариантах осуществления значение рН конечной композиции на основе микроорганизмов находится в диапазоне от 5,0 до 9,0, от 6,0 до 8,0 или предпочтительно от 7,0 до 7,5.

В одном варианте осуществления дополнительные компоненты, такие как водный препарат соли, такие как бикарбонат или карбонат натрия, сульфат натрия, фосфат натрия или бифосфат натрия, могут быть включены в композицию на основе микроорганизмов.

В определенных вариантах осуществления композиция на основе микроорганизмов согласно настоящему изобретению дополнительно содержит носитель. Носитель может представлять собой любой подходящий носитель, известный в данной области техники, который позволяет доставлять дрожжи или дрожжевые побочные продукты к целевым растениям и/или почве.

В дальнейших вариантах осуществления дрожжевой продукт поставляется, например, в форме жидких суспензий, эмульсий, лиофилизированных порошков или порошков, полученных распылительной сушкой, гранул, пеллет или гелей.

Композиции на основе микроорганизмов могут использоваться после их получения без дополнительной стабилизации, консервирования и хранения. Благоприятно, при прямом применении этих композиций на основе микроорганизмов сохраняются высокожизнеспособные микроорганизмы, уменьшается возможность загрязнения чужеродными агентами и нежелательными микроорганизмами и поддерживается активность побочных продуктов роста микроорганизмов.

Микроорганизмы и/или бульон, образуемые в результате роста микроорганизмов, могут быть удалены из сосуда для роста, в котором происходит культивирование и перенесены, например, с помощью трубки, для непосредственного применения.

В других вариантах осуществления композиция (микроорганизмы, бульон, или микроорганизмы и бульон) может быть помещена в контейнеры подходящего размера, принимая во внимание, например, предназначенное применение, рассматриваемый способ использования, размер резервуара для ферментации и любой способ транспортировки из помещения для роста микроорганизмов в место применения. Таким образом, контейнеры, в которые помещают композицию на основе микроорганизмов, могут быть, например, от 1 до 1000 галлонов или больше. В определенных вариантах осуществления контейнеры имеют объем 2, 5, 25 галлонов или больше.

После сбора композиции на основе микроорганизмов из ростовых сосудов могут быть добавлены дополнительные компоненты, когда собранный продукт помещают в контейнер и/или перекачивают (или другим способом транспортируют для применения). Добавки могут представлять собой, например, те, которые описаны в настоящем документе, а также другие, такие как пребиотики, вспомогательные вещества для почв и другие компоненты, специфические для предназначенного применения.

Необязательно, композицию можно хранить перед использованием. Время хранения предпочтительно является коротким. Следовательно, время хранения может составлять меньше чем 60, 45, 30, 20, 15, 10, 7, 5, 3, 2, 1 день или 12 ч. В предпочтительном варианте осуществления, если в продукте присутствуют живые клетки, продукт хранят при охлажденной температуре, такой как, например, меньше чем 20, 15, 10 или 5°C. С другой стороны, композицию поверхностно-активного вещества биологического происхождения обычно можно хранить при температуре окружающей среды.

Штаммы микроорганизмов.

Полезные микроорганизмы в соответствии с настоящим изобретением могут представлять собой, например, непатогенные бактерии, дрожжи и/или грибы. Эти микроорганизмы могут представлять собой природные или генетически модифицированные микроорганизмы. Например, микроорганизмы могут быть трансформированными специфическими генами, которые проявляют специфические характеристики.

Микроорганизмы также могут представлять собой мутанты желательного штамма. Как используется в настоящем документе, "мутант" обозначает штамм, генетический вариант или подтип эталонного микроорганизма, где мутант имеет одну или несколько генетических вариаций (например, точечную мутацию, миссенс-мутацию, нонсенс-мутацию, делецию, дупликацию, мутацию со сдвигом рамки считывания или экспансию повторов) по сравнению с эталонным микроорганизмом. Процедуры получения мутантов хорошо известны в области микробиологии. Например, для этого широко используются УФ-мутагенез и нитрозогуанидин.

В предпочтительных вариантах осуществления микроорганизмы представляют собой микроорганизмы, продуцирующие биохимические вещества, например поверхностно-активные вещества биологического происхождения и/или другие полезные метаболиты.

В одном варианте осуществления микроорганизм представляет собой дрожжи или грибы. Виды дрожжей и грибов, подходящие для применения в соответствии с настоящим изобретением, включают *Aureobasidium* (например, *A. pullulans*), *Blakeslea*, *Candida* (например, *C. apicola*, *C. bombicola*),

Entomophthora, Saccharomyces (например, *S. boulardii sequela*, *S. cerevisiae*, *S. torula*), Issatchenkia, Mortierella, Mycorrhiza, Penicillium, Phycomyces, Pseudozyma (например, *P. aphidis*), Starmerella (например, *S. bombicola*) и/или Trichoderma (например, *T. reesei*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. viride*).

В определенных вариантах осуществления микроорганизм представляет собой любые дрожжи, известные как "дрожжи-киллеры", которые характеризуются секрецией токсических белков или гликобелков, к которым сам штамм является иммунным. Они могут включать, например, *Candida* (например, *C. nodaensis*), *Cryptococcus*, *Debaryomyces* (например, *D. hansenii*), *Hanseniaspora*, (например, *H. uvarum*), *Hansenula*, *Kluveromyces* (например, *K. phaffii*), *Pichia* (например, *P. anomala*, *P. guilliermondii*, *P. occidentalis*, *P. kudriavzevii*), *Saccharomyces* (например, *S. cerevisiae*), *Torulopsis*, *Ustilago* (например, *U. maydis*), *Wickerhamomyces* (например, *W. anomalus*), *Williopsis* (например, *W. mrakii*), *Zygosaccharomyces* (например, *Z. bailii*) и др.

В одном варианте осуществления микроорганизм представляет собой *Starmerella bombicola*, который является эффективным продуцентом поверхностно-активных софоролипидов биологического происхождения. В другом варианте осуществления в настоящем изобретении используются дрожжи-киллеры, такие как, например, *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*). Также охватываются другие близкородственные виды, например другие представители кладов *Starmerella*, *Wickerhamomyces* и/или *Pichia*.

В определенных вариантах осуществления полезные микроорганизмы представляют собой бактерии, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии. Бактерии могут представлять собой, например, *Agrobacterium* (например, *A. radiobacter*), *Azotobacter* (*A. vinelandii*, *A. chroococcum*), *Azospirillum* (например, *A. brasilensis*), *Bacillus* (например, *B. amyloliquefaciens*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mucilaginosus*, *B. subtilis*), *Frateria* (например, *F. aurantia*), *Microbacterium* (например, *M. laevaniformans*), *Pantoea* (например, *P. agglomerans*), *Pseudomonas* (например, *P. aeruginosa*, *P. chlorographis* subsp. *aureofaciens* (Kluver), *P. putida*), *Rhizobium* spp., *Rhodospirillum* (например, *R. rubrum*) и/или *Sphingomonas* (например, *S. paucimobilis*).

В одном варианте осуществления микроорганизм представляет собой штамм *Bacillus*, способный продуцировать поверхностно-активный липопептид биологического происхождения, такой как, например, *B. subtilis* или *B. amyloliquefaciens*.

В одном варианте осуществления штамм *B. subtilis* представляет собой *B. subtilis* var. *locuses B1* или *B2*, которые являются эффективными продуцентами, например сурфактина и других поверхностно-активных веществ биологического происхождения, а также биополимеров. В настоящее изобретение включена в качестве ссылки международная публикация № WO 2017/044953 A1 в той степени, в которой ее раскрытие согласуется со сведениями, раскрытыми в настоящем документе.

В соответствии с настоящим изобретением могут использоваться другие штаммы микроорганизмов, например другие штаммы, способные накапливать существенные количества поверхностно-активных веществ биологического происхождения, маннопротеина, бета-глюкана и/или других полезных метаболитов.

Рост микроорганизмов в соответствии с настоящим изобретением.

В настоящем изобретении используются способы культивирования микроорганизмов и получения микробных метаболитов и/или других побочных продуктов роста микроорганизмов. Настоящее изобретение также относится к процессам культивирования, которые являются пригодными для культивирования микроорганизмов и получения микробных метаболитов в желательном масштабе. Эти процессы культивирования включают, но не ограничиваясь только ими, глубинное культивирование/ферментацию, твердофазную ферментацию (SSF) и модификации, гибриды (например, погруженный матрикс) и/или их комбинации.

Как используется в настоящем документе, "ферментация" относится к культивированию или росту клеток в культивируемых условиях. Рост может быть аэробным или анаэробным.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает материалы и способы для получения биомассы (например, жизнеспособный клеточный материал), внеклеточные метаболиты (например, небольшие молекулы и секретируемые белки), остаточные питательные вещества и/или внутриклеточные компоненты (например, ферменты и другие белки).

Сосуд для роста микроорганизмов, используемый в соответствии с настоящим изобретением, может представлять собой любой ферментер или реактор для культивирования для промышленного применения. В одном варианте осуществления сосуд может иметь функциональные контроли/сенсоры или может быть соединен с функциональными контролями/сенсорами для измерения важных факторов в процессе культивирования, таких как pH, кислород, давление, температура, влажность, плотность микроорганизмов и/или концентрация метаболита.

В дальнейшем варианте осуществления сосуд также может мониторить рост микроорганизмов внутри сосуда (например, измерять количество клеток и фазы роста). Альтернативно, из сосуда ежедневно можно отбирать образец и подвергать количественному определению с помощью техник, известных в данной области техники, таких как методика посева методом разведения. Посев методом разведения представляет собой простую технику, используемую для оценки количества организмов в образце. Ме-

тодика также может обеспечивать индекс, с помощью которого можно сравнивать различные окружающие среды или обработки.

Способ может обеспечивать насыщение растущей культуры кислородом. В одном варианте осуществления используется медленное движение воздуха для удаления воздуха с малым содержанием кислорода и введение обогащенного кислородом воздуха. В случае погруженной ферментации обогащенный кислородом воздух можно дополнять воздухом окружающей среды ежедневно с помощью различных механизмов, включая лопастные вращающиеся мешалки для механического перемешивания жидкости и распылители воздуха для обеспечения пузырьков газа в жидкость для растворения кислорода в жидкости.

В одном варианте осуществления способ включает дополнение культивирования источником азота. Источник азота может представлять собой, например, нитрат калия, нитрат аммония сульфат аммония, фосфат аммония, аммиак, мочевины и/или хлорид аммония. Эти источники азота могут использоваться независимо или в комбинации двух или более.

Способ может дополнительно включать дополнение культивирования источником углерода. Источник углерода обычно представляет собой углевод, такой как глюкоза, сахароза, лактоза, фруктоза, трегалоза, манноза, манит 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 глицерин; жиры и масла, такие как соевое масло, рапсовое масло, масло из рисовых отрубей, оливковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и/или льняное масло; и т.д. Эти источники углерода могут использоваться независимо или в комбинации двух или более.

В одном варианте осуществления в питательную среду включают факторы роста и микроэлементы для микроорганизмов. Является особенно предпочтительным, когда растущие микроорганизмы не способны продуцировать все витамины, которые им необходимы. Неорганические питательные вещества, включая микроэлементы, такие как железо, цинк, медь, марганец, молибден и/или кобальт, также можно включать в питательную среду. Кроме того, можно включать источники витаминов, незаменимые аминокислоты и микроэлементы, например, в форме тонкоизмельченных порошков или муки, таких как кукурузная мука, или в форме экстрактов, таких как дрожжевой экстракт, картофельный экстракт, говяжий экстракт, соевый экстракт, экстракт банановой кожуры и др., или в очищенных формах. Также могут быть включены аминокислоты, такие как, например, те, которые используются для биосинтеза белков.

В одном варианте осуществления также можно включать неорганические соли. Пригодными неорганическими солями могут являться дигидрофосфат калия, гидрофосфат дикалия, динатрия гидрофосфат, сульфат магния, хлорид магния, сульфат железа, хлорид железа, сульфат марганца, хлорид марганца, сульфат цинка, хлорид цинка, сульфат меди, хлорид кальция, хлорид натрия, кальция карбонат и/или карбонат натрия. Эти неорганические соли могут использоваться независимо или в комбинации двух или более.

В некоторых вариантах осуществления способ культивирования может дополнительно включать добавление дополнительных кислот и/или противомикробных средств в среду перед и/или во время процесса культивирования. Антимикробные агенты или антибиотики используются для защиты культуры от загрязнения.

Дополнительно, также могут быть добавлены антипенообразующие агенты для предотвращения образования и/или накопления пены, когда продуцируется газ в процессе глубинного культивирования.

Значение pH смеси должно быть подходящим для микроорганизма, представляющего интерес. Буферы и регуляторы pH, такие как карбонаты и фосфаты, могут использоваться для стабилизации pH на уровне предпочтительных значений. Если ионы металлов присутствуют в высоких концентрациях, то может быть необходимым использовать в среде хелатирующий агент.

Способ и оборудование для культивирования микроорганизмов и получение микробных побочных продуктов можно осуществлять в виде периодического процесса, квазинепрерывного процесса или непрерывного процесса.

Микроорганизмы могут расти в форме планктона или в виде биопленки. В случае биопленки сосуд может иметь внутри субстрат, на котором микроорганизмы могут расти в состоянии биопленки. Система также может иметь способность, например, применять стимулы (такие как напряжения при сдвиге), которые способствуют и/или улучшают характеристики роста биопленки.

В одном варианте осуществления способ культивирования микроорганизмов осуществляют при температуре от приблизительно 5 до приблизительно 100°C, предпочтительно от 15 до 60°C, более предпочтительно от 25 до 50°C. В дальнейшем варианте осуществления культивирование можно осуществлять в течение длительного времени при постоянной температуре. В другом варианте осуществления культивирование можно подвергать изменяемым температурам.

В одном варианте осуществления оборудование, используемое в способе и процессе культивирования, является стерильным. Оборудование для культивирования, такое как реактор/сосуд, может быть отделено от, но связано со стерилизующей установкой, например автоклавом. Культивирующее оборудование также может иметь стерилизующую установку, которая стерилизует *in situ* перед началом ино-

куляции. Воздух может стерилизоваться с помощью способов, известных в данной области техники. Например, воздух окружающей среды может проходить по меньшей мере через один фильтр перед поступлением в сосуд. В других вариантах осуществления среду можно пастеризовать или, необязательно, ее не нагревают совсем, где можно использовать низкую водную активность и низкое значение рН для контроля роста нежелательных бактерий.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение также обеспечивает способ получения микробного метаболита, такого как, например, поверхностно-активные вещества биологического происхождения, ферменты, белки, этанол, молочная кислота, бета-глюкан, пептиды, промежуточные продукты метаболизма, полиненасыщенные жирные кислоты и липиды, путем культивирования штамма микроорганизма согласно настоящему изобретению в условиях, подходящих для роста и продукции метаболита; и, необязательно, очищения метаболита. Содержание метаболита, полученного с помощью способа, может составлять, например, по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90%.

В случае погруженной ферментации содержание биомассы ферментативного бульона может составлять, например, от 5 до 180 г/л или более. В одном варианте осуществления содержание твердых веществ бульона составляет от 10 до 150 г/л.

Концентрация клеток может составлять, например,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$  или  $1 \times 10^{13}$  клеток или спор на 1 г конечного продукта.

Микробный побочный продукт роста, продуцируемый представляющими интерес микроорганизмами, может сохраняться в микроорганизмах или секретироваться в ростовую среду. Среда может содержать соединения, которые стабилизируют активность побочного продукта роста микроорганизмов.

В одном варианте осуществления все композиции для культивирования микроорганизмов удаляют после завершения культивирования (например, с помощью, например, достижения желательной плотности клеток или плотности указанного метаболита). В этой периодической процедуре инициируют полностью новую партию после сбора первой партии.

В другом варианте осуществления только часть продукта ферментации удаляют в любой отдельно взятый момент времени. В этом варианте осуществления биомасса с жизнеспособными клетками, спорами, конидиями, гифами и/или мицелием остается в сосуде в качестве инокулянта для новой партии культивирования. Композиция, которая удаляется, может представлять собой бесклеточную среду или содержать клетки, споры или другие репродуктивные стадии, служащие для размножения, и/или их комбинацию. Таким образом, создают квазинепрерывную систему.

Благоприятно, для способа не нужно сложного оборудования или высокого расхода энергии. Микроорганизмы, представляющие интерес, могут культивироваться в небольшом или промышленном масштабе локально и использоваться, даже являясь все еще смешанными с их средой.

Благоприятно, продукты на основе микроорганизмов могут продуцироваться в удаленных расположениях. Аппаратура для роста микроорганизмов может работать вне системы, например используя солнечную, ветровую и/или гидроэлектрическую энергию.

Приготовление продуктов на основе микроорганизмов.

Одним из продуктов на основе микроорганизмов согласно настоящему изобретению является только ферментативный бульон, содержащий микроорганизм и/или микробный метаболит, продуцируемый микроорганизмом, и/или любые остаточные питательные вещества. Продукт ферментации может использоваться непосредственно без экстракции или очистки. При необходимости, экстракцию и очистку легко можно осуществлять, используя стандартные способы или техники экстракции и/или очистки, описанные в литературе.

Микроорганизмы в продукте на основе микроорганизмов могут находиться в активной или инактивированной форме. Продукты на основе микроорганизмов могут содержать комбинацию активных и инактивированных микроорганизмов.

Микроорганизмы, побочные продукты роста микроорганизмов и/или бульон, получаемые при росте микроорганизмов, могут быть удалены из сосуда для роста и перенесены, например, с помощью трубки для немедленного использования.

В других вариантах осуществления композиция (микроорганизмы, метаболит, и/или бульон) может быть помещена в контейнер подходящего размера, принимая во внимание, например, предназначенное применение, предусмотренный способ использования, размер резервуара для ферментации и любой способ транспортировки от места роста микроорганизмов в место использования. Таким образом, контейнеры, в которые помещают композицию на основе микроорганизмов, могут иметь объем, например, от 1 до 1000 галлонов или больше. В других вариантах осуществления контейнеры имеют объем 2, 5, 25 галлонов или больше.

После сбора композиции на основе микроорганизмов из сосудов для роста можно добавлять другие компоненты, когда собранный продукт помещают в контейнеры и/или транспортируют по трубам (или другим способом транспортируют для применения). Добавки могут представлять собой, например, те, которые описаны в настоящем документе, а также другие, такие как эмульгирующие агенты, смазывающие вещества, агенты, контролирующие растворимость, средства для регулирования уровня рН, пребиотики, вспомогательные вещества для почв и другие компоненты, специфические для предназначенного

применения.

В одном варианте осуществления композиция может дополнительно содержать буферные агенты, включая органические кислоты и аминокислоты или их соли. Подходящие буферы включают цитрат, глюконат, тартрат, малат, ацетат, лактат, оксалат, аспарат, малонат, глюкогептонат, пируват, галактарат, глюкарат, тартронат, глутамат, глицин, лизин, глутамин, метионин, цистеин, аргинин и их смесь. Также можно использовать фосфорные и фосфористые кислоты или их соли. Подходяще использовать синтетические буферы, но предпочтительным является применение природных буферов, таких как органические кислоты и аминокислоты или их соли, перечисленные выше.

В дальнейшем варианте осуществления средства для регулирования уровня pH включают гидроксид калия, гидроксид аммония, карбонат или бикарбонат калия, соляную кислоты, азотную кислоту, серную кислоту или смесь.

В одном варианте осуществления в препарат могут быть включены дополнительные компоненты, такие как водный препарат соли в качестве многоосновной кислоты, такие как бикарбонат или карбонат натрия, сульфат натрия, фосфат натрия, бифосфат натрия.

Благоприятно, в соответствии с настоящим изобретением продукт на основе микроорганизмов может содержать бульон, в котором выращивают микроорганизмы. Продукт может содержать, например, по меньшей мере по весу, 1, 5, 10, 25, 50, 75 или 100% бульона. Количество биомассы в продукте, по весу, может составлять, например, любое количество от 0 до 100%, включая все процентные значения в этом интервале.

Необязательно, продукт можно хранить перед использованием. Время хранения предпочтительно является коротким. Таким образом, время хранения может составлять меньше чем 60, 45, 30, 20, 15, 10, 7, 5, 3, 2, 1 день или 12 ч. В предпочтительном варианте осуществления, если в продукте присутствуют живые клетки, продукт хранят при охлажденной температуре, такой как, например, меньше чем 20, 15, 10 или 5°C. С другой стороны, поверхностно-активное вещество биологического происхождения композиция обычно можно хранить при температурах окружающей среды.

В композицию на основе микроорганизмов могут быть добавлены дополнительные компоненты для усиления ее антипатогенной активности. Предпочтительно эти добавки являются органически или экологически безвредными. Например, адгезивные вещества, человеческие/животные противовирусные соединения, антибактериальные соединения, эфирные масла, терпены, эмульсификаторы, хелатирующие агенты или любое другое антипатогенное вещество могут быть включены в композицию. В чрезвычайных случаях, например, для уничтожения в промышленном масштабе для конкретной сельскохозяйственной культуры можно использовать антибиотики и/или противовирусные лекарственные средства вместе с заявленной обработкой.

В определенных вариантах осуществления адгезивное вещество можно добавлять к обработке для пролонгирования адгезии продукта к листьям растений. Можно использовать полимеры, такие как заряженные полимеры, или вещества на основе полисахаридов, например ксантановую камедь, гуаровую камедь, леван, ксиллиан, желлановую камедь, курдлан, пуллулан, декстран и др.

В предпочтительных вариантах осуществления ксантановую камедь промышленного класса используют в качестве адгезива. Концентрация камеди должна быть выбрана на основании содержания камеди в коммерческом продукте. Если ксантановая камедь имеет высокую чистоту, то достаточно 0,001% (мас./об.) ксантановой камеди/раствор.

В определенных вариантах осуществления, например, если лечение не является достаточно эффективным по отношению к грамотрицательным бактериям, заявленные продукты для обработки могут быть усилены для борьбы с болезнями растений, вызванными патогенными грамотрицательными бактериями, путем добавления хелатирующего агента.

Как используется в настоящем документе, "хелатирующий агент" или "хелатор" обозначает активный агент, способный удалять ион металла из системы путем образования комплекса таким образом, что ион металла не может легко принимать участие в реакции или катализировать образование радикала кислорода. Благоприятно, хелатирующий агент усиливает эффективность антимикробного поверхностно-активного вещества биологического происхождения путем модификации клеточных стенок, например грамотрицательных бактерий, таким образом, что они становятся более чувствительными к обработке поверхностно-активным веществом. Вследствие этого способность проникать в грамотрицательные бактерии расширяет спектр способностей обработки в соответствии с настоящим изобретением.

Примеры хелатирующих агентов, подходящих для настоящего изобретения, включают, но не ограничиваясь только ими, димеркаптоянтарную кислоту (DMSA), 2,3-димеркаптопропансульфоновую кислоту (DMPS), альфа-липоевую кислоту (ALA), тиамин тетрагидрофурурил дисульфид (TTFD), пеницилламин, этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA) и лимонную кислоту. В предпочтительных вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой EDTA в концентрации от 0,1 до 1,0% (об./об.).

Способы борьбы с вирусными и бактериальными патогенами растений.

Настоящее изобретение можно использовать для усиления культивирования растений путем борьбы с инфекциями, заражениями и/или болезням растений и/или сельскохозяйственных культур, например, в

сельском хозяйстве, растениеводстве, теплицах, ландшафтном дизайне и др. Благоприятно, способы можно использовать для борьбы с патогенами и/или для предотвращения распространения таких организмов от одного растения на другое.

В некоторых вариантах осуществления обеспечиваются способы для борьбы с мозаичным вирусом и/или бактериальными патогенами растений, где способы включают контактирование полезного микроорганизма и/или побочного продукта роста микроорганизма с частью растения, которая инфицирована патогеном. В определенных вариантах осуществления способ включает применение композиции на основе микроорганизмов в соответствии с настоящим описанием на растении. Благоприятно, композиция может убивать, уменьшать, конкурентно ингибировать рост и/или бороться другими способами с патогеном растения. Кроме того, способы могут улучшать иммунную и/или патогенную защиту растений без применения агрессивных химических средств или антибиотиков.

Как используется в настоящем документе, "нанесение" заявленных способов может включать контактирование продукта на основе микроорганизмов непосредственно с растением и/или его окружающей средой. Продукт микроорганизма можно распылить в качестве жидкости или безводного порошка, или нанести в виде геля или пасты на растение. Почвы можно обрабатывать с помощью жидких или безводных препаратов продуктов, например с помощью оросительной системы в виде жидкого раствора или в виде растворимых гранул или пеллет.

Композиция на основе микроорганизмов может контактировать непосредственно с растением и/или с окружающей средой растения. В определенных вариантах осуществления, нанесение включает контактирование продукт на основе микроорганизмов с листьями, или листовым покровом инфицированного растения. В других вариантах осуществления, композиции контактируют с любой частью растения, которое поражено, например, корнями, стеблями, цветами или плодами. Кроме того, композиции могут контактировать с целым растением, и/или со средой, окружающей растение, такой как почва.

В одном варианте осуществления способ включает применение продукта на основе микроорганизмов, содержащего дрожжи *Starmerella bombicola* и/или побочные продукты их роста, на растение или часть растения. В другом варианте осуществления полезный микроорганизм представляет собой *Wickerhamomyces anomalus*. В еще другом варианте осуществления полезный микроорганизм представляет собой бактерии, продуцирующие липопептид, такие как, например, *Bacillus subtilis* или *Bacillus a myloliquefaciens*.

Микроорганизмы могут быть либо живыми (или жизнеспособными), либо инактивированными во время применения. При использовании живых микроорганизмов микроорганизмы могут расти *in situ* и продуцировать активные соединения на месте. Вследствие этого высокая концентрация микроорганизмов может быть достигнута легко и в течение длительного времени в участке обработки (например, саду). В этом отношении способы могут дополнительно включать добавление материалов для усиления роста микроорганизмов во время применения. В одном варианте осуществления добавляемые материалы представляют собой источники питательных веществ, такие как, например, источники азота, нитрата, фосфора, магния и/или углерода.

В некоторых вариантах осуществления способ включает контактирование пораженного растения с микроорганизмом и/или побочными продуктами роста в ферментационной среде, в которой они продуцируются. В некоторых вариантах осуществления способ включает простое нанесение ферментационной среды и/или побочного продукта роста микроорганизма на растение. Побочные продукты роста могут находиться в очищенной или неочищенной форме. В предпочтительных вариантах осуществления побочный продукт роста представляет собой поверхностно-активное вещество биологического происхождения, такое как гликолипид или липопептид. В одном типичном варианте осуществления поверхностно-активное вещество биологического происхождения представляет собой софоролипид.

Способ может дополнительно включать применение одного или нескольких веществ для усиления эффектов борьбы с патогеном, таких как, например, адгезивное вещество для пролонгирования адгезии продукта, на растении. В одном варианте осуществления адгезивное вещество представляет собой ксантановую камедь. Другие вещества, которые можно применять с композицией, включают, например, экологически безвредные или органические вещества с противовирусными и/или антибактериальными свойствами, эфирные масла, терпены, эмульсификаторы, хелатирующие агенты или любые другие антипатогенные вещества. В чрезвычайных случаях, например, для уничтожения в промышленном масштабе для конкретной сельскохозяйственной культуры можно использовать антибиотики и/или противовирусные лекарственные средства вместе с заявленной обработкой.

Целевые патогены.

Дополнительно ко всем формам мозаичного вируса, примеры вирусных инфекций, поражающих растения, для борьбы с которыми пригодна настоящее изобретение, включают, но не ограничиваясь только ими, *Carlavirus*, *Abutilon*, *Hordeivirus*, *Potyvirus*, *Mastrevirus*, *Badnavirus*, *Reoviridae*, *Fijivirus*, *Oryzavirus*, *Phytoreovirus*, *Mycoreovirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*, *Ipomovirus*, *Bymovirus*, *Cucumovirus*, *Luteovirus*, *Begomovirus*, *Rhabdoviridae*, *Tospovirus*, *Comovirus*, *Sobemovirus*, *Nepovirus*, *Tobravirus*, *Benyvirus*, *Furovirus*, *Pecluvims*, *Pomovirus*; вирус мозаики люцерны; вирус мозаики свеклы; вирус мозаики маниоки; вирус мозаики коровьего гороха; вирус мозаики огурца; сателлитный вирус мозаики проса;

вирус "оспы" сливы; вирус мозаики патиссон; вирус табачной мозаики; пестролепестность тюльпанов и вирус жёлтой мозаики кабачка.

Примеры бактериальных инфекций, поражающих растения, для борьбы с которыми пригодно настоящее изобретение, включают, но не ограничиваясь только ими, *Pseudomonas* (например, *P. savastanoi*, *Pseudomonas 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*; *Ralstonia*; *Burkholderia*; *Acidovorax*; *Streptomyces*; *Spiroplasma* и *Phytoplasma*.

Продукты на основе микроорганизмов можно использовать либо отдельно, либо в комбинации с другими компонентами для эффективной борьбы с патогенными вредителями, включая вирусы, такие как мозаичный вирус, и бактерии. SLP обработка является менее эффективной по отношению к грамотрицательным бактериям по сравнению с другими вредителями и/или микроорганизмами; тем не менее продукты для способов обработки согласно заявленному изобретению можно усиливать для борьбы с болезнями растений, вызванными патогенными грамотрицательными бактериями. Это может осуществляться путем добавления хелатирующего агента к продукту.

#### Целевые растения.

Как используется в настоящем документе, "растение" относится к любому растению, используемому в сельском хозяйстве, как определено в настоящем документе. Растение может расти отдельно, например в саду, или может являться одним из многих растений, например в виде части фруктовой или овощной сельскохозяйственной культуры. Примеры растений, для которых полезно настоящее изобретение, включают, но не ограничиваясь только ими, зерновые культуры и травы (например, пшеница, ячмень, рожь, овес, рис, кукуруза, сорго, маис), свеклы (например, сахарная или кормовая свеклы); плоды (например, виноград, клубника, малина, ежевика, семечковые, косточковые, сочные плоды, яблоки, груши, сливы, персики, миндаль, вишни или ягоды); бобовые сельскохозяйственные культуры (например, бобы, чечевица, горох или соя); масличные сельскохозяйственные культуры (например, масличный рапс, горчица, мак, оливки, подсолнечник, кокос, клещевина, какао или арахис); бахчевые культуры (например, тыква, огурцы, патиссон или дыня); волокнистые растения (например, хлопчатник, лён, конопля или джут); цитрусовые (например, апельсины, лимоны, грейпфрут или мандарины); овощи (например, шпинат, салат-латук, спаржа, капуста, морковь, лук, помидоры, картофель или болгарский перец); лавровые (*Lauraceae*) (например, авокадо, корица или камфарное дерево); а также табак, орехи, травы, специи, медицинские растения, кофе, баклажан, сахарный тростник, чай, перец, культурный виноград, хмель, семейство подорожниковых, каучуконосные растения, живые цветы и декоративные растения.

Типы растений, которые могут иметь преимущества от применения продуктов и способов согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваясь только ими, пропашные сельскохозяйственные культуры (например, кукуруза, соя, сорго, арахис, картофель и т.д.), полевые сельскохозяйственные культуры (например, люцерна, пшеница, зерновые и т.д.), древесные сельскохозяйственные культуры (например, грецкий орех, миндаль, орех пекан, фундук, фисташки и т.д.), цитрусовые сельскохозяйственные культуры (например, апельсин, лимон, грейпфрут и т.д.), фруктовые сельскохозяйственные культуры (например, яблоки, груши, клубника, чёрная смородина, ежевика и т.д.), дерновые сельскохозяйственные культуры (например, дерн), декоративные сельскохозяйственные культуры (например, цветы, вьющиеся растения и т.д.), овощи (например, помидоры, морковь и т.д.), лозовые сельскохозяйственные культуры (например, виноград и т.д.), лесные культуры (например, сосна, ель, эвкалипт, тополь и т.д.), организованные пастбища (любая смесь растений, подходящая для поддержания жвачных животных).

Другие растения, которые могут иметь преимущества от продуктов и способов согласно изобретению, включают все растения, которые относятся к суперсемейству *Viridiplanteae*, в особенности однодольные и двудольные растения, включая кормовые или бобовые культуры, декоративные растения, пищевые сельскохозяйственные культуры, деревья или кустарники, выбранные, в частности, из *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Abelmoschus* spp., *Agave sisalana*, *Agropyron* spp., *Agrostis stolonifera*, *Allium* spp., *Amaranthus* spp., *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, *Annona* spp., *Apium graveolens*, *Arachis* spp., *Artocarpus* spp., *Asparagus officinalis*, *Avena* spp. (например, *A. sativa*, *A. fatua*, *A. byzantina*, *A. fatua* var. *sativa*, *A. hybrida*), *Averrhoa carambola*, *Bambusa* sp., *Benincasa hispida*, *Bertholletia 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., *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, *Carya* spp., *Carthamus tinctorius*, *Castanea* spp., *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*, *Cinnamomum* spp., *Citrullus lanatus*, *Citrus* spp., *Cocos* spp., *Coffea* spp., *Colocasia esculenta*, *Cola* spp., *Corchorus* sp., *Coriandrum sativum*, *Corylus* spp., *Crataegus* spp., *Crocus sativus*, *Cucurbita* spp., *Cucumis* spp., *Cynara* spp., *Daucus carota*, *Desmodium* spp., *Dimocarpus longan*, *Dioscorea* spp., *Diospyros* spp., *Echinochloa* spp., *Elaeis* (например, *E. guineensis*, *E. oleifera*), *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Erianthus* sp., *Eriobotrya japonica*, *Eucalyptus* sp., *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum* spp., *Fagus* spp., *Festuca arundinacea*, *Ficus carica*,

Fortunella spp., Fragaria spp., Ginkgo biloba, Глицин spp. (например, G. max, Soja hispida или Soja max), Gossypium hirsutum, Helianthus spp. (например, H. annuus), Hemerocallis fulva, Hibiscus spp., Hordeum spp. (например, H. vulgare), Ipomoea batatas, Juglans spp., Lactuca sativa, Lathyrus spp., Lens culinaris, Linum usitatissimum, Litchi chinensis, Lotus spp., Luffa acutangula, Lupinus spp., Luzula sylvatica, Lycopersicon spp. (например, L. esculentum, L. lycopersicum, L. pyriforme), Macrotyloma spp., Malus spp., Malpighia emarginata, Mamea americana, Mangifera indica, Manihot spp., Manilkara zapota, Medicago sativa, Melilotus spp., Mentha spp., Miscanthus sinensis, Momordica spp., Morus nigra, Musa spp., Nicotiana spp., Olea spp., Opuntia spp., Ornithopus spp., Oryza spp. (например, O. sativa, O. latifolia), Panicum miliaceum, Panicum virgatum, Passiflora edulis, Pastinaca sativa, Pennisetum sp., Persea spp., Petroselinum crispum, Phalaris arundinacea, Phaseolus spp., Phleum pratense, Phoenix spp., Phragmites australis, Physalis spp., Pinus spp., Pistacia vera, Pisum spp., Poa spp., Populus spp., Prosopis spp., Prunus spp., Psidium spp., Punica granatum, Pyrus communis, Quercus spp., Raphanus sativus, Rheum rhabarbarum, Ribes spp., Ricinus communis, Rubus spp., Saccharum spp., Salix sp., Sambucus spp., Secale cereale, Sesamum spp., Sinapis sp., Solanum spp. (например, S. tuberosum, S. integrifolium или S. lycopersicum), Sorghum bicolor, Spinacia spp., Syzygium spp., Tagetes spp., Tamarindus indica, Theobroma cacao, Trifolium spp., Tripsacum dactyloides, Triticosecale rimpaui, Triticum spp. (например, T. aestivum, T. durum, T. turgidum, T. hybernum, T. macha, T. sativum, T. monococcum или T. vulgare), Tropaeolum minus, Tropaeolum majus, Vaccinium spp., Vicia spp., Vigna spp., Viola odorata, Vitis spp., Zea mays, Zizania palustris, Ziziphus spp.

Дальнейшие примеры растений, представляющих интерес, включают, но не ограничиваясь только ими, кукурузу (*Zea mays*), виды *Brassica* (например, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), в особенности те виды *Brassica*, которые пригодны в качестве источников растительных масел, люцерну (*Medicago sativa*), рис (*Oryza sativa*), рожь (*Secale cereale*), сорго (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), просо (например, пennisетум сизый (*Pennisetum glaucum*), просо обыкновенное (*Panicum miliaceum*), просо итальянское (*Setaria italica*), finger millet (*Eleusine coracana*)), подсолнечник (*Helianthus annuus*), сафлор (*Carthamus tinctorius*), пшеница (*Triticum aestivum*), соя (*Glycine max*), табак (*Nicotiana tabacum*), картофель (*Solanum tuberosum*), арахис (*Arachis hypogaea*), хлопчатник (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), батат (*Ipomoea batatas*), маниок (*Manihot esculenta*), кофе (*Coffea* spp.), кокос (*Cocos nucifera*), ананас (*Ananas comosus*), цитрусовые деревья (*Citrus* spp.), какао (*Theobroma cacao*), чай (*Camellia sinensis*), банан (*Musa* spp.), авокадо (*Persea americana*), инжир (*Ficus casica*), гуава (*Psidium guajava*), манго (*Mangifera indica*), оливки (*Olea europaea*), папайя (*Carica papaya*), кешью (*Anacardium occidentale*), макадамия (*Macadamia integrifolia*), миндаль (*Prunus amygdalus*), сахарная свекла (*Beta vulgaris*), сахарный тростник (*Saccharum* spp.), овес, ячмень, овощные культуры, декоративные культуры и деревья хвойной породы.

Овощи включают помидоры (*Lycopersicon esculentum*), салат-латук (например, *Lactuca sativa*), зеленую фасоль (*Phaseolus vulgaris*), лимскую фасоль (*Phaseolus limensis*), горох (*Lathyrus* spp.) и представители рода *Cucumis*, такие как огурец (*C. sativus*), канталупу (*C. cantalupensis*), и мускусную дыню (*C. melo*). Декоративные растения включают азалию (*Rhododendron* spp.), гортензию (*Macrophylla hydrangea*), гибискус (*Hibiscus rosasanensis*), розы (*Rosa* spp.), тюльпаны (*Tulipa* spp.), нарциссы (*Narcissus* spp.), петунии (*Petunia hybrida*), гвоздики (*Dianthus caryophyllus*), пуанзецию (*Euphorbia pulcherrima*), и хризантему. Деревья хвойных пород, которые могут применяться при реализации изобретения, включают, например, сосны, такие как сосна ладанная (*Pinus taeda*), сосну Эллиота (*Pinus elliotii*), сосну орегонскую (*Pinus ponderosa*), сосну скрученную широкохвойную (*Pinus contorta*), и сосну лучистую (*Pinus radiata*); калифорнийскую пихту (*Pseudotsuga menziesii*); тсугу западную (*Tsuga canadensis*); ель ситхинскую (*Picea glauca*); секвойю вечнозеленую (*Sequoia sempervirens*); настоящие ели, такие как пихта миловидная (*Abies amabilis*) и пихта бальзамическая (*Abies balsamea*); и кедры, такие как туя гигантская (*Thuja plicata*) и каллитропис нутканский (*Chamaecyparis nootkatensis*). Растения в соответствии с вариантами осуществления включают сельскохозяйственные культуры (например, кукурузу, люцерну, подсолнечник, капусту, сою, хлопчатник, сфалор, арахис, сорго, пшеницу, просо, табак, и т.д.), такие как растения кукурузы и сои.

Газонные травы включают, но не ограничиваясь только ими, мятлик однолетний (*Poa annua*); райграс однолетний (*Lolium multiflorum*); мятлик сплюснутый (*Poa compressa*); овсяница красная (*Festuca rubra*); полевица гигантская (*Agrostis tenuis*); полевица болотная (*Agrostis palustris*); пырей гребенчатый (*Agropyron desertorum*); пырей пустынный (*Agropyron cristatum*); овсяница жестковатая (*Festuca longifolia*); мятлик луговой (*Poa pratensis*); ежа обыкновенная (*Dactylis glomerata*); райграс многолетний (*Lolium perenne*); овсяница красная (*Festuca rubra*); полевица белая (*Agrostis alba*); мятлик обыкновенный (*Poa trivialis*); овсяница овечья (*Festuca ovine*); костёр безостый (*Bromus inermis*); овсяница тростниковая (*Festuca arundinacea*); тимофеевка (*Phleum pratense*); полевица собачья (*Agrostis canina*); плакучая бескильница (*Puccinellia distans*); пырей Смита (*Agropyron smithii*); бермудская трава (*Cynodon* spp.); августинова трава (*Stenotaphrum secundatum*); цойсия японская (*Zoysia* spp.); гречка заметная (*Paspalum notatum*); аксонопс афинский (*Axonopus affinis*); многоножковая трава (*Eremochloa orhiuroides*); кикуйя (*Pennisetum clandestinum*); приморский паспалум (*Paspalum vaginatum*); бутелоуа изящная (*Bouteloua gracilis*); бизонова трава (*Buchloe dactyloides*); бутелоуа коротконисходящая (*Bouteloua curtipendula*).

Растения, представляющие включают, зерновые растения, которые обеспечивают семена, представ-

ляющие интерес, масличные растения, и бобовые растения. Семена, представляющие интерес, включают семена зерновых, таких как кукуруза, пшеница, ячмень, рис, сорго, рожь, просо и т.д. Масличные растения включают хлопчатник, сою, сафлор, подсолнечник, капусту, маис, люцерну, пальму, кокос, лён, клещевину, оливки и т.д. Бобовые растения включают бобовые и горох. Бобовые включают гуар, рожковое дерево, пажитник, сою, садовые бобовые, коровий горох, маш, лимскую фасоль, стручковую фасоль, чечевица, нут и т.д.

Локальная продукция продуктов на основе микроорганизмов.

В определенных вариантах осуществления согласно настоящему изобретению производственные мощности для роста микроорганизмов продуцируют свежие микроорганизмы с высокой плотностью и/или побочные продукты роста микроорганизмов, представляющие интерес в желательном масштабе. Производственные мощности для роста микроорганизмов могут быть расположены в или возле участка применения. Производственные мощности продуцируют композиции высокой плотности на основе микроорганизмов путем периодического, квазинепрерывного или непрерывного культивирования.

Производственные мощности для роста микроорганизмов согласно настоящему изобретению могут быть расположены в участке, где будут использоваться продукт на основе микроорганизмов (например, рыбноводческое хозяйство). Например, производственные мощности для роста микроорганизмов могут находиться на расстоянии меньше чем 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 15, 10, 5, 3 или 1 мили от участка применения.

В связи с тем, что продукт на основе микроорганизмов создают в участке или возле сайта применения, без необходимости стабилизации, консервации, пролонгированного хранения и дорогостоящих процессов транспортировки обычного продукта, можно создать значительно более высокую плотность живых микроорганизмов, при этом требуется намного меньше объем продукта на основе микроорганизмов для применения в участке применения. Это предоставляет возможность использования биореактора уменьшенного размера (например, меньшего резервуара для ферментации; меньших поставок исходного материала, питательных веществ, агентов для контроля значения pH, антивспенивающего агента и т.д.), что делает систему эффективной. Кроме того, местное получение облегчает перемещаемость продукта.

Местное создание продукта на основе микроорганизмов также облегчает включение ростового бульона в продукт. Бульон может содержать агенты, продуцируемые во время ферментации, которые особенно хорошо пригодны для местного применения.

Локально продуцированные функциональные культуры микроорганизмов высокой плотности являются более эффективными в полевых условиях по сравнению с теми, которые были подвергнуты стабилизации вегетативных клеток или поставлены в цепочку поставок на некоторое время. Продукты на основе микроорганизмов согласно настоящему изобретению являются особенно благоприятными по сравнению с традиционными продуктами, в которых клетки отделены от метаболита и питательных веществ, присутствующих в ферментационной ростовой среде. Уменьшенное время транспортировки предоставляет возможность получения и доставки свежих партий микроорганизмов и/или их метаболитов во время и в объеме, как необходимо согласно местному спросу.

Производственные мощности для роста микроорганизмов согласно настоящему изобретению продуцируют свежие композиции на основе микроорганизмов, содержащие сами микроорганизмы, микробные метаболиты и/или другие компоненты бульона, в котором растут микроорганизмы. При необходимости, композиции могут иметь высокую плотность вегетативных клеток, инактивированных клеток или смеси вегетативных клеток, инактивированных клеток, репродуктивных спор, мицелия и/или других микробных черенков. Благоприятно, композиции можно специально приспособлять для применения в указанном месте. В одном варианте осуществления производственные мощности для роста микроорганизмов расположены в или возле участка, где будут использовать продукты на основе микроорганизмов.

Благоприятно, эти производственные мощности для роста микроорганизмов обеспечивают решение существующих в настоящее время проблем с учетом обширных производителей в промышленном масштабе, качество продукции которых страдает вследствие задержки вышерасположенных процессов, затруднений каналов поставок, нарушения правил хранения и других непредвиденных обстоятельств, которые подавляют своевременную доставку и применение, например, продукта, содержащего жизнеспособные клетки в больших количествах, и/или стадии, служащей для размножения, и ассоциированного бульона и метаболитов, в которых изначально растут микроорганизмы.

Благоприятно, в предпочтительных вариантах осуществления системы согласно настоящему изобретению используют энергию встречающихся в природе локальных микроорганизмов и их метаболических побочных продуктов для лечения фитопатогенных бактерий. Локальные микроорганизмы можно идентифицировать на основании, например, устойчивости к действию солей, способности расти при высоких температурах и применения генетической идентификации последовательностей. Дополнительно, производственные мощности для роста микроорганизмов обеспечивают производственную переменчивость путем их способности приспособлять продукты на основе микроорганизмов для улучшения синергизма с территориальными характеристиками места назначения.

Время культивирования для индивидуальных сосудов может составлять, например, от 1 дня до 2 недель или больше. Продукт культивирования может быть собран с помощью любых различных путей.

Локальная продукция и доставка, например, в течение 24 ч после ферментации приводит к получению чистой, с высокой плотностью микроорганизмов композиции и существенно снижает стоимость доставки. Учитывая перспективы быстрого перемещения для развития более эффективных и мощных микробных инокулянтов, потребители получают много преимуществ благодаря этой способности быстро доставлять продукты на основе микроорганизмов.

### Примеры

Для большего понимания настоящего изобретения и его основных преимуществ можно привести ссылки на последующие примеры, представленные только с целью иллюстрации. Последующие примеры иллюстрируют некоторые способы, применение, аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения. Они не должны рассматриваться как ограничивающие изобретение. Можно осуществить различные изменения и модификации в связи с изобретением.

Пример 1. Ферментация софоролипида.

Для настоящего изобретения природную смесь софоролипидов синтезировали путем ферментации *S. bombicola* в ферментационной среде, содержащей 100 г глюкозы, 5 г дрожжевого экстракта, 1 г мочевины и 100 г рапсового масла в 1000 мл воды. После ферментации в течение 5-7 дней софоролипид собирали путем осаждения. После добавления дополнительных количеств той же самой питательной среды ферментацию продолжали в течение дополнительных 3 дней, после чего собирали другую порцию SLP.

С помощью этого ферментационного процесса продуцировали два различных продукта: один содержал чистый SLP, и один содержал культуру *S. bombicola*, содержащую SLP.

Пример 2. Приготовление раствора SLP для листовой обработки.

Осажденный SLP, полученный с помощью ферментации *S. bombicola*, можно использовать для продуцирования продукта для обработки растений от всех типов вирусов мозаики. Осажденный SLP обычно содержит вплоть до 50% воды; тем не менее не нужно дополнительных концентраций для приготовления этого типа продукта для обработки. Продукт для обработки содержит от 0,1 до 0,5% (об./об.) неочищенного SLP.

Пример 3. Приготовление раствора SLP, содержащего клетки *S. bombicola*, для листовой обработки.

Другой тип продукта для обработки, который можно использовать, представляет собой культуру *S. bombicola* для борьбы с вирусами мозаики, также другими микробными патогенами, такими как патогенные грамположительные бактерии. Культуру можно продуцировать в переносных, распространяемых реакторах, которые можно обеспечить для местной продукции продукта непосредственно близко от участка применения.

В процессе культивирования продуцируется 250 галлонов чистой культуры *S. bombicola*, содержащей вплоть до 4 г/л SLP. Полученную культуру разводят по меньшей мере в 10 раз, получая по меньшей мере 2500 галлонов продукта для обработки.

Пример 4. Обработка растений огурца, инфицированного мозаичным вирусом.

Настоящее изобретение используют для обработки растений огурца, инфицированного мозаичным вирусом. Листья растений огурца обрабатывали композицией, содержащей 0,2% SLP. SLP композицию распыляли на поверхности листьев в течение трехдневного периода.

Мозаичные пятна, присутствующие на листьях, исчезали, и листья выглядели здоровыми в течение менее 5 дней от начала обработки.

Пример 5. SLP обработка грамположительных бактерий.

Чашки Петри с содержащимися грамположительными бактериями *Bacillus subtilis* обрабатывали 0,5% раствором SLP. После обработки в течение 2 дней наблюдали ореол с отсутствием культурального роста (в диаметре больше половины дюйма).

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ борьбы с мозаичным вирусом растения, который включает контактирование композиции, содержащей микроорганизм *Starmerella bombicola* и побочный продукт его роста, с растением, пораженным мозаичным вирусом, при этом побочный продукт роста представляет собой поверхностно-активный софоролипид биологического происхождения.

2. Способ по п.1, где композицию наносят на листья растений или листовую покров.

3. Способ по п.1, где композиция содержит ферментативный бульон, в котором продуцируется микроорганизм и/или побочный продукт роста.

4. Способ по п.1, где софоролипид присутствует в концентрации от 0,1 до 0,5%.

5. Способ по п.2, который дополнительно включает нанесение на растение адгезивного вещества совместно с композицией.

6. Способ по п.5, где адгезивное вещество представляет собой полисахарид.

7. Способ по п.6, где полисахарид представляет собой ксантановую камедь в концентрации 0,001% (мас./об.).

