

SISTEMAS DISTRIBUIDOS PARA LA PRODUCCIÓN Y USO EFICIENTES DE COMPOSICIONES A BASE DE MICROBIOS

REFERENCIA CRUZADA A UNA SOLICITUD RELACIONADA

5

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los EE. UU. Número de serie 62/385,057, presentada el 8 de septiembre de 2016, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

20

25

En todo el mundo, la agricultura, la silvicultura, la ganadería, la acuicultura y otros medios para producir alimentos, aditivos nutricionales, sabores, fragancias, fibra y materiales estructurales naturales se están volviendo cada vez más difíciles debido a los desafíos ambientales que incluyen la resistencia de las plagas a los productos químicos convencionales, temperaturas extremas, sequías, inundaciones, nuevos patógenos de plantas y plagas de insectos, la proliferación de plagas transfronterizas, las preferencias de los consumidores por los residuos químicos bajos y los alimentos no GMO y las múltiples regulaciones gubernamentales que limitan el uso generalizado de insumos químicos convencionales, como herbicidas, pesticidas y fertilizantes para limitar graves impactos ambientales de estos mismos insumos químicos. La gravedad y la imprevisibilidad de estos factores hacen que las granjas, bosques, pastizales y otros sitios de producción sean muy vulnerables y anuncian la necesidad de una mayor flexibilidad y resiliencia operativa. Una mejor gestión de los recursos y la capacidad de aumentar los rendimientos con menos insumos también pondrían a las granjas, los bosques y los pastizales en una posición más resistente.

Teniendo en cuenta la disponibilidad limitada de tierras adecuadas para cultivo, tierras adecuadas para bosques, la sensibilidad ambiental de las tierras adyacentes a estas áreas, las preocupaciones de las comunidades en las que existen tierras de cultivo, operaciones de cría de animales y bosques, el predominio de la producción agrícola de secano y los retiros adicionales de ríos, lagos y acuíferos para satisfacer futuras necesidades de riego, la creciente escasez de nutrientes naturales como el fosfato, elementos nutricionales menores, etc. El foco de atención está directamente capacitado para aumentar responsablemente los rendimientos de cultivos, silvicultura y animales, el uso productivo del agua, medido por la producción por unidad de área terrestre y por megalitros de agua y por dólar de capital invertido, todo fundamental para lograr la seguridad de los alimentos, las fibras y los materiales estructurales en las próximas décadas.

Con el fin de aumentar los rendimientos y proteger los cultivos contra patógenos, plagas y enfermedades, los agricultores han dependido en gran medida del uso de productos químicos sintéticos y fertilizantes químicos; sin embargo, cuando se usa en exceso o se aplican incorrectamente, estas sustancias pueden verse en el agua de la superficie, filtrarse en el agua subterránea y evaporarse en el aire. Como fuentes de contaminación del aire y del agua, estas sustancias se analizan cada vez más, lo que hace que su uso responsable sea un imperativo ecológico y comercial. Incluso cuando se usan correctamente, la dependencia excesiva y el uso a largo plazo de ciertos fertilizantes químicos y pesticidas altera de manera perjudicial los ecosistemas del suelo, reduce la tolerancia al estrés, aumenta la resistencia a las plagas e impide el crecimiento y la vitalidad de las plantas y los animales.

Como la química de nematicidas de contacto sintético y los fumigantes del suelo se enfrentan a un mayor escrutinio y las nuevas tuberías de nematicidas,

herbicidas, reguladores de crecimiento de plantas, insecticidas, bactericidas y fungicidas y otros productos químicos de insumos de cultivos se reducen debido al aumento de los umbrales reguladores, pesticidas biológicos sostenibles, microbios que promueven el crecimiento, microbios que aumentan el contenido nutricional de los suelos y ayudan a administrar la eficiencia del uso del agua que se están convirtiendo en alternativas más importantes, particularmente en aquellas que brindan niveles de eficacia similares a los pesticidas convencionales, fumigantes, reguladores del crecimiento de plantas, surfactantes y fertilizantes. Las condiciones económicas y ambientales crean oportunidades para tratamientos biológicos de malezas, insectos y enfermedades causadas por nematodos parásitos de plantas, insectos, ácaros, bacterias y hongos. Como resultado, existe una importante demanda de soluciones más amigables con el medio ambiente que hacen que valga la pena invertir en investigación y desarrollo de nuevos pesticidas de origen biológico.

Al año se pierden \$1.5 mil millones solo con el nematodo del quiste de la soya. La aplicación de nematicidas de contacto colocados en el surco de semillas en la siembra ha sido el método de aplicación principal. Debido a la toxicidad hacia los animales cercanos, como las aves, los pivotes centrales sobre la cabeza con aplicaciones líquidas de compuestos tóxicos como Namacur, Temik, Furadan, Dazinat y Mocap han caído en desgracia.

Desde la década de 1960, los cultivadores han utilizado el bromuro de metilo para esterilizar eficazmente los campos antes de plantar para controlar principalmente los nematodos, así como para tratar enfermedades y malezas; sin embargo, debido a que este compuesto tóxico se usa en forma de gas, más de la mitad de la cantidad inyectada en el suelo eventualmente puede terminar en la atmósfera. Al ascender a la atmósfera, contribuye al adelgazamiento de la capa de

ozono. En 2005, los países desarrollados prohibieron el metilbromuro en virtud del Protocolo de Montreal, que es un tratado internacional firmado en 1987 para proteger la capa de ozono estratosférico.

5 Según la prohibición, el tratado permite el uso limitado de bromuro de metilo en fresas, almendras y otros cultivos que carecen de alternativas para el control efectivo y asequible de nematodos, enfermedades y malezas. La extensión del uso autorizado disminuye cada año y probablemente terminará pronto. Encontrar alternativas al bromuro de metilo es, por lo tanto, una prioridad para el USDA, que
10 otorgó una subvención de \$5 millones que apoyó la investigación para identificar alternativas desde 2010. Sin embargo, ningún producto proporciona el amplio espectro de control ofrecido por los bromuros de metilo.

 El aumento de los mandatos reglamentarios gubernamentales que rigen la
15 disponibilidad y el uso de productos químicos y las demandas de los consumidores de alimentos cultivados de forma sostenible y sin residuos, cuya producción tiene un impacto mínimo en el medio ambiente en el que se cultivan los alimentos y las fibras, están afectando a la industria y provocando una evolución de pensamiento con respecto a cómo abordar la miríada de desafíos. Claramente, la eliminación
20 inmediata del uso de productos químicos no es una opción viable. Los productores que enfrentan la inevitable transición a productos alternativos están buscando alternativas viables con diferentes grados de éxito. Si bien en este momento no es factible la eliminación total de químicos, los agricultores están adoptando cada vez más el uso de medidas biológicas como componentes viables de los programas de
25 Manejo Integrado de Nutrientes y Manejo Integrado de Plagas.

 La nutrición, el crecimiento y el funcionamiento adecuado de una planta dependen de la cantidad y distribución de poblaciones robustas de microflora natural que, a su vez, están influenciadas por la fertilidad del suelo, la labranza, la humedad,

la temperatura, la ventilación, la materia orgánica y muchos otros factores. La sequía prolongada, la precipitación variable y otras variaciones ambientales, incluida la proliferación de nematodos y otras plagas y las malezas influyen en esos factores y afectan la diversidad de la microflora del suelo y la salud de las plantas.

5

Además, los residuos químicos de la aplicación foliar o al suelo de fertilizantes químicos, desechos de animales procesados incorrectamente como fertilizantes, pesticidas, fungicidas, herbicidas, surfactantes y otros productos sintéticos pueden alterar los perfiles microbianos y socavar el crecimiento y la vitalidad de las plantas,
10 lo que a su vez puede afectar a los animales que consumen aquellas plantas o productos producidos a partir de esas plantas.

El uso de bioplaguicidas y otros agentes biológicos se ha visto muy limitado por las dificultades en la producción, el transporte, la administración, los precios y
15 la eficacia. Por ejemplo, muchos microbios son difíciles de cultivar y, posteriormente desplegar en sistemas de producción agrícola y forestal en cantidades suficientes para ser útiles. Este problema se ve agravado por las pérdidas en la viabilidad y/o la actividad debido al procesamiento, la formulación, el almacenamiento, la estabilización antes de la distribución, la esporulación de células vegetativas como
20 medio de estabilización, transporte y aplicación. Además, una vez aplicados, los productos biológicos pueden no prosperar por varios motivos, entre los que se incluyen, por ejemplo, una densidad celular inicial insuficiente, la incapacidad de competir eficazmente con la microflora existente en un lugar en particular y la introducción al suelo y/u otras condiciones ambientales en las que el microbio no
25 puede prosperar o incluso sobrevivir, especialmente si no se aplica en el medio ambiente a concentraciones lo suficientemente altas como para permitir el crecimiento competitivo de aquellos microbios ya presentes en el medio ambiente

en el que se liberan los productos biológicos o se alimentan de nutrientes que serían componentes de fertilizantes biológicos innovadores.

Se han utilizado pesticidas "blandos", como los derivados de bacterias,
5 levaduras u hongos y sus metabolitos; sin embargo, generalmente son más débiles
y se pueden filtrar rápidamente a través del suelo, sin el efecto residual para
controlar las plagas que viene con la aplicación de productos biológicos vivos y
robustos que continúan produciendo metabolitos activos. De hecho, la aplicación de
caldo completo (toda la producción de fermentación) puede ser importante para
10 activar y mantener la eficacia del producto biológico.

Actualmente, las operaciones agrícolas de ganadería y silvicultura se limitan a
obtener enmiendas microbianas de productores remotos cuya calidad del producto
sufre debido a retrasos en el procesamiento corriente arriba, métodos utilizados
15 para estabilizar el producto para su distribución futura, cuellos de botella en las
cadenas de suministro, almacenamiento inadecuado y otros factores que inhiben la
entrega y aplicación oportunas de productos microbianos viables y de alto recuento
de células.

20 Por lo tanto, existe la necesidad de sistemas y composiciones para la
producción y uso eficiente de microorganismos y sus subproductos para permitir a
los agricultores de todo el mundo cultivar de forma sostenible más alimentos y
suplementos nutricionales, los silvicultores para producir de manera sostenible más
fibra y materiales estructurales, utilizar mejor la disminución y escasos recursos
25 naturales y potenciar la resiliencia operativa y los beneficios.

Los microbios y sus subproductos son útiles en muchos entornos, además de
la agricultura, la ganadería y la silvicultura. Estos otros usos incluyen, entre otros, la
remediación de suelos, agua y otros recursos naturales, la minería y el negocio

petrolero, alimentación animal, tratamiento y eliminación de desechos, preparación y procesamiento de alimentos y bebidas y en la salud humana. En cada uno de estos entornos, una fuente fácilmente disponible de células microbianas, esporas o micelios, así como el caldo de la fermentación de estos microbios, puede ser altamente beneficiosa. Actualmente hay una necesidad de sistemas que ofrezcan tales productos basados en microbios de una manera que haga que los productos personalizados con una gran viabilidad estén disponibles para abordar los problemas que surgen en momentos y lugares específicos.

BREVE RESUMEN

La presente invención proporciona sistemas para la producción y uso eficientes de microbios beneficiosos, así como para la producción y uso de sustancias, tales como metabolitos, derivados de estos microbios y el caldo de fermentación en el que se producen.

La presente invención proporciona además productos basados en microbios, así como usos para estos productos, que se pueden utilizar para lograr resultados beneficiosos en muchos entornos, entre los que se incluyen, por ejemplo, biorremediación y minería mejoradas; eliminación y tratamiento de residuos; la mejora del ganado y la salud de otros animales; mejora de la recuperación de petróleo y gas y limpieza del equipo de procesamiento y transporte de petróleo y gas; y promover la salud y la productividad de las plantas mediante la aplicación de uno o más de los productos basados en microbios.

En el contexto de la agricultura, de acuerdo con la presente invención, es posible producir, distribuir y aplicar de manera eficiente, productos basados en

microbios que tengan características ventajosas para un cultivo particular en un momento particular de una temporada de crecimiento y en una ubicación particular.

Los sistemas de la presente invención facilitan la obtención y aplicación de
5 productos basados en microbios personalizados que tienen altas concentraciones de células vegetativas, esporas reproductivas, micelios fúngicos y/u otros propágulos microbianos, así como el caldo en el que se cultivan estos microbios. Los subproductos del crecimiento microbiano en este caldo pueden ser altamente
10 beneficiosos en una amplia gama de entornos agrícolas, forestales, de pasturas y otros. Los productos basados en microbios se pueden personalizar para proporcionar, en pocos días o menos, soluciones específicas para abordar problemas particulares en una ubicación específica.

Los productos de la presente invención basados en microbios se pueden usar
15 en una variedad de entornos únicos debido, por ejemplo a, la capacidad de entregar de manera eficiente: 1) caldo de fermentación fresco con metabolitos activos; 2) una mezcla de células, esporas y/o micelios y caldo de fermentación; 3) una composición con células vegetativas, esporas y/o micelios; 4) composiciones con una alta densidad de células, incluidas células vegetativas, esporas y/o micelios; 5)
20 productos a base de microbios en el corto plazo; y 6) productos basados en microbios en ubicaciones remotas.

Estos productos basados en microbios se pueden usar en entornos que incluyen, entre otros, pero no se limitan a, cultivos, ganado, silvicultura, manejo de
25 césped, pastizales, acuicultura, minería, eliminación y tratamiento de desechos, remediación ambiental y salud humana.

En implementaciones específicas, los sistemas de la presente invención proporcionan soluciones basadas en la ciencia que mejoran la productividad agrícola, por ejemplo, promoviendo la vitalidad de los cultivos; mejora de los rendimientos de los cultivos; potenciar la resistencia a insectos y enfermedades; control de insectos, nematodos, enfermedades y malezas; mejora de la nutrición de las plantas; mejorar el contenido nutricional de los suelos agrícolas y forestales y de pastos; y promover un uso del agua mejorado y más eficiente.

En una implementación, un sistema según la presente invención comprende un primer aspecto que proporciona una instalación que tiene la capacidad de producir una pluralidad de composiciones basadas en microbios; un segundo aspecto para la distribución de productos a base de microbios producidos en la instalación; y, opcionalmente, un tercer aspecto que facilita la aplicación de campo de los productos basados en microbios. Como se usa en este contexto, la referencia a "campo" incluye, pero no se limita a, la agricultura. Por lo tanto, el "campo" puede ser cualquier lugar donde se utilizarán los productos de la presente invención basados en microbios.

Los aspectos adicionales del sistema pueden incluir la identificación inicial y el desarrollo de microbios, así como el seguimiento del número y el movimiento de los microbios y/o sus metabolitos después de la aplicación.

En una implementación, la presente invención proporciona instalaciones de crecimiento microbiano que tienen una pluralidad de recipientes de microbios para el cultivo de microorganismos y la producción de subproductos microbianos. Preferiblemente, la instalación alberga al menos 2, 25, 50, 75, 110, 250, 500 o más (incluyendo cada número entre 2 y 500 o más) vasos de crecimiento, en donde estos vasos tienen controles independientes y se pueden usar para cultivar diferentes

microorganismos y luego transportan los productos de estos vasos de crecimiento bien sea como productos de un solo organismo o como mezclas de dos o más de estos productos.

5 Las instalaciones de crecimiento microbiano de la presente invención producen composiciones frescas basadas en microbios, que comprenden los propios microbios, los metabolitos microbianos y/u otros componentes del caldo en el que se cultivan los microbios. Si se desea, las composiciones pueden tener una alta densidad de células vegetativas, esporas, micelios, u otros propágulos
10 microbianos, o una mezcla de estos.

Ventajosamente, las composiciones se pueden adaptar para uso en una ubicación específica, con, por ejemplo, cultivos específicos y para abordar problemas específicos. En una implementación, la instalación para el crecimiento
15 de microbios está ubicada en, o cerca de, un sitio donde los productos a base de microbios se aplicarán a las plantas, al ambiente de las plantas o se utilizarán para otro uso.

Ventajosamente, el sistema modular utilizado en la instalación de crecimiento
20 de microbios hace posible aumentar o disminuir la producción con un bajo costo de instalación o eliminación, lo que en algunas implementaciones podría permitir el movimiento de la instalación de una ubicación a otra. La instalación de crecimiento de microbios no requiere personal altamente capacitado para la producción y un solo operador puede ejecutar muchos sistemas de crecimiento de microbios. Debido
25 a que los productos se fabrican cerca del consumidor, el tiempo y el daño del producto asociados con el inventario y la distribución se reducen.

Ventajosamente, estas instalaciones de crecimiento de microbios brindan una solución al problema actual de depender de productores industriales de gran tamaño cuya calidad del producto sufre debido a retrasos en el procesamiento ascendente, cuellos de botella en la cadena de suministro, almacenamiento inadecuado y otras contingencias que impiden la entrega y aplicación oportunas, de, por ejemplo, un producto viable de alto recuento celular y el caldo y los metabolitos asociados en los que las células se cultivan originalmente. En el caso de la agricultura, esta capacidad para comprimir dramáticamente el tiempo entre la fabricación y la aplicación permite a los agricultores crecer más, ser más rentables y mejorar la capacidad de recuperación de la gestión de las fincas frente a los crecientes impactos del cambio climático, las presiones sobre los recursos naturales, los cambios en requisitos de cumplimiento, preferencias del consumidor y otros desafíos de mercados emergentes.

Ventajosamente, en implementaciones preferidas, los sistemas de la presente invención aprovechan el poder de los microorganismos locales naturales y sus subproductos metabólicos para nutrir, vigorizar y proteger los ecosistemas de cultivos y las comunidades y entornos en los que existen estos ecosistemas. El mejoramiento de las poblaciones microbianas locales también puede ser ventajoso en otros entornos, que incluyen, entre otros, la remediación ambiental (como en el caso de un derrame de petróleo), la cría de animales, la acuicultura, la silvicultura, el manejo de pastos, el césped, la producción ornamental hortícola, la eliminación y tratamiento de residuos, minería, recuperación de petróleo y salud humana, incluso en lugares remotos.

En una implementación, el sistema comprende un aspecto que proporciona almacenamiento (típicamente almacenamiento a corto plazo) y/o distribución de productos basados en microbios. Este aspecto del sistema puede incluir, por

ejemplo, un centro de distribución. En una implementación, las composiciones y/o productos basados en microbios se almacenan en la instalación de crecimiento de microbios. En ciertas implementaciones, el centro de distribución puede comprender un centro de inventario, utilizado para almacenar los productos basados en microbios antes del transporte al campo de uso.

En una implementación, un centro de distribución puede comprender además un departamento de soporte mecánico y/o técnico que proporciona soporte mecánico y técnico a clientes que, por ejemplo, utilizan los productos basados en microbios. El centro puede brindar asistencia para el diagnóstico, el análisis y la rectificación en el lugar de los problemas relacionados con los productos basados en microbios y/o uso.

En una implementación, el sistema de acuerdo con la presente invención comprende un aspecto adicional que proporciona la aplicación de campo de los productos basados en microbios. En el caso de la agricultura, las composiciones de la presente invención basadas en microbios se pueden aplicar, por ejemplo, a través de un sistema de irrigación, como un aerosol, como un tratamiento de semillas a la superficie del suelo, a las superficies de las plantas y/o a las superficies de las plagas. También se facilita la aplicación mecánica a través de implementos convencionales o la aplicación robótica a través de "drones" aéreos o terrestres.

Ventajosamente, los sistemas de la presente invención proporcionan a los consumidores, a través de tecnologías novedosas que involucran enfoques rentables, composiciones frescas, potentes y con alto contenido en microbios de alto recuento de células, que pueden incluir metabolitos y/u otros subproductos producidos durante el proceso de cultivo. Además, estos productos basados en microbios se pueden adaptar y producir específicamente con un tiempo de entrega

corto, para satisfacer las necesidades inmediatas de una granja específica u otro consumidor.

Por lo tanto, los sistemas distribuidos de la presente invención facilitan la producción personalizada de microbios, mezclas de microbios, caldos de fermentación y mezclas de estos, para satisfacer las necesidades de los consumidores en una ubicación geográfica particular con necesidades específicas para mejorar los rendimientos, la eficiencia u otros objetivos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Diagrama de flujo de un sistema para la producción y uso efectivo de microorganismos y los subproductos del crecimiento microbiano.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona sistemas para la producción y uso eficientes de microbios beneficiosos, así como para la producción y uso de sustancias, tales como metabolitos producidos por estos microbios.

En una implementación preferida, la presente invención proporciona composiciones basadas en microbios, así como métodos para usar las composiciones para promover la salud de las plantas, la diversidad microbiana del suelo, la nutrición de las plantas, la capacidad nutritiva del suelo, optimizar el estado de humedad del suelo, la aireación del suelo, la capacidad de retención de agua del suelo, reduciendo la susceptibilidad de las plantas, a plagas, enfermedades y malezas. Esto se logra mejorando las defensas naturales de las plantas, el contenido nutritivo de la salud microbiana de los suelos y afectando directamente

las plagas, enfermedades o malezas de las plantas. Este efecto de promoción de la planta se produce como resultado de la aplicación de uno o más de los productos de la presente invención basados en microbios a la planta y/o su entorno.

5 Por lo tanto, en ciertas implementaciones, la presente invención proporciona composiciones y métodos para mejorar la defensa de una planta contra ataques exógenos empleando uno o más microbios y/o composiciones basadas en microbios. Los ataques exógenos pueden ser de naturaleza biótica o abiótica. Ejemplos no limitantes de ataques bióticos incluyen parásitos de plantas,
10 herbívoros, insectos, insectos que sirven como vectores de enfermedades de las plantas, bacterias, hongos, virus y plantas invasoras como las malezas. Los ataques abióticos pueden ser causados, por ejemplo, por cambios en el entorno de una planta. En algunas implementaciones, los ataques exógenos son abióticos, originados en condiciones físicas extremas que incluyen, entre otros, cambios en la
15 temperatura, exposición a la luz, salinidad, nutrición, calidad del agua, disponibilidad de agua, aireación, calidad del suelo y otros factores que afectan el crecimiento de la planta objetivo.

 En una implementación, el sistema de acuerdo con la presente invención
20 comprende una cadena eficiente de producción, distribución y uso de productos basados en microbios. Los productos pueden comprender los microorganismos en si mismos, así como los subproductos de su crecimiento. En implementaciones preferidas, el sistema comprende instalaciones y equipos que promueven la producción, distribución y utilización de los productos basados en microbios. Estas
25 instalaciones pueden incluir, entre otras, instalaciones de producción, almacenamiento y distribución.

Como se usa en este documento, la referencia a una "composición a base de microbios" significa una composición que comprende componentes que se produjeron como resultado del crecimiento de microorganismos u otros cultivos celulares. Por lo tanto, la composición a base de microbios puede comprender los
5 propios microbios y/o subproductos del crecimiento microbiano. Los microbios pueden estar en estado vegetativo, en forma de esporas, en forma de micelio, en cualquier otra forma de propágulo, o en una mezcla de estos. Los microbios pueden ser planctónicos o en forma de biofilm, o una mezcla de ambos. Los subproductos del crecimiento pueden ser, por ejemplo, metabolitos, componentes de la membrana
10 celular, proteínas expresadas y/u otros componentes celulares. Los microbios pueden estar intactos o lisados. En implementaciones preferidas, los microbios están presentes, con el caldo en el que se cultivaron, en la composición a base de microbios. Las células pueden estar presentes en, por ejemplo, una concentración de 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} o 1×10^{11} o más
15 propágulos por mililitro de la composición. Como se usa en este documento, un propágulo es cualquier parte de un microorganismo a partir del cual se puede desarrollar un organismo nuevo y/o maduro, incluyendo, entre otros, células, esporas, micelios, brotes y semillas.

20 La presente invención proporciona además "productos basados en microbios", que son productos que deben aplicarse en la práctica para lograr un resultado deseado. El producto a base de microbios puede ser simplemente la composición a base de microbios recolectada del proceso de cultivo de microbios. Alternativamente, el producto a base de microbios puede comprender ingredientes
25 adicionales que se han añadido. Estos ingredientes adicionales pueden incluir, por ejemplo, estabilizadores, búfer, vehículos apropiados, como agua, soluciones salinas o cualquier otro vehículo apropiado, nutrientes agregados para apoyar el crecimiento microbiano adicional, potenciadores del crecimiento no nutritivos, como

hormonas vegetales y/o agentes que facilitan el seguimiento de los microbios y/o la composición en el entorno al que se aplica. El producto a base de microbios también puede comprender mezclas de composiciones basadas en microbios. El producto a base de microbios también puede comprender uno o más componentes de una
5 composición a base de microbios que se hayan procesado de alguna manera tal como, pero no limitado a, filtración, centrifugación, lisado, secado, purificación y similares.

De acuerdo con la presente invención, es posible producir, distribuir y aplicar
10 eficientemente productos basados en microbios que tengan características ventajosas para, por ejemplo, un cultivo particular en un momento particular de una temporada de crecimiento y en una ubicación particular. Por lo tanto, en una implementación, los sistemas de la presente invención proporcionan soluciones basadas en la ciencia que mejoran la productividad agrícola, por ejemplo,
15 promoviendo la vitalidad de los cultivos, mejorando la resistencia a insectos y enfermedades y promoviendo respuestas mejoradas al estrés hídrico, estrés salino, estrés por aireación o deficiencia nutricional.

Sistemas Distribuidos Para La Producción Y Uso De Productos Basados En 20 **Microbios**

La presente invención proporciona un sistema para suministrar microbios y/o productos basados en microbios para su aplicación en un entorno y/o entorno específico, en el que el sistema comprende:

25 (i) una instalación de crecimiento de microbios que comprende una pluralidad de recipientes de crecimiento modulares en los que se pueden cultivar microbios iguales, o diferentes, en las mismas o diferentes condiciones de crecimiento para producir una composición a base de microbios de cada recipiente de crecimiento,

en donde el medio de crecimiento, la oxigenación, el pH, la agitación y/o la temperatura se pueden controlar de forma independiente y/o conjunta para cada uno de dichos vasos de crecimiento; y en el que la composición a base de microbios se recolecta, creando así un producto a base de microbios que puede,
5 opcionalmente, tener componentes adicionales agregados para producir un producto a base de microbios que luego se puede proporcionar al consumidor; y

(ii) un componente de transporte para transportar dicho(s) producto(s) a base de microbio producido en la instalación de crecimiento de microbios, en donde dicho
10 componente de transporte comprende contenedores y/o conductos para transportar el(los) producto(s) a base de microbio desde la instalación de crecimiento de microbio a un centro de distribución o en una ubicación donde se utilizará el producto a base de microbios.

15 Como se usa en este documento, "recolectado" se refiere a eliminar una parte o la totalidad de la composición a base de microbios del recipiente de crecimiento. La Figura 1 es un diagrama de flujo que muestra los componentes de una implementación de la presente invención. Aunque los componentes se muestran en serie para facilitar su explicación, no hay una limitación secuencial implícita que no
20 sea la indicada en las reivindicaciones adjuntas. Además, algunos componentes pueden ser opcionales.

En una implementación, la presente invención proporciona sistemas para identificar y desarrollar cepas de microorganismos útiles para la agricultura; cultivar
25 tales microorganismos para producir localmente y en una escala deseada, composiciones basadas en microbios que tienen las características deseadas cuando se aplican a las plantas o a su entorno; poner a disposición de los consumidores productos basados en microbios de manera fácil y eficiente; y el uso

de dichos productos para promover la salud de las plantas, el rendimiento, la vitalidad y el atractivo del mercado.

En una implementación, el sistema para la producción y uso eficiente de microorganismos comprende: 1) identificar y/o desarrollar un microorganismo de interés; 2) generar una cepa del microorganismo fermentable y genéticamente estable; 3) cultivar una cepa específica del microorganismo en forma pura o con otros microorganismos; 4) distribuir los microorganismos y/o su subproducto de crecimiento a un cliente; 5) aplicar el microorganismo en su campo de uso.

El sistema de acuerdo con la presente invención puede comprender un aspecto responsable del desarrollo del producto que incluye, por ejemplo, el desarrollo, identificación y/o caracterización de microorganismos y/o metabolitos microbianos. El desarrollo del producto puede ser un laboratorio de investigación interno o una colaboración con otro centro de investigación. Los microorganismos pueden identificarse, desarrollarse, modificarse opcionalmente y probarse con respecto a sus diversas propiedades (e.g., las propiedades de control de plagas, la capacidad de producir un metabolito de interés, la capacidad de crecer en un entorno particular, los requisitos de nutrientes, etc.). El sistema de la presente invención también puede comprender un centro de innovación equipado y dotado de personal para satisfacer las necesidades distintas y variables de los consumidores en un área particular.

Los consumidores pueden ser, por ejemplo, agricultores, silvicultores, pastizales, productores ornamentales, administradores de césped, operaciones de minería y/o perforación, administradores de sitios ambientales, administradores de parques naturales y de otros sitios, operadores de tratamiento de desechos, corrales

de animales y otros animales u operaciones de acuicultura y sitios de biorremediación.

Instalaciones De Crecimiento De Microbios

5

En implementaciones preferidas de la presente invención, una instalación de crecimiento de microbios produce microorganismos frescos de alta densidad y/o subproductos de crecimiento microbiano de interés en una escala deseada. La instalación de crecimiento de microbios **6** puede estar ubicada en o cerca del sitio de aplicación. La instalación produce composiciones basadas en microbios de alta densidad en cultivo discontinuo, casi continuo o continuo.

Las instalaciones de crecimiento de microbios distribuidos de la presente invención pueden ubicarse en el lugar donde se utilizará el producto a base de microbios (e.g., granja, bosque, pasto, corrales de engorde, minería, tratamiento de desechos, parque, remediación o instalación acuícola) o cerca de la ubicación de uso. Por ejemplo, la instalación de crecimiento de microbios puede estar a menos de 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 15, 10, 5, 3 o 1 milla desde la ubicación de uso.

20

Debido a que el producto a base de microbios se genera localmente, sin recurrir a los procesos de estabilización, conservación, almacenamiento y transporte de microorganismos de la producción microbiana convencional, se puede generar una densidad mucho mayor de microbios vivos en un estado vegetativo, de espora y/o micelial, por lo que requiere un volumen menor del producto a base de microbios para uso en la aplicación en el sitio o que permita aplicaciones microbianas de densidad mucho más alta donde sea necesario para lograr la eficacia deseada. Esto permite que el sistema sea eficiente para un biorreactor de

pequeña escala (e.g., un tanque de fermentación más pequeño, suministros más pequeños de material iniciador, nutrientes, agentes de control de pH y agentes antiespumantes). La generación local del producto a base de microbios también facilita la inclusión del caldo de crecimiento en el producto. El caldo puede contener

5 agentes producidos durante la fermentación que son particularmente adecuados para el uso local.

Los cultivos robustos de microbios de alta densidad producidos localmente son más efectivos en el campo que aquellos que se han sometido a una estabilización

10 celular vegetativa, que han sido esporulados o se han sentado en la cadena de suministro durante algún tiempo. Los productos basados en microbios de la presente invención son particularmente ventajosos en comparación con los productos tradicionales en los que las células, las esporas o los micelios se han separado de los metabolitos y nutrientes presentes en los medios de crecimiento de

15 fermentación. Los tiempos de transporte reducidos permiten la producción y entrega de lotes frescos de microbios y/o sus metabolitos en el momento y el volumen, según lo requiera la demanda local.

En implementaciones preferidas, la instalación **6** alberga sistemas de

20 producción que son de diseño modular y que permiten una escalada rápida e ilimitada de manera rentable. Además, las instalaciones de crecimiento de microbios apoyan la producción de múltiples cepas de microbios para satisfacer las diversas y cambiantes necesidades de los clientes geográficamente cerca de las instalaciones de producción.

25 En una única instalación de crecimiento de microbios (e.g., un edificio) puede haber, por ejemplo, 2, 5, 10, 20, 50, 75 o 100 o más vasos de crecimiento microbiano. Los recipientes pueden ser de diferentes volúmenes y utilizar diferentes medios de crecimiento y condiciones y principios de crecimiento. Los vasos de

crecimiento se pueden agregar o quitar según sea necesario. Se pueden mover a una nueva ubicación. Preferiblemente, cada vaso de crecimiento tiene sus propios controles y sistemas de medición para al menos temperatura y pH. Además de monitorear y controlar la temperatura y el pH, cada recipiente también puede
5 opcionalmente tener la capacidad de monitorear y controlar, por ejemplo, el oxígeno disuelto, la agitación, la formación de espuma, la pureza de los cultivos microbianos, la producción de metabolitos deseados y similares.

En una implementación, un solo tipo de microbio se cultiva en un recipiente.
10 En implementaciones alternativas, múltiples microbios, que pueden crecer juntos sin efectos perjudiciales sobre el crecimiento o el producto resultante, pueden crecer en un solo recipiente. Puede haber, por ejemplo, 2 a 3 o más microbios diferentes cultivados en un solo recipiente al mismo tiempo.

15 El vaso de crecimiento puede ser, por ejemplo, de 5 litros a 2,000 litros o más. Típicamente, los recipientes serán de 10 a 1,500 litros y preferiblemente son de 100 a 1,000 litros y más preferiblemente de 250 a 750 litros, o de 400 a 600 litros. Se puede utilizar una variedad de sistemas de crecimiento dentro de estos vasos de crecimiento.

20

Estos recipientes pueden estar, por ejemplo, hechos de vidrio, polímeros, metales, aleaciones metálicas y combinaciones de estos. Antes del crecimiento de microbios, el recipiente se puede desinfectar o esterilizar.

25 Ventajosamente, el uso de múltiples recipientes de crecimiento independientes tiene la ventaja de un daño limitado y una pérdida económica si uno de los recipientes de crecimiento tiene un problema mecánico y/o uno de los lotes se deteriora.

El tiempo de cultivo para los vasos individuales puede ser, por ejemplo, de 1 a 7 días o más. El producto de cultivo se puede cosechar de varias formas diferentes.

5 Debido a que el producto a base de microbios se genera en el sitio o cerca del sitio de aplicación, sin el requisito de estabilización, conservación, almacenamiento prolongado y procesos extensos de transporte de producción convencional, se puede generar una densidad mucho mayor de microorganismos vivos, lo que requiere un volumen mucho más pequeño del producto a base de microbios para
10 uso en una aplicación en el sitio. Esto permite un biorreactor de pequeña escala (e.g., un tanque de fermentación más pequeño, suministros más pequeños de material iniciador, nutrientes, agentes de control de pH y agentes antiespumantes, etc.), no hay razón para estabilizar las células o separarlas de su caldo de cultivo y facilita la portabilidad del producto.

15

Las instalaciones de crecimiento de microbios brindan versatilidad en la fabricación gracias a la capacidad de adaptar los productos basados en microbios para mejorar las sinergias con las geografías de destino, independientemente de la topografía, el tipo de cultivo o animal, el perfil del suelo, el clima, las plagas, etc. Por
20 ejemplo, los tiempos de fermentación varían típicamente entre desde uno a seis días, lo que facilita una respuesta rápida a los problemas "de temporada" que amenazan los cultivos.

La producción de múltiples cepas de microbios en las instalaciones de
25 crecimiento microbiano de la presente invención facilita el suministro de una amplia cartera de productos a los consumidores. El sistema puede proporcionar microbios personalizados para las necesidades y las condiciones actuales de esa ubicación y trabajo.

La producción local y la entrega dentro de, por ejemplo, 24 horas de fermentación dan como resultado composiciones puras de alta densidad celular y costos de envío sustancialmente más bajos. Dadas las perspectivas de un rápido
5 avance en el desarrollo de inoculantes microbianos más efectivos y potentes, los consumidores se beneficiarán enormemente de esta capacidad de entregar rápidamente innovaciones capaces de reforzar los rendimientos y mejorar el rendimiento de los microbios. En el caso de la agricultura, esto puede llevar a mejorar la calidad de, por ejemplo, cultivos de alto valor, césped manejado y plantas
10 ornamentales.

Métodos para la producción de microorganismos

La presente invención proporciona métodos para el cultivo de
15 microorganismos y la producción de metabolitos microbianos y/u otros subproductos del crecimiento microbiano. La presente invención proporciona además procesos de cultivo que son adecuados para el cultivo de microorganismos y la producción de metabolitos microbianos a una escala deseada. Estos procesos de cultivo incluyen, pero no se limitan a, cultivo/fermentación sumergidos, cultivo en
20 superficie, fermentación en estado sólido (SSF) y/o combinaciones de estos y pueden llevarse a cabo como procesos aeróbicos o anaeróbicos.

En una implementación, la presente invención proporciona materiales y métodos para la producción de biomasa (e.g., material celular viable), metabolitos
25 extracelulares (e.g., moléculas pequeñas y proteínas excretadas), nutrientes residuales y/o componentes intracelulares (e.g., enzimas y otras proteínas).

Los sistemas de cultivo microbiano típicamente usarían fermentación de cultivo sumergido; sin embargo, también se pueden utilizar sistemas de cultivo de superficie e híbridos. Como se usa en este documento, "fermentación" se refiere al crecimiento de células en condiciones controladas. El crecimiento podría ser
5 aeróbico o anaeróbico.

El recipiente de crecimiento microbiano utilizado de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier fermentador o reactor de cultivo para uso industrial. El proceso de cultivo se lleva a cabo en un recipiente que puede ser, por ejemplo,
10 cónico o tubular. En una implementación, el recipiente puede tener opcionalmente controles/sensores funcionales u opcionalmente puede estar conectado a controles/sensores funcionales para medir factores importantes en el proceso de cultivo, tales como el pH, Oxígeno, presión, temperatura, potencia del eje del agitador, humedad, viscosidad y/o densidad microbiana y/o concentración de
15 metabolitos. En algunas implementaciones, el cultivo puede proceder sin estabilización o control de las condiciones de fermentación.

En una implementación adicional, el vaso también puede controlar el crecimiento de microorganismos dentro del vaso (e.g., la medición del número de
20 células y las fases de crecimiento). Alternativamente, se puede tomar una muestra diaria del recipiente y someter a enumeración mediante técnicas conocidas en el arte, como la técnica de recubrimiento por dilución. El recubrimiento por dilución es una técnica simple que se utiliza para estimar el número de bacterias en una muestra. La técnica también puede proporcionar un índice mediante el cual se
25 pueden comparar diferentes entornos o tratamientos.

En una implementación, el método incluye complementar el cultivo con una fuente de nitrógeno. La fuente de nitrógeno puede ser, por ejemplo, nitrato de

potasio, nitrato de amonio, sulfato de amonio, fosfato de amonio, amoníaco, urea y/o cloruro de amonio. Estas fuentes de nitrógeno se pueden usar independientemente o en una combinación de dos o más.

5 El método puede proporcionar oxigenación al cultivo en crecimiento. Una implementación utiliza el movimiento lento del aire para eliminar el aire que contiene poco oxígeno e introducir aire oxigenado. El aire oxigenado se puede complementar diariamente con aire ambiente mediante mecanismos que incluyen impulsores para la agitación mecánica del líquido y rociadores de aire para suministrar burbujas de
10 gas al líquido para la disolución del oxígeno en el líquido.

El método puede comprender además complementar el cultivo con una fuente de carbono. La fuente de carbono es típicamente un carbohidrato, tal como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, trehalosa, manosa, manitol y/o maltosa; ácidos
15 orgánicos tales como ácido acético, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido propiónico, ácido málico, ácido malónico y/o ácido pirúvico; alcoholes tales como etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, isobutanol y/o glicerol; grasas y aceites tales como aceite de soya, aceite de salvado de arroz, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de sésamo y/o aceite de linaza; etc. Estas fuentes de carbono se pueden
20 usar independientemente o en una combinación de dos o más.

En una implementación, los factores de crecimiento y nutrientes traza para microorganismos están incluidos en el medio. Esto es particularmente preferido cuando se cultivan microbios que son incapaces de producir todas las vitaminas que
25 requieren. Los nutrientes inorgánicos, incluidos los oligoelementos como el hierro, zinc, cobre, manganeso, molibdeno y/o cobalto también se pueden incluir en el medio.

En una implementación, también se pueden incluir sales inorgánicas. Las sales inorgánicas utilizables pueden ser dihidrógeno fosfato de potasio, fosfato de hidrógeno dipotásico, fosfato de hidrógeno disódico, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, sulfato de hierro, cloruro de hierro, sulfato de manganeso, cloruro de manganeso, sulfato de zinc, cloruro de plomo, sulfato de cobre, cloruro de calcio, 5 carbonato de calcio y/o carbonato de sodio. Estas sales inorgánicas se pueden usar independientemente o en una combinación de dos o más.

En algunas implementaciones, el método para el cultivo puede comprender 10 además añadir ácidos y/o antimicrobianos adicionales en el medio líquido antes y/o durante el proceso de cultivo. Los agentes antimicrobianos o antibióticos se utilizan para proteger el cultivo contra la contaminación. Además, también se pueden agregar agentes antiespumantes para prevenir la formación y/o acumulación de espuma cuando se produce gas durante el cultivo.

15 El pH de la mezcla debe ser adecuado para el microorganismo de interés. Se pueden usar búfer y reguladores de pH, como carbonatos y fosfatos, para estabilizar el pH cerca de un valor preferido. Cuando los iones metálicos están presentes en altas concentraciones, puede ser necesario el uso de un agente quelante en el 20 medio líquido.

El método y el equipo para el cultivo de microorganismos y la producción de los subproductos microbianos se pueden realizar en procesos por lotes, casi 25 continuos o continuos.

Los microbios se pueden cultivar en forma planctónica o como biopelícula. En el caso de la biopelícula, el recipiente puede tener dentro un sustrato sobre el cual los microbios pueden crecer en un estado de biopelícula. El sistema también puede

tener, por ejemplo, la capacidad de aplicar estímulos (como el esfuerzo de cizallamiento) que estimula y/o mejora las características de crecimiento de la biopelícula.

5 En una implementación, el método para el cultivo de microorganismos se lleva a cabo desde aproximadamente 5° hasta aproximadamente 100°C, preferiblemente, 15 a 60°C, más preferiblemente, 25 a 50°C. En una implementación adicional, el cultivo puede llevarse a cabo continuamente a una temperatura constante. En otra implementación, el cultivo puede estar sujeto a temperaturas cambiantes.

10

 En una implementación, el equipo utilizado en el método y el proceso de cultivo es estéril. El equipo de cultivo tal como el reactor/recipiente puede estar separado de, pero conectado a, una unidad de esterilización, e.g., una autoclave. El equipo de cultivo también puede tener una unidad de esterilización que esteriliza *in situ*
15 antes de comenzar la inoculación. El aire puede ser esterilizado por métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, el aire ambiente puede pasar a través de al menos un filtro antes de introducirse en el recipiente. En otras implementaciones, el medio se puede pasteurizar u, opcionalmente, no se puede añadir calor, en el que se puede aprovechar el uso de una actividad de agua baja y un pH bajo para
20 controlar el crecimiento bacteriano.

 En una implementación, la presente invención proporciona además un método para producir metabolitos microbianos tales como proteínas, péptidos, intermedios metabólicos, ácidos grasos poliinsaturados y lípidos. El contenido de metabolito producido por el método puede ser, por ejemplo, al menos 20%, 30%, 40%, 50%,
25 60%, 70%, 80% o 90%.

El contenido de biomasa del caldo de fermentación puede ser, por ejemplo, de 5 g/l a 180 g/l o más. En una implementación, el contenido de sólidos del caldo es de 10 g/l a 150 g/l.

5 En una implementación, el método para producir un metabolito microbiano según la presente invención comprende las etapas de: 1) mezclar partículas hidrófobas e hidrófilas para formar una sustancia sólida formadora de matriz; 2) poner en contacto dicha sustancia sólida formadora de matriz con un medio inoculado con un microorganismo de interés, creando así una matriz de micro
10 reactores; 3) cultivar dicho microorganismo dentro de dichos microreactores; y 4) recoger dicho metabolito producido por dicho microorganismo.

El subproducto de crecimiento microbiano producido por microorganismos de interés puede retenerse en los microorganismos o secretarse en el medio líquido.
15 En otra implementación, el método para producir subproducto de crecimiento microbiano puede comprender además etapas de concentración y purificación del subproducto de crecimiento microbiano de interés. En una implementación adicional, el medio líquido puede contener compuestos que estabilizan la actividad del subproducto de crecimiento microbiano.

20

En una implementación, toda la composición de cultivo microbiana se elimina al completar el cultivo (e.g., al lograr, por ejemplo, una densidad celular deseada, o densidad de un metabolito específico en el caldo). En este procedimiento de lote, se inicia un lote completamente nuevo después de la recolección del primer lote.

25

En otra implementación, solo una parte del producto de fermentación se elimina en un momento dado. En esta implementación, la biomasa con células viables permanece en el recipiente como inoculante para un nuevo lote de cultivo.

La composición que se elimina puede ser un caldo libre de células o contener células. De esta manera, se crea un sistema casi continuo.

Preparación de productos basados en microbios

5

Un producto a base de microbios de la presente invención es simplemente el caldo de fermentación que contiene el microorganismo y/o los metabolitos microbianos producidos por el microorganismo y/o cualquier nutriente residual. El producto de la fermentación se puede utilizar directamente sin extracción ni purificación. Si se desea, la extracción y la purificación se pueden lograr fácilmente utilizando métodos de extracción estándar o técnicas descritas en la literatura.

Los microorganismos en el producto a base de microbios pueden estar en forma activa o inactiva. Los productos basados en microbios pueden usarse sin más estabilización, conservación y almacenamiento. Ventajosamente, el uso directo de estos productos basados en microbios preserva una alta viabilidad de los microorganismos, reducen la posibilidad de contaminación por agentes extraños y microorganismos indeseables y mantienen la actividad de los subproductos del crecimiento microbiano.

20

Los microbios y/o el caldo resultante del crecimiento microbiano pueden retirarse del recipiente de crecimiento y transferirse a través de, por ejemplo, tuberías para uso inmediato.

25

En otras implementaciones, la composición (microbios, caldos o microbios y caldos) se puede colocar en recipientes del tamaño apropiado, teniendo en cuenta, por ejemplo, el uso previsto, el método de aplicación contemplado, el tamaño del tanque de fermentación y cualquier modo de transporte desde la instalación de

crecimiento de microbios a la ubicación de uso. Por lo tanto, los contenedores en los que se coloca la composición a base de microbios pueden ser, por ejemplo, de 1 galón a 1,000 galones o más. En otras implementaciones, los contenedores son de 2 galones, 5 galones, 25 galones o más.

5

Tras la recolección de la composición a base de microbios de los recipientes de crecimiento, se pueden agregar componentes adicionales a medida que el producto cosechado se coloca en contenedores y/o se canaliza (o se transporta para uso). Los aditivos pueden ser, por ejemplo, búfer, vehículos, otras composiciones basadas en microbios producidos en la misma o diferente instalación, modificadores de la viscosidad, conservantes, nutrientes para el crecimiento de microbios, nutrientes para el crecimiento de las plantas, agentes de rastreo, pesticidas, herbicidas, alimentos para animales, productos alimenticios y otros ingredientes específicos para un uso previsto.

15

Ventajosamente, de acuerdo con la presente invención, el producto a base de microbios puede comprender caldo en el que se cultivaron los microbios. El producto puede ser, por ejemplo, al menos, en peso, 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% o 100% de caldo. La cantidad de biomasa en el producto, en peso, puede ser, por ejemplo, entre el 0% y el 100%, incluidos todos los porcentajes entre ellos.

20

Opcionalmente, el producto puede ser almacenado antes de su uso. El tiempo de almacenamiento es preferiblemente corto. Por lo tanto, el tiempo de almacenamiento puede ser inferior a 60 días, 45 días, 30 días, 20 días, 15 días, 10 días, 7 días, 5 días, 3 días, 2 días, 1 día o 12 horas. En una implementación preferida, si hay células vivas en el producto, el producto se almacena a una temperatura fresca como, por ejemplo, menos de 20°C, 15°C, 10°C o 5°C. Por otra parte, una composición de biosurfactante se puede almacenar típicamente a temperaturas ambiente.

25

Los productos de la presente invención a base de microbios pueden ser, por ejemplo, inoculantes microbianos, bioplaguicidas, fuentes de nutrientes, agentes de remediación, productos para la salud y/o biosurfactantes.

5

Distribución de productos basados en microbios

El sistema comprende opcionalmente un aspecto para distribuir el producto a base de microbios. En una implementación, este aspecto incluye un centro de distribución **3** que puede comprender opcionalmente un centro de inventario **4**. El centro de inventario **4** puede ser responsable de almacenar y distribuir aún más los productos a base de microbios. El centro de inventario puede proporcionar asistencia al cliente, por ejemplo, consultar con los clientes sobre inóculos de microorganismos entregados y disponibles.

15

En una implementación, el centro de distribución **3** puede proporcionar servicios relacionados con la venta, almacenamiento y transporte de los productos a base de microbios. El centro de distribución **3** también puede proporcionar soporte mecánico y técnico.

20

Aplicación de productos a base de microbios

En otro aspecto más, los métodos y sistemas de la presente invención pueden incluir métodos, sistemas y dispositivos para aplicar los productos a base de microbios.

25

En el caso de la agricultura, las composiciones pueden introducirse, por ejemplo, en un sistema de irrigación, pulverizarse desde una mochila o dispositivos

similares, aplicarse mediante un dispositivo robótico terrestre o aéreo, como un dron y/o aplicarse con una semilla. La aplicación de semillas puede ser, por ejemplo, mediante un recubrimiento de semillas o aplicando la composición al suelo simultáneamente con la siembra de semillas. Esto puede automatizarse, por ejemplo, proporcionando un dispositivo o un sistema de irrigación que aplique la composición a base de microbios junto con y/o adyacente a, semillas en el momento de la siembra o cerca de ellas. Por lo tanto, la composición a base de microbios puede aplicarse, por ejemplo, 5, 4, 3, 2 o 1 día antes o después del momento de la siembra o simultáneamente con la siembra de las semillas.

10

En algunas implementaciones agrícolas, las composiciones proporcionadas en este documento ya sea en una formulación seca o líquida, se aplican como un tratamiento de semillas o a la superficie del suelo, a la superficie de una planta y/o a la superficie de una plaga o maleza.

15

En ciertas implementaciones, las composiciones proporcionadas en este documento se aplican a la superficie del suelo sin incorporación mecánica. El efecto beneficioso de la aplicación en el suelo se puede activar por medio de la lluvia, el riego por aspersión, la inundación o la irrigación por goteo y luego se puede aplicar a, por ejemplo, plagas específicas para llevar sus niveles de población a umbrales aceptables o a las raíces de las plantas para influenciar el microbioma de la raíz o facilitar la captación del producto microbiano en el sistema vascular del cultivo o planta al que se aplica el producto microbiano. En una implementación de ejemplo, las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden aplicarse eficientemente a través de un sistema de irrigación de pivote central o con un rocío sobre el surco de la semilla.

20

25

La referencia en este documento a la administración de la composición "en o cerca de" una plaga o una planta, o al "entorno" de una plaga o planta, significa que la administración es tal que la composición está suficientemente en contacto con la plaga o planta de tal manera que se logra el resultado deseado (e.g., matar la plaga, 5 aumentar el rendimiento, prevenir daños a la planta, regular genes y/u hormonas, etc.). Esto puede ser típicamente dentro, por ejemplo. 10, 5, 3, 2 o 1 pie o menos, de la plaga, planta, maleza u otro objetivo deseado.

El producto a base de microbios también se puede aplicar para promover la 10 colonización de las raíces y/o rizosfera, así como el sistema vascular de la planta para promover la salud y vitalidad de la planta. Por lo tanto, los microbios que fijan nutrientes como el rizohium y/o micorrizas se pueden promover, así como otros endógenos (ya presentes en el suelo), así como exógenos, microbios o sus derivados, que combaten plagas, malezas o enfermedades, o que de otra manera 15 promueven el crecimiento, la salud y/o el rendimiento de los cultivos. El producto a base de microbios también puede soportar el sistema vascular de una planta, por ejemplo, ingresando y colonizando dicho sistema vascular y contribuyendo con los metabolitos y nutrientes importantes para la salud y productividad de las plantas o metabolitos con propiedades de control de plagas.

20 Ventajosamente, el método no requiere equipos complicados o un alto consumo de energía. Los microorganismos de interés pueden cultivarse en pequeña o gran escala en el sitio y utilizarse, incluso siendo mezclados con sus medios. De manera similar, los metabolitos microbianos también pueden producirse en grandes 25 cantidades en el sitio de necesidad.

Ventajosamente, los productos a base de microbios pueden producirse en ubicaciones remotas. En una implementación, los productos a base de microbios

pueden usarse para nutrición humana y/o prevención y/o tratamiento de enfermedades. Las instalaciones de crecimiento de microbios pueden operar fuera de la red utilizando, por ejemplo, energía solar, eólica y/o hidroeléctrica.

5 Los productos a base de microbios pueden aplicarse directamente a los desechos animales y/o usarse en una planta de tratamiento de desechos. Los productos a base de microbios también pueden aplicarse directamente a la contaminación ambiental, como un derrame de petróleo o un sitio de desechos peligrosos. Los productos a base de microbios también se pueden aplicar a los
10 minerales para recuperar metales, minerales u otras sustancias de interés. Los productos a base de microbios también pueden inyectarse en pozos de petróleo y/o en tuberías, tanques y otros equipos asociados con pozos de petróleo y/o procesamiento de petróleo. Por lo tanto, el campo de uso incluye plataformas petroleras, instalaciones de almacenamiento de petróleo, tuberías de transmisión,
15 buques petroleros y refinerías.

Inoculantes microbianos

En una implementación, el producto a base de microbios es un inoculante
20 microbiano. Cuando se aplica, por ejemplo, a semillas, plantas o suelos de cultivos en hileras, operaciones forestales, pastizales administrados, cultivos hortícolas, césped manejado, desechos animales y/o piensos para animales, el inoculante se convierte en parte integral de la propiedad del suelo huésped o el medio huésped y promueve el crecimiento saludable de los microorganismos autóctonos beneficiosos
25 que benefician ese suelo o medio o las plantas y animales que crecen, se alimentan o están expuestos a estos suelos y medios. Una vez aplicados al suelo, los inoculantes microbianos de la presente invención mejoran la mineralización de la materia orgánica, aumentan la fijación de nitrógeno necesaria para la fotosíntesis,

aumentan la disponibilidad de fósforo en los cultivos al tiempo que limitan su lixiviación ambiental, producen metabolitos beneficiosos para la señalización de las plantas, estimulan la masa de la raíz y facilitan la absorción de agua y nutrientes clave, mejoran la fertilidad del suelo y/o aumentan la biomasa.

5

En una implementación, los inoculantes pueden personalizarse por cultivo o geografía para facilitar la colonización robusta de microorganismos benéficos, lo que hace que esta tecnología sea ideal para el manejo proactivo de cultivos específicos en ecosistemas de suelo muy diferentes. La capacidad de personalizar los microbianos para satisfacer las necesidades de los diferentes ecosistemas del suelo se vuelven aún más importantes a medida que se desarrolla una mejor comprensión de cómo las comunidades microbianas complejas reaccionan a temperaturas extremas, sequías prolongadas, lluvias variables y otros impactos derivados del cambio climático y la agricultura intensiva.

15

Debido a la alta densidad de células vegetativas, esporas, micelios y/u otros propágulos microbianos, en ciertas implementaciones de la presente invención, los productos a base de microbios de la presente invención son ventajosamente únicos en su capacidad para colonizar un entorno, tal como el suelo, e interactuar de manera favorable con la microflora existente. Debido a los excepcionales recuentos de células, esporas y/o micelios, los productos a base de microbios de la presente invención hacen posible la supervivencia prolongada de los microbios en el suelo (u otro entorno relevante). Esta supervivencia puede mejorarse y extenderse aún más, por ejemplo, proporcionando nutrientes a los microbios.

25

En una implementación de la presente invención, la supervivencia y retención de los microbios se controla mediante el seguimiento y/o cuantificación de los microbios y/o su movimiento en el suelo u otro entorno.

Agentes de Biocontrol

En otra implementación, el producto a base de microbios es un agente de control biológico. En comparación con los pesticidas químicos sintéticos convencionales que pueden contaminar el medio ambiente y afectar adversamente a plantas y animales no objetivo, los bioplaguicidas no son tóxicos, son seguros de usar y pueden tener una alta especificidad. Los bioplaguicidas, que se utilizan mejor como herramienta preventiva en lugar de curativa para controlar malezas, enfermedades, nematodos e insectos y otras plagas, permiten a los agricultores reducir su tradicional dependencia de pesticidas y herbicidas de base química sin afectar el rendimiento de los cultivos. Los bioplaguicidas ayudan a crear un ambiente donde las plagas son incapaces de afianzarse y prosperar, lo que es un beneficio crítico dada la proliferación de plagas agrícolas relacionadas con el clima extremo. El uso de bioplaguicidas también permite a los agricultores reducir la contaminación del suelo para los cultivos rotatorios, la toxicidad para plantas y animales no objetivo, la toxicidad en los cultivos, el desarrollo de resistencia a los pesticidas y la escorrentía y la lixiviación en áreas ambientalmente sensibles, suministros de agua, etc., y otras consecuencias del uso de pesticidas químicos.

20

La resistencia a los pesticidas de base química es una preocupación importante ya que las plagas e insectos resistentes amenazan la productividad agrícola y son costosos de combatir una vez que se desarrolla la resistencia.

25 Enmiendas del suelo

En una implementación, el producto a base de microbios es una enmienda del suelo para uso en mejorar la salud, el crecimiento y el rendimiento de plantas y/o

cultivos en, por ejemplo, agricultura, horticultura, invernaderos, paisajismo y similares. La presente invención también se puede usar para mejorar una o más cualidades del suelo, mejorando así el rendimiento de los suelos para fines agrícolas, domésticos y de jardinería.

5

Como se usa en este documento, "mejorar" significa mejorar o aumentar. Por ejemplo, mejorar la salud de la planta significa mejorar la capacidad de la planta para crecer y prosperar, incluida la capacidad de la planta para protegerse de plagas y/o enfermedades y la capacidad de la planta para sobrevivir a las sequías y/o el riego excesivo. El crecimiento mejorado de la planta significa aumentar el tamaño y/o la masa de una planta, o mejorar la capacidad de la planta para alcanzar un tamaño y/o masa deseados. Los rendimientos mejorados significan mejorar los productos finales producidos por las plantas en un cultivo, por ejemplo, aumentando el número de frutas por planta, aumentando el tamaño de las frutas y/o mejorando la calidad de las frutas (e.g., sabor, textura).

Como se usa en este documento, una "enmienda del suelo" o un "acondicionador del suelo" es cualquier compuesto, material o combinación de compuestos o materiales que se agregan al suelo para mejorar las propiedades físicas del suelo. Las enmiendas del suelo pueden incluir materia orgánica e inorgánica y pueden incluir, por ejemplo, fertilizantes, pesticidas y/o herbicidas. El suelo rico en nutrientes y con buen drenaje es esencial para el crecimiento y la salud de las plantas y, por lo tanto, las enmiendas del suelo se pueden usar para mejorar el crecimiento y la salud de las plantas al alterar el contenido de nutrientes y humedad del suelo. Las enmiendas del suelo también se pueden usar para mejorar muchas calidades diferentes del suelo, incluida, entre otras, la estructura del suelo (e.g., la prevención de la compactación); mejorar la concentración de nutrientes y

las capacidades de almacenamiento; mejorando la retención de agua en suelos secos; y mejoramiento del drenaje en suelos inundados.

En implementaciones preferidas, los métodos en cuestión comprenden la aplicación de un producto a base de microbios, i.e., una enmienda del suelo a base de microbios, al suelo en el que una planta o cultivo crece o será plantado. El producto a base de microbios puede comprender un microorganismo y/o un subproducto de crecimiento del microorganismo. En implementaciones preferidas, el subproducto de crecimiento es un biosurfactante saporolípido.

En algunas implementaciones agrícolas, las composiciones proporcionadas en este documento ya sea en forma seca o en formulación líquida, se aplican como un tratamiento de semillas o en la superficie del suelo, o en la superficie de una planta (e.g., en la superficie de la raíz de la planta).

En ciertas implementaciones, las composiciones proporcionadas en este documento se aplican a la superficie del suelo sin incorporación mecánica. El efecto beneficioso de la aplicación en el suelo se puede activar por medio de la lluvia, el riego por aspersión, la inundación o la irrigación por goteo y luego aplicarse a, por ejemplo, las raíces de las plantas para influir en el microbioma de la raíz o facilitar la captación del producto microbiano en el sistema vascular del cultivo o planta a la que se aplica el producto microbiano. En una implementación de ejemplo, las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden aplicarse eficientemente a través de un sistema de irrigación de pivote central o con un rocío sobre el surco de la semilla.

El producto a base de microbios también se puede aplicar para promover la colonización de las raíces y/o rizosfera, así como el sistema vascular de la planta

para promover la salud y vitalidad de la planta. Por lo tanto, los microbios que fijan nutrientes como el rizohium y/o micorrizas se pueden promover, así como otros endógenos (ya presentes en el suelo), así como exógenos, microbios, o sus subproductos que promueven el crecimiento, la salud y/o el rendimiento de los cultivos. El producto a base de microbios también puede soportar el sistema vascular de una planta, por ejemplo, ingresando y colonizando dicho sistema vascular y contribuyendo con los metabolitos y nutrientes importantes para la salud y la productividad de la planta.

Los suelos pueden tratarse en cualquier momento durante el proceso de cultivo de la planta. Por ejemplo, el producto a base de microbios puede aplicarse al suelo antes de la siembra de semillas en él, o en cualquier momento posterior durante el desarrollo y crecimiento de la planta o plantas.

En algunas implementaciones, el método comprende poner en contacto el suelo con el microorganismo en combinación con los biosurfactantes que produce. Los microbios pueden ser, bien sea, vivos (o viables) o inactivos en el momento de la aplicación. Los métodos pueden comprender además la adición de materiales para mejorar el crecimiento de los microbios durante la aplicación (e.g., agregar nutrientes para promover el crecimiento microbiano). En una implementación, las fuentes de nutrientes pueden incluir, por ejemplo, nitrógeno, nitrato, fósforo, magnesio y/o carbono.

En otras implementaciones, el método comprende simplemente aplicar biosurfactantes al suelo sin los microbios.

En una implementación, el método comprende aplicar un producto a base de microbios que comprende la levadura *Starmerella bombicola* y/o sus subproductos

de crecimiento al suelo, en donde la composición permite una mejor absorción de agua y/o nutrientes del suelo. En una implementación, el microorganismo del producto a base de microbios es *Wickerhamomyces anomalus*. En otra implementación más, el producto a base de microbios comprende SLP sin el microorganismo. Ventajosamente, los métodos mejoran la salud de las plantas, el crecimiento y/o los rendimientos sin el uso de productos químicos agresivos.

La presente invención se puede usar para mejorar cualquier número de cualidades en cualquier tipo de suelo, por ejemplo, arcilloso, arenoso, terroso, turboso, calizo, gredoso y/o combinaciones de estos. Además, los métodos y composiciones se pueden usar para mejorar la calidad de suelos compactos, empapados en agua, porosos, empobrecidos, compactados y/o combinaciones de estos.

En una implementación, el método puede usarse para mejorar el drenaje y/o la dispersión de agua en suelos empapados. En una implementación, el método puede usarse para mejorar la retención de agua en el suelo seco.

En una implementación, el método puede usarse para mejorar la retención de nutrientes en suelos porosos y/o agotados.

20

Los productos a base de microbios se pueden usar solos o en combinación con otros compuestos para mejorar de manera eficiente la salud, el crecimiento y/o los rendimientos de las plantas. Por ejemplo, los fertilizantes comerciales, los fertilizantes naturales, los pesticidas, los herbicidas y/u otras enmiendas del suelo se pueden aplicar junto con el producto a base de microbios. En ciertas implementaciones, los productos a base de microbios se pueden usar para garantizar la efectividad de los otros compuestos, por ejemplo, promoviendo la

retención del compuesto en el suelo, o permitiendo una dispersión más uniforme del compuesto en todo el suelo.

En otras aplicaciones, los atributos de suelo deseados se pueden obtener
5 mezclando una variedad de materiales en el suelo, incluyendo, por ejemplo, harina de huesos, alfalfa, gluten de maíz, potasa y/o estiércol de una variedad de animales, incluyendo caballos, vacas, cerdos, pollos, murciélagos, ovejas. Otros elementos adicionales que se pueden agregar incluyen, entre otros, nutrientes minerales como magnesio, fosfato, nitrógeno, potasio, selenio, calcio, azufre, hierro, cobre y zinc.
10 Los materiales exactos y las cantidades de estos pueden ser determinados por un científico del suelo.

Biosurfactantes

15 En una implementación, el producto a base de microbios comprende un biosurfactante. Los biosurfactantes microbianos son compuestos producidos por una variedad de microorganismos, como bacterias, hongos y levaduras. Los biosurfactantes forman una importante clase de metabolitos secundarios que se producen en muchos microorganismos como la especie *Starmerella*, la especie
20 *Pichia*, la especie *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. syringae*); *Flavobacterium* spp.; *Bacillus* spp. (*B. subtilis*, *B. pumillus*, *B. cereus*, *B. licheniformis*); Especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. lipolytica*, *C. torulopsis*); *Rhodococcus* sp.; *Arthrobacter* spp.; *Campylobacter* spp.; *cornyobacterium* spp. y similares. Los biosurfactantes microbianos seguros y
25 efectivos reducen las tensiones superficiales e interfaciales entre las moléculas de líquidos, sólidos y gases. Esta dinámica se puede usar para facilitar la salud de las plantas, aumentar los rendimientos, administrar la aireación del suelo y utilizar responsablemente los recursos de agua de riego disponibles.

Por lo tanto, en una implementación, el producto a base de microbios mejora la salud y la productividad de las plantas que sufren estrés hídrico.

5 Los biosurfactantes son únicos porque se producen a través de la fermentación microbiana, pero tienen aquellas propiedades que poseen los surfactantes químicos además de otros atributos que no poseen sus análogos sintéticos. Los biosurfactantes disminuyen la tendencia del agua a "acumularse", mejoran la "adherencia" o "humectabilidad" de las superficies, lo que resulta en una
10 hidratación más completa de la rizosfera y reducen el volumen de agua que de otra manera podría "escapar" debajo de la zona de la raíz través de micro-canales formados por sistemas de goteo y micro-riego. Esta "humectabilidad" también promueve una mejor salud del sistema radicular ya que hay menos zonas de desecación (o sequedad extrema) que inhiben el crecimiento adecuado de las
15 raíces y una mejor disponibilidad de los nutrientes aplicados ya que los químicos y los micronutrientes se ponen a disposición y se distribuyen más a fondo.

La distribución más uniforme del agua en la rizosfera del cultivo posibilitada por la "humectabilidad" mejorada también evita que el agua se acumule o quede
20 "atrapada" por encima de los niveles óptimos de penetración, lo que mitiga las condiciones anaeróbicas que inhiben el libre intercambio de oxígeno y carbono.

Una vez que se aplica un biosurfactante eficaz, se establece una rizosfera más porosa o "respirable" y las raíces tendrán una mayor resistencia a las enfermedades
25 transmitidas por el suelo. La combinación de una rizosfera adecuadamente hidratada y aireada también aumenta la susceptibilidad de las plagas y patógenos del suelo (como los nematodos y los hongos del suelo y sus esporas) a los

pesticidas químicos y bioplaguicidas. Los biosurfactantes se pueden usar para una amplia gama de aplicaciones útiles que incluyen control de plagas y enfermedades

Los biosurfactantes producidos de acuerdo con la presente invención se
5 pueden usar para otros fines no agrícolas que incluyen, por ejemplo, la limpieza de tuberías, reactores y otras máquinas o superficies.

Los biosurfactantes de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, glucolípidos (GL) de bajo peso molecular, lipopéptidos (LP), flavolípidos
10 (FL), fosfolípidos y polímeros de alto peso molecular tales como lipoproteínas, complejos de lipopolisacáridos y proteínas y complejos de polisacárido-proteína-ácido graso.

Los biosurfactantes son biodegradables y pueden producirse de forma fácil y
15 económica utilizando organismos seleccionados en sustratos renovables. La mayoría de los organismos productores de biosurfactantes producen biosurfactantes en respuesta a la presencia de fuentes de hidrocarburos (e.g., aceites, azúcar, glicerol, etc.) en los medios de crecimiento. Otros componentes de los medios, como la concentración de hierro, también pueden afectar
20 significativamente la producción de biosurfactantes.

En una implementación, el biosurfactante microbiano es un glucolípido tal como un ramnolípido, un soporolípido (SLP), un lípido de trehalosa o un manosileritritol lipídico (MEL).

25

Fábricas de microbios

Los microbios y sus productos de crecimiento producidos de acuerdo con la presente invención pueden usarse para producir una amplia gama de productos útiles, que incluyen, por ejemplo, bioplaguicidas, biosurfactantes, etanol, compuestos nutricionales, proteínas terapéuticas como la insulina, compuestos
5 útiles como vacunas y otros biopolímeros. Los microbios utilizados como estas fábricas microbianas pueden ser naturales, mutados o recombinantes.

Microorganismos cultivados de acuerdo con la presente invención

10 Los microorganismos desarrollados de acuerdo con los sistemas y métodos de la presente invención pueden ser, por ejemplo, bacterias, levaduras y/u hongos. Estos microorganismos pueden ser naturales, o microorganismos genéticamente modificados. Por ejemplo, los microorganismos pueden transformarse con genes específicos para exhibir características específicas.

15

En implementaciones específicas, los microorganismos son bacterias, incluidas las bacterias grampositivas y gramnegativas. Las bacterias pueden ser, por ejemplo, *Bacillus firmits*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquifaciens*, *Azobacter vinelandii*, *Pseudomonas chlororaphis subsp.*
20 *Aureofaciens* (Kluyver), *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum brasiliensis*, *Azobacter chroococcum*, *Rhizobium*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Ralstonia eulropha*, *Clostridium* (*C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. acetobutyricum*, *Clostridium* NIPER 7 y *C. beijerinckii*) y/o *Rhodospirillum rubrum*.

25 En otra implementación, el microorganismo es una levadura u hongo. Las especies de levaduras y hongos adecuadas para el uso de acuerdo con la presente invención incluyen *Candida*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* *sequela* y *Saccharomyces toryla*, *Issalchenkia*, *Kluyveromyces*, *Wickerhamomyces*,

Starmerella, Micorisa, Mortirella, Pycomyces, Blakeslea, Thraustochytrium, Phythium, Entomophtoor, Aureobasidium pullulans, Fusarium venenatum, Aspergillus, Trichoderma reesei y/o Rhizopus spp.

5 En una implementación, la levadura es una levadura asesina. Como se usa en el presente documento, "levadura asesina" significa una cepa de levadura caracterizada por su secreción de proteínas tóxicas o glicoproteínas, para la cual la cepa es inmune. Las exotoxinas secretadas por las levaduras asesinas son capaces de matar otras cepas de levaduras, hongos o bacterias. Por ejemplo, los

10 microorganismos que se pueden controlar por la levadura asesina incluyen *Fusarium* y otros hongos filamentosos. Ejemplos de levaduras asesinas de acuerdo con la presente invención son las que pueden usarse de manera segura en las industrias de alimentos y fermentación, i.e., cerveza, vino y panificación; aquellos que pueden usarse para controlar otros microorganismos que podrían contaminar

15 tales procesos de producción; aquellas que pueden ser utilizadas en biocontrol para la conservación de alimentos; aquellos que pueden usarse para el tratamiento de infecciones por hongos en humanos y plantas; y aquellos que pueden ser utilizados en tecnología de DNA recombinante. Tales levaduras pueden incluir, pero no están limitadas a, *Wickerhamomyces*, *Pichia* (e.g., *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*,

20 *Pichia kudrizvzevii*) *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, tal como *Hanseniaspora uvarum*, *Ustilago maydis*, *Debaryomyces*, *Hansenii*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Torulopsis*, *Ustilago*, *Williopsis*, *Zygosaccharomyces*, tal como *Zygosaccharomyces bailii* y otros.

25 En otras implementaciones, el "microorganismo" puede ser un cultivo celular tal como, por ejemplo, un cultivo celular de insecto, nematodo o mamífero.

Plantas objetivo

Las plantas que pueden beneficiarse de la aplicación de los productos y métodos de la presente invención incluyen: cultivos de hileras (e.g., maíz, soya, sorgo, cacahuets, papas, etc.), cultivos de campo (e.g., alfalfa, trigo, granos, etc.),
5 Cultivos de árboles (e.g., nueces, almendras, nueces pecanas, avellanas, pistachos, etc.), cultivos de cítricos (e.g., naranja, limón, pomelo, etc.). Cultivos de frutas (e.g., manzanas, peras, etc.), Cultivos de césped, Cultivos de plantas ornamentales (e.g., Flores, enredaderas, etc.), Vegetales (e.g., tomates, zanahorias, etc.), Cultivos de vid (e.g., uvas, fresas, arándanos, zarzamoras, etc.),
10 silvicultura (e.g., pino, abeto, eucalipto, álamo, etc.), pastos manejados (cualquier combinación de plantas utilizadas para el pastoreo de animales).

El beneficio puede estar en la forma de, por ejemplo, mayor rendimiento, calidad, resistencia a enfermedades y plagas, reducción del estrés (e.g., sal, sequía,
15 calor, etc.) y mejor uso del agua.

Otras plantas que pueden beneficiarse de los productos y métodos de la invención incluyen todas las plantas que pertenecen a la superfamilia Viridiplantae, en particular las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, incluyendo forraje o
20 leguminosas forrajeras, plantas ornamentales, cultivos alimentarios, árboles o arbustos seleccionados de *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. (e.g., *Avena sativa*, *Avena*
25 *fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida*), *Averrhoa* carambola, *Bambusa* sp., *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsea*, *Beta vulgaris*, *Brassica* spp. (e.g., *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [*canola*, *colza oleaginosa*, *nabo*]), *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.
5 Crataegus spp., Crocus sativus, Cucurbita spp., Cucumis spp., Cynara spp., Daucus
carota, Desmodium spp., Dimocarpus longan, Dioscorea spp., Diospyros spp.
Echinochloa spp., Elaeis (e.g., Elaeis guineensis, Elaeis Oleifera), Eleusine
coracana, Eragrostis tef, Erianthus sp., Eriobotrya japonica, Eucalyptus sp., Eugenia
uniflora, Fagopyrum spp., Fagus spp., Festuca arundinacea, Ficus carica, Fortunela
10 spp., Fragaria spp. Ginkgo Biloba, Glicina spp., (e.g., Glycina max, Soya hispida o
Soya max), Gossypium hirsutum, Helianthus spp. (e.g., Helianthus annuus),
Hemerocallis fulva, Hibiscus spp., Hordeum spp. (e.g., Hordeum vulgare), Ipomoea
batatas, Juglans spp., Lactuca sativa, Lathyrus spp., Lens culinaris, Linum
usitatissimum, Litchi chinensis, Lotus spp., Luffa Acutangula, Lupinus spp., Luzula
15 Sylvatica Lycopersicon, (e.g., Lycopersicon esculentum, Lycopersicon
lycopersicum, Lycopersicon pyriforme), Macrotyloma spp., Malus spp., Malpighia
emarginata, Mammea americana., mangifera Indica., Manihot spp., Manilcara
Zapota; Medicago Sativa, Melilotus spp., Mentha spp., Miscanthus Sinensis,
Momordica spp., Morus nigra, Musa spp., Nicotiana spp., Olea spp., Opuntia spp.,
20 Ornithopus spp., Oryza spp. (e.g., Oryza sativa, Oryza 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
25 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. (e.g., Solanum
tuberosum, Solanum integrifolium o Solanum lycopersicum), Sorghum bicolor,

Spinacia spp., Syzygium spp., Tagetes spp., Tamarindus indica, Theobroma cacao, Trifolium spp., Tripsacum Dactyloidesi, Triticosecale Rimpau, Triticum spp., (e.g., Triticum aestivum, Triticum durum, Triticum turgidum, Triticum Hybernum, Triticum macha, Triticum sativum, Triticum monococcum o Triticum vulgare), Tropaeolum minus, Tropaeolum majus, Vaccinium spp., Vicia spp., Vigna spp., Viola odorata, Vitis spp., Zea mays, Zizania palustris, Ziziphus spp., entre otros.

Otros ejemplos de plantas de interés incluyen, pero no se limitan a, maíz (Zea mays), Brassica sp. (e.g., B. napus, B. rapa, B. juncea), particularmente aquellas especies de Brassica útiles como fuentes de aceite de semilla, alfalfa (Medicago sativa), arroz (Oryza sativa), centeno (Secale cereale), sorgo (Sorghum bicolor, Sorgho vulgare), mijo (e.g., Mijo perla (Pennisetum glaucum), mijo proso (Panicum miliaceum), mijo de cola de zorra (Setaria italica), mijo dedo (Eleusine coracana)), girasol (Helianthus annuus), cártamo (Carthamus tinctorius) trigo (Triticum aestivum), soya (Glycine max), tabaco (Nicotiana tabacum), papa (Solanum tuberosum), maní (Arachis hypogaea), algodón (Gossypium barbadense, Gossypium hirsutum), batata dulce (Ipomoea batatas) mandioca (Manihot esculenta), café (Coffea spp.), coco (Cocos nucifera), piña (Ananas comosus), árboles cítricos (Citrus spp.), cacao (Theobroma cacao), té (Camellia sinensis), plátano (Musa spp.), aguacate (Persea americana), higo (Ficus casica), guayaba (Psidium guajava), mango (Mangifera indica), oliva (Olea europaea), papaya (Carica papaya), anacardo (Anacardium occidentale), macadamia (Macadamia integrifolia), almendra (Prunus amygdalus), remolacha azucarera (Beta vulgaris), caña de azúcar (Saccharum spp.), avena, cebada, vegetales, ornamentales y coníferas.

25

Las verduras incluyen tomates (Lycopersicon esculentum), lechuga (e.g., Lactuca sativa), judías verdes (Phaseolus vulgaris), habas (Phaseolus limensis), guisantes (Lathyrus spp.) y miembros del género Cucumis como el pepino (C.

sativus), melón (*C. cantalupensis*) y melón almizclado (*C. melo*). Los ornamentales incluyen azalea (*Rhododendron* spp.), Hortensia (*Macrophylla hydrangea*), hibiscus (*Hibiscus rosasanensis*), rosas (*Rosa* spp.), Tulipanes (*Tulipa* spp.), Narcisos (*Narcissus* spp.), Petunias (*Petunia hybrida*), carnation. *Dianthus caryophyllus*), flor de Pascua (*Euphorbia pulcherrima*) y crisantemo. Las coníferas que pueden emplearse en la práctica de las implementaciones incluyen, por ejemplo, pinos como el pino de Loblolly (*Pinus taeda*), el pino oblicuo (*Pinus elliotii*), el pino ponderosa (*Pinus ponderosa*), el pino lodgepole (*Pinus contorta*) y el pino de Monterrey (*Pinus radiata*); Abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*); *Cicuta* occidental (*Tsuga canadensis*); *Picea* de Sitka (*Picea glauca*); secoya (*Sequoia sempervirens*); abetos verdaderos como el abeto plateado (*Abies amabilis*) y abeto balsámico (*Abies balsamea*); y cedros como el cedro rojo occidental (*Thuja plicata*) y el cedro amarillo de Alaska (*Chamaecyparis nootkatensis*). Las plantas de las implementaciones incluyen plantas de cultivo (e.g., maíz, alfalfa, girasol, brassica, soya, algodón, cártamo, maní, sorgo, trigo, mijo, tabaco, etc.), tales como plantas de maíz y soya.

Los céspedes incluyen, pero no se limitan a: bluegrass anual (*Poa annua*); pasto anual (*Lolium multiflorum*); Bluegrass de Canadá (*Poa compressa*); Fescue de masticaciones (*Festuca rubra*); Bentgrass colonial (*Agrostis tenuis*), Bentgrass (*Agrostis palustris*); hierba de trigo crestada (*Agropyron desertorum*); pasto de trigo (*Agropyron cristatum*); festuca dura (*Festuca longifolia*); Kentucky Bluegrass (*Poa pratensis*); pasto verde (*Dactylis glomerate*); ryegrass perenne (*Lolium perenne*); festuca roja (*Festuca rubra*); redtop (*Agrostis alba*); pasto azul (*Poa trivialis*); festuca de ovino (festuca ovina); bromo suave (*Bromus inermis*); festuca alta (*Festuca arundinacea*); Timoteo (*Phleum pretense*); bentgrass de terciopelo (*Agrostis canino*); álcali pasto llorón (*Puccinellia distans*); hierba de trigo occidental (*Agropyron smithii*); Hierba de Bermudas (*Cynodon* spp.); Hierba de San Agustín (*Stenotaphrum secundatum*); zoysia grass (*Zoysia* spp.); Pasto Bahia (*Paspalum*

notatum); alfombra de hierba (*Axonopus affinis*); Pasto Ciempiés (*Eremochloa ophiuroides*); hierba kikuyu (*Pennisetum clandestinum*); costa de paspalum (*Paspalum vaginatum*); gramma azul (*Bouteloua gracilis*); hierba de búfalo (*Buchloe dactiloides*); Pasto; sideoats (*Bouteloua curtipendula*).

5

Las plantas de interés incluyen plantas de grano que proporcionan semillas de interés, plantas de semillas oleaginosas y leguminosas. Las semillas de interés incluyen semillas de granos, tales como maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, centeno, mijo, etc. Las plantas con semillas oleaginosas incluyen algodón, soya, cártamo, girasol, brassica, maíz, alfalfa, palma, coco, lino, colza, oliva, etc. Las plantas leguminosas incluyen frijoles y guisantes. Los frijoles incluyen guar, algarrobo, fenogreco, soya, frijol de jardín, frijol caupi, frijol mungo, frijol lima, haba, lentejas, garbanzo, etc.

10

15 **Plagas objetivo**

Los productos y métodos de la presente invención se pueden usar para reducir el daño causado por una amplia gama de plagas.

20

Ejemplos de tales plagas incluyen artrópodos, que incluyen, por ejemplo, lepidópteros (por ejemplo, Plutellidae, Noctuidae, Pyralidae, Tortricidae, Lyonetiidae, Carposinidae, Gelechiidae, Crambidae, Artiidae y Lymantriidae), Hemiptera (por ejemplo, Sicadelidae, Delphacidae, Psyllidae, Aphididae, Aleyrodidae, Orthezidae, Miridae, Tingidae, Pentatomidae y Lygaiedae), Coleoptera (por ejemplo, Scarabaeidae, Elateridae, Coccinellidae, Cerambycidae, Chrisomlidae Y Curculionidae, Diptera (por ejemplo, Mucidae, Calliphoride, Sarcophagidae, Anthomyiidae, Tephritidae, Opomyzoidea y Carnoidea), Orthoptera (por ejemplo, Acrididae, Catantopidae, y Pyrgomorphidae), Thysanoptera (por ejemplo, Thripidae,

25

Aeolothripidae, y Merolthripidae), Tylenchida (por ejemplo, Aphelenchoiridae, Ineotylechidae) Collembola (por ejemplo, Onychiurus e Isotomidae), Acarina (por ejemplo, Tetranychidae, Dermanyssidae, Acaridae y Sarcoptidae), Stylommatophora (por ejemplo, Philomycidae y Bradybaenidae), Ascaridida (por ejemplo, Ascaridida y Anisakidae), Opisthorchiida, Strigeidida, Blattodea (por ejemplo, Blaberidae, Cryptocercidae y Panesthiidae) y Thysanura (por ejemplo, Lepismatidae, Lepidotrichidae y Nicoletiidae).

Ejemplos de las plagas que pertenecen a los lepidópteros incluyen a Chilo suppressalis Walker, Cnaphalocrocis medinalis, Parnara guttata, Sesamia inferens, Mythimna separata, Naranga aenescens Moore Spodoptera litura, Etiella zinckenella, Etiella behrii, Matsumuraeses falcana, Leguminivora glycinivorella, Pleuroptya naafis, Agrotis segctum, Agrotis Ipsilon, Elisistogramma, Triannulellum, Xestia c-nigrum, Elicoverpa Assulta, Eliciberta Armigera, Mamestra Brassicae, Spodoptera Exigua, Plutella Xilostella, Pieris Rapae, Pieris brassicae, Hellulla undalis y Autographa nigrisigna.

Ejemplos de las plagas que pertenecen a Hemiptera incluyen Nilaparvata lugens, Sogatella furcifera, Laodelphax stratella, Nephotettix cincticeps, Recilia Dorsalis, Stenotus Rubrovitatus, trigonotylus Caelestialium, Leptocorisa Chinensis, Nezara Antennata, Nezara Viridula, Lagynotomus Elongatus, Scotinophara Lurida, Eysarcoris Annamita, Eysarcoris Leuisi, Eyzarcoris ventralis, Togo Hemipterus Scott, Cletus Punctiger, Piezodorus Hypneri, Halyomorpha halys, Dolycoris baccarum, Neotoxoptera formosana, Rhopalosiphum padi, Rhopalosiphum maidis y Aphis glycinas.

Los ejemplos de las plagas que pertenecen a Coleoptera incluyen el arroz Lissorhoptrus oryzophilus, Oulema oryzae, Echinocnemus squameus, Melanotus

legatus, Melanotus Fortnumi, Anomala Cuprea, Popillia Japonica, Maladera
Castanea, Epilachna varivestis, Paraluperodes Nigrobilineatus, Epilachna,
Vigiktnitioctomaculata, Henocepilachna, Viginoctopunctata, Harmonia Axyridis,
Anomala Rufocuprea, Anomala testaceipes, Aulacophora indica y Phyllotreta
5 striolata.

Ejemplos de las plagas que pertenecen a Diptera incluyen Chlorops oryzae,
Hydrellia griseola, Sitodiplosis mosellana, Delia platura, Asphondylia yushimai,
Melanagromyza sojae, Liriomyza trifolii, Liriomyza sativae, Liriomyza huidobrensis y
10 Liriomyza Bryoniae.

Los ejemplos de las plagas que pertenecen a Orthoptera incluyen Oxya
yezoensis y Oxya japonica. Ejemplos de las plagas que pertenecen a Thysanoptera
incluyen Stenchaetothrips biformis y Thrips palmi. Ejemplos de las plagas que
15 pertenecen a Tylenchida incluyen Meloidogyne, Nematoda y Heterodera. Ejemplos
de las plagas que pertenecen a Collembola incluyen Onchiurus psuedamatus yagii
y Onychiurus matsumotoi. Los ejemplos de plagas que pertenecen a Acarina
incluyen Penthaleus major, Tetranychus urticae, Tetranychus kanzawai,
Tyrophagus putrescentiae y Tarsonemus bilobatus. Ejemplos de las plagas que
20 pertenecen a Stylommatophora incluyen Helix y Philomycidae. Ejemplos de las
plagas que pertenecen a Ascaridida incluyen Ascaris lumbricoide. Los ejemplos de
las plagas que pertenecen a Opisthorchiida incluyen Metagonimus yokogawai, los
ejemplos de las plagas que pertenecen a Strigeidida incluyen Schistosoma
japonicum. Los ejemplos de las plagas que pertenecen a Blattodea incluyen Blattella
25 germanica, Periplaneta fuliginosa, Periplaneta americana y Blatta lateralis. Ejemplos
de las plagas que pertenecen a Thysanura incluyen Ctenolepisma y Lepisma.

En una implementación, la presente invención proporciona métodos y productos, con base en el control de nematodos. Los nematodos son una clase de gusanos del filo Nematelminthes gusanos redondos o gusanos de hilo. Los nematodos también se conocen como gusanos de la anguila. Los ejemplos en esta

5 clase son los nematodos formadores de quistes del género *Heterodera*, los nematodos de raíz rechonchos del género *Trichodorus*, los nematodos de bulbo y tallo del género *Ditylenchus*, el nematodo de oro, *Heterodera rostochiensis*, los nematodos del nudo de la raíz, del género *Meloidogyne*, los nematodos de la lesión de la raíz del género *Pratylenchus*, los nematodos de los cítricos del género

10 *Tylenchulus*, los nematodos de picadura del género *Belonolaimus* y los nematodos parásitos de la planta como el *Nacobus* y *Radopholus*. En una implementación de ejemplo, el método y los productos previenen la formación de agallas radiculares causadas por nematodos, tales como nudos de raíz y nematodos de quistes.

15 **Enfermedad de la planta objetivo**

Los ejemplos de enfermedades de las plantas, que pueden ser controlados por la presente invención, incluyen los siguientes:

20 Enfermedades del trigo: Tizón de la cabeza de Fusarium (*Fusarium graminearum*, *F. avenacerum*, *F. culmorum*, *Microdochium nivale*), Tizón de la nieve causada por *Typhula* (*Typhula* sp., *Micronectriella nivalis*), Smut suelto (*Ustilago tritici*, *U. nuda*), Bunt (*Tilletia caries*), mancha de la hoja (*Mycosphaerella graminicola*) y mancha de la gluma (*Leptosphaeria nodorum*);

25 Enfermedades del maíz: tizón (*Ustilago maydis*) y mancha parda (*Cochliobolus heterostrophus*); Enfermedades de los cítricos: melanosa (*Diaporthe citri*), sarna (*Elsinoe fawcetti*) y podredumbre del penicillium (*Penicillium digitatum*, *P. italicum*);

Enfermedades de la manzana: tizón de la flor (*Monilinia mali*), mildiú polvoriento (*Podosphaera leucotricha*), mancha foliar por *Alternaria* (*Alternaria alternata* patotipo de la manzana), sarna (*Venturia inaequalis*), podredumbre
5 amarga (*Colletotrichum acutatum*) y pudrición de la corona (*Phytophthora cactorum*);

Enfermedades de la pera: sarna (*Venturia nashicola*, *V. pirina*), mancha negra (*Alternaria alternata* Patotipo de la pera japonesa). herrumbre (*Gymnosporangium haraeum*) y pudrición de la fruta por *Phytophthora* (*Phytophthora cactorum*);

10

Enfermedades del melocotón: podredumbre parda (*Monilinia fructicola*), sarna (*Cladosporium carpophilum*) y podredumbre por *Phomopsis* (*Phomopsis* sp.);

Enfermedades de la uva: antracnosis (*Elsinoe ampelina*), podredumbre
15 madura (*Glomerella cingulata*), podredumbre negra (*Guignardia bidwellii*), moho veloso (*Plasmopara viticola*) y moho gris (*Botrytis cinerea*);

Enfermedades del caqui japonés: antracnosis (*Gloeosporium kaki*) y mancha foliar (*Cercospora kaki*, *Mycosphaerella nawae*);

20

Enfermedades de la calabaza: antracnosis (*Colletotrichum lagenarium*), Mancha foliar objetivo (*Corynespora cassiicola*), Tizón del tallo gomoso (*Mycosphaerella melonis*), marchitamiento por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum*), moho veloso (*Pseudoperonospora cubensis*) y podredumbre *Phytophthora* (*Phytophthora*
25 sp.).

Enfermedades del tomate: tizón temprano (*Alternaria solani*), moho de la hoja (*Cladosporium fulvum*) y tizón tardío (*Phytophthora infestans*);

Enfermedades de los vegetales crucíferos: mancha foliar por *Alternaria* (*Alternaria japonica*), mancha blanca (*Cercospora brassicae*) y moho veloso (*Peronospora parasitica*);

5

Enfermedades de la colza: esclerotinia podredumbre (*Sclerotinia sclerotiorum*) y mancha gris de la hoja (*Alternaria brassicae*);

Enfermedades de la soya: mancha de semilla de color púrpura (*Cercospora kikuchii*), esfaceloma escamoso (*Elsinoe glycines*), plaga de la vaina y tallo (*Diaporthe phaseolorum* var. *Sojae*), roya (*Phakopsora pachyrhizi*) y pudrición parda marrón (*Phytophthora sojae*);

Enfermedades del frijol azuki: moho gris (*Botrytis cinerea*) y podredumbre *Sclerotinia* (*Sclerotinia sclerotiorum*);

20

Enfermedades del frijol riñon: moho gris (*Botrytis cinerea*), podredumbre de la esclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*) y antracnosis del frijol (*Colletotrichum lindemthianum*);

Enfermedades del maní: mancha foliar (*Cercospora personata*), mancha parda (*Cercospora arachidicola*) y tizón sureño (*Sclerotium rolfsii*);

Enfermedades de la papa: tizón temprano (*Alternaria solani*) y tizón tardío (*Phytophthora infestans*);

Enfermedades del algodón: marchitamiento por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum*); Enfermedades del tabaco: mancha parda (*Alternaria longipes*),

antracnosis (*Colletotrichum tabacum*), moho veloso (*Peronospora tabacina*) y
vástago negro (*Phytophthora nicotianae*);

Enfermedades del latido del azúcar: mancha foliar por *Cercospora*
5 (*Cercospora beticola*), tizón foliar (*Thanatephorus cucumeris*), podredumbre de la
raíz (*Thanatephorus cucumeris*) y pudrición de la raíz de *Aphanomyces*
(*Aphanidermatum cochlioides*);

Enfermedades de la rosa: mancha negra (*Diplocarpon rosae*) y moho
10 polvoriento (*Sphaerotheca pannosa*);

Enfermedades del crisantemo y las plantas asteráceas: moho veloso (*Bremia*
lactucae) y tizón foliar (*Septoria chrysanthemi-indici*);

15 Enfermedades de diversas plantas: enfermedades causadas por *Pythium* spp.
(*Pythium aphanidermatum*, *Pythium debarianum*, *Pythium graminicola*, *Pythium*
irregularulare, *Pythium ultimum*), moho gris (*Botrytis cinerea*), podredumbre
Sclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*) y Damping-off (*Rhizoctonia solani*) causada por
Rhizoctonia sp.

20

Enfermedad del rábano japonés: mancha foliar por *Alternaria* (*Alternaria*
brassicicola);

Enfermedades del césped: mancha dólar (*Sclerotinia homeocarpa*), parche
25 marrón y parche grande (*Rhizoctonia solani*);

Enfermedad del banano: sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*, *Mycosphaerella*
musicola, *Pseudocercospora musae*); y

Enfermedades de las semillas o enfermedades en las primeras etapas del crecimiento de varias plantas causadas por bacterias del género *Aspergillus*, género *Penicillium*, género *Fusarium*, género *Tricoderma*, género *Thielaviopsis*, género
5 *Rhizopus*, género *Mucor*, género *Phoma* y género *Diplodia*.

La enfermedad puede ser de origen radicular, foliar, presente en el sistema vascular de la planta o transmitida por insectos e incluye todos los patógenos bacterianos, virales y fúngicos de las plantas.

10

La composición para el control de enfermedades de las plantas de la presente invención se puede aplicar a tierras de cultivo tales como tierras cultivadas, campos de arroz, césped y huertos, o tierras no agrícolas. La composición de control de enfermedades de plantas de la presente invención puede controlar enfermedades
15 de plantas y tierras de cultivo, en bosques, en los cuales se cultivan "plantas".

Malezas objetivo

A continuación, se dan ejemplos de las malezas que pueden ser controladas
20 por los métodos y composiciones de la presente invención.

Las malezas de la familia *Urticaceae*: *Urtica ureas*; malezas de la familia *Polygonaceae*: *Polygonum convolvulus*, *Polygonum lapathifolium*, *Polygonum pennsylvanicum*, *Polygonum persicaria*, *Polygonum longisetum*, *Polygonum*
25 *aviculare*, *Polygonum Arenastrum*, *Polygonum Cuspidatum*, *Rumex japonicas*, *Rumex crispus*, *Rumex Optucifolius* y *Rumex acetaso*; Malezas de la familia *Portulacaceae*: *Portulaca oleracea*; malezas de la familia *Caryophyllaceae*: *Stellaria media*, *Cerastium holosteoides*, *Cerastium glomeratum*, *Spergula arvensis* y *Silene*

gallica; Malezas de la familia Molluginaceae: Mollugo verticillata; malezas de la familia Chenopodiaceae: álbum de Chenopodium, Chenopodium ambrosioides, Kochia scoparia, Salsola kali y Atriplex spp.; malezas de la familia Amaranthus retroflexus, Amaranthus viridis, Amaranthus lirus, Amaranthus spinosus, 5 Amaranthus hybridus, Amaranthus palmeri, Amaranthus Rudis, Amaranthus Patulus, Amaranthus Tuberculatus, Amaranthus Blitoides, Amaranthus deflexus, Amaranthus quitensis, Alternanthera Philoxeroides, Alternanthera Tenella; malezas de la familia Papaveraceae: Papaver rhoeas y Argemone mexicana; Malezas de la familia Brassicaceae: Raphanus raphanistrum, Raphanus sativus, Sinapis arvensis, 10 Capsella bursa-pastoris, Brassica juncea, Brassica campestris, Descurainia pinnata, Rorippa islandica, Rorippa silvestris, Thlaspi Arvense, Miagrum rugosum, Lepidium Virginico y Coronopus Didymus; Malezas de la familia Capparaceae: Cleome affinis; malezas de la familia Fabaceae: Aeschynomene indica, Aeschynomene rudis, Sesbania exaltata, Cassia obtusifolia, Cassia occidentalis, Desmodium tortuosum, 15 Desmodium adscendens, Trifolium repens, Pueraria Lobata, Vicia angustifolia, indigofera Hirsute, indigofera truxillensis, Ivigna sinensis, malezas de la familia Oxalidaceae: Oxalis corniculata, Oxalis stricta y Oxalis oxyptera; malezas de la familia Geraniaceae: Geranium carolinense y Erodium cicutarium; Maleza de la familia Euphorbiaceae: Euphorbia helioscopia, Euphorbia maculata, Euphorbia 20 humistrata, Euphorbia esula, Euphorbia heterophylla, Euphorbia brasiliensis, Acalypha australis, Croton glandulosus, Croton lobatus, Phyllanthus corcovadensis. y Ricinus communis; malezas de la familia Malvaceae: Abutilon theophrasti, Sida rhombifolia, Sida cordifolia, Sida spinosa, Sida glaziovii, Sida santaremnensis, Hibiscus trionum, Anoda cristata y Malvastrum coromandelianum; malezas de la 25 familia Sterculiaceae: Waltheria indica; malezas de la familia Violaceae: Viola arvensis y Viola tricolor; malezas de la familia Cucurbitaceae: Sicyos angulatus, Echinocystis lobata y Momordica charantia; malezas de la familia Lythraceae: Lythrum salicaria; malezas de la familia Apiaceae: hidrocotilos sibthorpioides;

malezas de la familia Sapindaceae: *Cardiospermum haliicacabum*; malezas de la familia Primulaceae: *Anagallis arvensis*; malezas de la familia Asclepiadaceae: *Asclepias syriaca* y *Ampelamus albidus*; Malezas de la familia Rubiaceae: *Galium aparine*, *Galium spurium* var. *echinospermon*, *Spernacoce latifolia*, *Richardia*
5 *brasiliensis* y *Borreria alata*; malezas de la familia Convolvulaceae: *Ipomoea nil*, *Ipomoea hederacea*, *Ipomoea purpurea*, *Ipomoea hederacea* var. *Integruscula*, *Ipomoea lacunose*, *Ipomoea triloba*, *Ipomoea acuminata*, *Ipomoea ederifolia*, *ipomoea coccinea*, *Ipomoea quamoclit*, *Ipomoea grandifolia*, *Ipomoea aristolochiaefolia*, *Ipomoea cairica*, *Myocitis arvensis*; malezas de la familia
10 *Lamiaceae*: *Lamium purpureum*, *Lamium amplexicaule*, *Leonotis nepetaefolia*, *Hyptis suaveolens*, *Hyptis lophanta*, *Leonurus sibiricus* y *Stachys arvensis*; Malezas de la familia *Solanaceae*: *Datura stramonium*, *Solanum nigrum*, *Solanum americanum*, *Solanum ptycanthum*, *Solanum sarrachoides*, *Solanum rostratum*, *Solanum aculeatissimum*, *Solanum Sisymbriifolium*, *Solanum Carolinense*, *Phisalis*
15 *Angulata*, *Phisalis subglabrata* y *Nicandra Physaloides*; malezas de la familia *Scrophulariaceae*: *Veronica hederaefolia*, *Veronica persica* y *Veronica arvensis*; malezas de la familia *Plantaginaceae*: *Plantago asiatica*; malezas de la familia *Asteraceae*: *Xanthium pensylvanicum*, *Xanthium occidentale*, *Elianthus Anws*; *Matricaria chamomila*, *matricalia perforate*, *Chysantemun Chrysanthemum*
20 *Segetum*, *matricaria Matricariodis*, *Artemisia princeps*; *Artemisia Bulfgaris*, *Artemiksia Berlotorum*, *Solidago altissima*; *Taraxcacum Officinale*, *Galinsoga SilateGalinsoga Parviflora*, *Senecio Bulgaris*, *Senecio brasiliensis*, *Senecio grisebachii*, *Conyza bonariensis*, *Conyza Canadensis*, *Ambrosia artemisiaefolia*, *Ambrosia trifida*, *Bidens pilosa*, *Bidens frondosa*, *Bidens subalternans*, *Cirsium*
25 *Arvense*, *Cirsium vulgare*, *Silybum marianum*, *Carduus Nutans*, *Lactuca Serriola*, *Sochus Oleraceus*, *Sonchus Asper*, *Wedelia Glauca*, *Melampodium perfoliatum*, *Emilia sonchifolia*, *Tagetes minuta*, *Blainvillea latifolia*, *Tridax procumbens*, *Porophyllum ruderales*, *Acanthospermum Australi*, *Acantospermum Hispidum*,

Cardiospermum Halicacabum, Ageratum Conyzoides, Eupatorium Perfoliatum, Eclipta Alba, Erechites Hieracifolia, Gamochaeta Spicata, Gnaphlium Spicatum, Jaegeria Hirta, Parthenium Hysterophorus, Siegesbeckia Orientalis y Soliva sessilis; malezas de la familia Liliaceae: Allium canadense y Allium vineale; malezas de la familia Commelinaceae: Commelina communis, Commelina bengharensis y Commelina erecta; malezas de la familia Poaceae: Echinochloa crus-galli, Setaria viridis, Setaria faberi, Setaria glauca, Setaria geniculata, Digitaria ciliaris, Digitaria sanguinalis, Digitaria horizontalis, Digitaria insularis, Eleusine indica, Poa annua, Alospecurus aequalis, Alopecurus Miosuroides, Avena fatua, Sorghum halepense, Sorghum vulgare, Agropyron repens, Lolium multiflorum, Lolium perenne, Lolium rigidum, Bromus secalinus, Bromus tectorum, Hordeum jubatum, Aegilops Cylindrica, Phalaris arundinacea, Phalaris minor, Apera Spica-venti, Panicum dichotomiflorum, Panicum Texanum, Pánico Maximum, Brachiaria Platyphylla, Brachiaria ruziziensis, Brachiaria Plantaginea, Bracharia decumbens, Bracharia Brizantha, Bracharia Unidicola, Cenchrus Echinatus, Cenchrus Pauciflorus, Eriochloa Villosa, Pennisetum clandestinum, Pennisetum setosum y Rottboellia cochinchinensis; malezas de la familia Cyperaceae: Cyperus microiria, Cyperus iria, Cyperus odoratus, Cyperus rotundus, Cyperus esculentus y Kyllinga gracillima; y malezas de la familia Equisetaceae: Equisetum arvense y Equisetum palustre; y similares.

EJEMPLOS

Se debe entender que los ejemplos e implementaciones descritos en el presente documento son solo para fines ilustrativos y que se sugerirán diversas modificaciones o cambios a la luz de estos a los versados en el arte y se incluirán dentro del espíritu y alcance de esta solicitud.

Ejemplo 1: Fermentación de *Starmerella bombicola* para la producción de soporolípidos (SLP) en un reactor distribuible de 110 L.

Se utiliza un reactor portátil, tipo puente aéreo, totalmente cerrado, operado
5 por PLC con filtración de agua, unidad de control de temperatura y un soplador de
aire a bordo. El reactor tiene un volumen de trabajo de 90 L cuando crece *S.*
bombicola para la producción de SLP.

En implementaciones preferidas, los nutrientes para la producción de SLP son
10 glucosa, urea, extracto de levadura, aceite de canola, sulfato de magnesio y fosfato
de potasio.

El reactor se inocula con 8 litros de cultivo líquido cultivado en matraces. La
duración del ciclo de cultivo para la producción de SLP es de 7-8 días, a 25°C y pH
15 3.5, con muestreo realizado dos veces al día.

La concentración final de SLP es aproximadamente el 10% del volumen de
trabajo, en este caso aproximadamente 9 L de producto, que contiene 300-400
gramos de SLP por litro.

20

Ejemplo 2: Fermentación de *Wickerhamomyces* y/o levadura *Pichia* para la
producción de soporolípidos en un reactor distribuible de 450 L.

Se utiliza un reactor de puente aéreo móvil operado por PLC con filtración de
25 agua, unidad de control de temperatura y soplador de aire para una aireación
suficiente. El proceso puede llevarse a cabo como proceso de cultivo por lotes.

El reactor tiene un volumen de trabajo de 400 L cuando se cultiva Wickerhamomyces o Pichia para la producción de SLP.

En implementaciones preferidas, los nutrientes para la producción de SLP son
5 glucosa, urea, extracto de levadura, aceite de canola, sulfato de magnesio y fosfato de potasio.

La inoculación de este reactor requiere hasta un 5% de cultivo líquido de semillas de volumen de trabajo. La duración del ciclo de cultivo es de 7 días, a una
10 temperatura de 25°C y pH 3.5, con muestreo realizado dos veces al día.

La concentración final de SLP es aproximadamente el 20-25% del volumen de trabajo, en este caso más de 90 L de formas de producto.

15 Ejemplo 3: Fermentación de Wickerhamomyces y/o levadura Pichia para la producción de células y proteínas celulares únicas en un reactor distribuible de 900 L.

Se utiliza un reactor portátil dividido en dos tanques por un puente aéreo
20 central para ayudar a mezclar los dos tanques simultáneamente. El reactor tiene un volumen de trabajo de 600 L cuando se cultivan Wickerhamomyces y/o Pichia para la producción celular.

En una implementación preferida, los nutrientes para la producción celular son
25 glucosa o azúcar de hornear, urea, extracto de levadura, sulfato de magnesio y fosfato de potasio.

El reactor se inocula con 2% de cultivo de semillas. La fermentación continúa durante 48-72 horas sin estabilización del pH y una temperatura de 26 a 32°C.

La concentración final de las células será de 10 gramos de peso húmedo por litro. La concentración de biomasa húmeda puede alcanzar los 90 kilos por ciclo con una concentración de proteínas de hasta 45 kilos.

Ejemplo 4: Fermentación de levadura *Wickerhamomyces* y/o *Pichia* para células y proteínas celulares únicas. Producción de proteínas en reactor distribuido de 2000 L.

Se utiliza un reactor portátil dividido en dos tanques cuadrados acompañados de 2 bucles para el intercambio de masa entre ellos. El reactor tiene un volumen de trabajo de 2000 L cuando se cultivan *Wickerhamomyces* y/o *Pichia* para la producción celular.

En una implementación preferida, los nutrientes para la producción celular son glucosa o azúcar de horneado, urea, extracto de levadura, sulfato de magnesio y fosfato de potasio.

El reactor se inocula con 2% de cultivo de siembra. La fermentación continúa durante 48-72 horas sin estabilización del pH y una temperatura de 26 a 32°C.

La concentración final de células será de 100 g de peso húmedo por litro. La concentración de biomasa húmeda puede alcanzar hasta 200 kilos por ciclo con una concentración de proteínas de hasta 100 kilos.

Ejemplo 5: fermentación sinérgica de un cultivo combinado de *Acinetobacter venetianus* y *Bacillus subtilis* en un reactor distribuible de 900 L.

Se utiliza un reactor portátil dividido en dos tanques por un puente aéreo central para ayudar a mezclar los dos tanques simultáneamente. El reactor tiene un volumen de trabajo de 600 L cuando se cultivan *Acinetobacter/Bacillus subtilis* para la producción de biosurfactantes.

En una implementación preferida, los nutrientes para la producción de biosurfactante son glucosa, melaza en polvo, sacarosa, fosfato de potasio, fosfato de sodio, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de calcio, urea, cloruro de amonio y extracto de levadura.

El reactor que contiene 600 L de medio nutriente con pH 6.8-7.0 se inocula con 60 litros de cultivo de semilla que contiene tanto *Acinetobacter* como *Bacillus subtilis*. La fermentación continúa durante 24 horas sin estabilización del pH y una temperatura de 28 a 30°C.

La concentración final de células será de hasta 1.000 millones de células de cultivo combinado con una distribución aproximadamente igual de ambos microorganismos.

Ejemplo 6: Fermentación de *Starmerella bombicola* para la producción de soporolípidos en un reactor portátil distribuible de 14 L.

25

Este reactor es un recipiente de vidrio con camisa autoclavable con impulsor de aire y tártago. Está equipado con oxígeno disuelto, pH, temperatura y probeta de espuma; tiene una estación de control integrada con una interfaz de pantalla táctil a

color, bombas incorporadas, controladores de flujo de gas y controladores de nivel/espuma de pH/DO.

El volumen de trabajo del reactor es de 10 litros.

5

El medio nutritivo contiene glucosa, extracto de levadura, urea y aceite vegetal. El inóculo puede ser un cultivo de 1 a 2 días de *Starmerella bombicola* en aproximadamente el 5-10% del volumen total de cultivo. La duración del cultivo y la recolección de productos continua por 5 a 14 días. La producción final de

10 sopolípidos puede alcanzar 1 -2 kilogramos por ciclo.

Ejemplo 7; Fermentación de *Pseudozyma aphidis* para la producción de lipil de manosileritritol lipídico (MEL) en un reactor portátil distribuible de 14 L.

15

Este es un recipiente de vidrio con camisa autoclavable a vapor con impulsor Rushton de aire y tártago. Está equipado con OD, pH, temperatura y sonda de espuma. Cuenta con una estación de control integrada con una interfaz de pantalla táctil a color, bombas incorporadas, controladores de flujo de gas y controladores de nivel/espuma de pH/DO. El volumen de trabajo del reactor es de 10 litros.

20

Composición del medio nutriente: nitrato de sodio, fosfato de potasio, sulfato de magnesio, extracto de levadura y aceite vegetal. El inóculo puede ser un cultivo de 1 a 2 días de *Pseudozyma aphidis*, en aproximadamente el 5-10% del volumen total del cultivo. Duración del cultivo y recogida de muestras: 9-15 días. Producción

25 final de MEL: 800 -1000 gramos.

Ejemplo 8: Cultivo de *Bacillus subtilis* en un sistema híbrido distribuible.

Este es un sistema híbrido entre la fermentación en estado líquido y la fermentación en estado sólido. En este sistema, una gran cantidad de partículas hidrófilas saturadas de medio de nutrientes individuales se suspenden en una matriz de partículas hidrófobas. Las partículas hidrófilas pueden ser, por ejemplo, sílice
5 pirógena, perlita, vermiculita o tierra de diatomeas. Las partículas hidrófobas pueden ser, por ejemplo, arena recubierta de polímero (arena hidrofóbica), perlita, vermiculita.

La incrustación de partículas hidrófilas en partículas hidrofóbicas crea un
10 ambiente de micro-cultivo estéril. Además, la matriz hidrófoba permite un intercambio de gases eficiente para los cultivos. Volumen de trabajo: 500 ml-1 tonelada métrica.

Composición del medio nutriente: caldo nutritivo, medio M9, caldo de soya
15 tréptico. Tipos de inóculo y su cantidad: el inóculo puede tener una duración de 12 a 16 horas aproximadamente 1 a 5% del volumen total del cultivo. Duración del cultivo: 1 - 3 días. CFU final: 1-2 mil millones de células/esporas por 1 gramo.

Ejemplo 9: Cultivo de *Trichoderma harzianum* en un sistema híbrido
20 distribuible

Se desarrolló un método similar para el cultivo de micorrizas utilizando arena hidrofóbica y tierra de diatomeas como se describe en el Ejemplo 8. Este sistema tiene, en peso, 1 parte de tierra de diatomeas saturada con medio nutriente,
25 homogeneizada en 6 partes de arena hidrofóbica. Luego se añadió un inóculo en polvo. Esta mezcla se dejó incubar en condiciones óptimas de crecimiento de hongos. La muestra fue enumerada diariamente.

Volumen de trabajo: 100 ml a 1 tonelada métrica. Composición del medio nutriente: caldo de dextrosa de patata y peptona de soya. Tipos de inóculo y su cantidad: Esporas secas o propágulos miceliales. Duración del cultivo: 7-10 días. Producción en masa final: hasta 10^9 propágulos/gramo.

5

Ejemplo 10 - Preparación de enmienda de suelo soporolípido

Para esta invención, se sintetizó una mezcla natural de soporolípidos mediante la fermentación de *S. bombycola* en un medio de fermentación que contenía 100 g/L de glucosa, 10 g/L de extracto de levadura, 1 g/L de urea y 100 ml/L de aceite de canola en agua. Después de 5-7 días de fermentación, aproximadamente 500 g/l de soporolípidos precipitaron como una capa de color marrón en el fondo del recipiente de fermentación.

15 La capa de soporolípido se recogió y se diluyó 4 veces hasta una concentración de SLP de 125 g/l. El pH se ajustó a 6,5-7,0 utilizando hidróxido de sodio. Ventajosamente, el caldo soporolípido también contiene algunas células de levadura residuales y cantidades mínimas de metabolitos y componentes de los medios. Esto permite la presencia de altas concentraciones de manoproteínas como
20 parte de la superficie externa de la pared celular de la levadura (la manoproteína es un bioemulsificador altamente eficaz capaz de alcanzar hasta un índice de emulsificación del 80%); la presencia de biopolímero beta-glucano (un emulsionante) en las paredes celulares de levadura; la presencia de soporolípidos en el cultivo; y la presencia de solventes y/u otros metabolitos (e.g., ácido láctico,
25 etanol, etc.).

Se pueden producir dos productos diferentes a partir de este proceso de fermentación: uno que comprende la capa de SLP pura y uno que comprende todo el caldo que contiene el cultivo de *S. bombicola* y SLP.

5 Todas las patentes, solicitudes de patentes, solicitudes provisionales y publicaciones mencionadas o citadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad, incluidas todas las figuras y tablas, en la medida en que no sean incompatibles con las enseñanzas explícitas de esta especificación.

10 La descripción en este documento de cualquier aspecto o implementación de la invención que usa términos tales como "que comprende", "que tiene", "que incluye" o "que contiene" con referencia a un elemento o elementos está destinada a proporcionar soporte para un aspecto o implementación similar a la de la invención que "consiste en" "consiste esencialmente en", o "comprende sustancialmente" ese
15 elemento o elementos en particular, a menos que se indique lo contrario o se contradiga claramente con el contexto (e.g., una composición descrita en este documento que comprende un elemento en particular debe entenderse como que también describe una composición que consiste de ese elemento, a menos que se indique lo contrario o se contradiga claramente por el contexto).

20

El uso del término "que comprende", en este documento incluye que consiste esencialmente en y "consiste en". El término "que consiste esencialmente en", como se usa en este documento, limita el alcance de los ingredientes y etapas para los materiales o etapas especificados y aquellos que no afectan materialmente a la(s)
25 característica(s) básica(s) y novedosa(s) de la presente invención, e.g., composiciones y métodos para promover la sanidad vegetal. El término "que consiste esencialmente en", como se usa en este documento, limita el alcance de los ingredientes y etapas para los materiales o etapas especificados y aquellos que

no afectan materialmente a la(s) característic (s) básica (s) y novedosa (s) de la presente invención.