

PRODUCTOS A BASE DE MICROBIO PARA MEJORAR LA RAIZ DE LA PLANTA Y LA SALUD INMUNE

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

5 Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud Provisional de EE.UU. No. 62/668,316, presentada el 8 de mayo de 2018; y la No. 62/719,758, presentada el 20 de agosto de 2018, cada una de las cuales se incorpora acá por referencia en su totalidad.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En la industria agrícola, ciertos inconvenientes comunes continúan obstaculizando la capacidad de los cultivadores de maximizar los rendimientos de producción mientras se mantienen los costos bajos. Estos incluyen, pero no se limitan a infecciones e infestaciones causadas por bacterias, hongos, nematodos y otras plagas y patógenos; los altos costos de fertilizantes y herbicidas químicos, incluyendo sus impactos ambientales y de salud; y la dificultad de las plantas de absorber eficientemente nutrientes y agua a partir de diferentes tipos de suelo.

En la producción de cítricos, por ejemplo, la infección propagada de plantas de cítricos por patógenos tal como aquellos que causan enfermedad de enverdecimiento de cítricos y enfermedad del cancro de cítricos ha llevado a dificultades significativas para los cultivadores de cítricos. Tanto como cultivos enteros se han perdido por estas infecciones bacterianas, llevando a una reducción en la producción, y un aumento en el precio de los productos cítricos a nivel mundial.

La enfermedad de enverdecimiento de cítricos, la cual también es conocida como Huanglongbing (HLB) o enfermedad de dragón amarillo, es una infección incurable causada por la bacteria gramnegativa *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Esta enfermedad ha causado devastación para millones de acres de cultivos cítricos a lo largo de los Estados Unidos y otras partes del mundo. Los árboles

infectados producen frutos que son verdes, deformes y amargos, los cuales no son adecuados para venta. Esta enfermedad se propaga por medio de un insecto infectado con la enfermedad, el psílido de cítrico asiático, y ha puesto el futuro de los árboles de cítricos mundiales en riesgo.

5 HLB vive e interfiere con la función del líber, o el sistema vascular de la planta que transporta azúcares a todas las partes de un árbol. Así, el *Liberibacter* se puede mover y crecer por todo el árbol, incluyendo las raíces. Antes de cualquier expresión de síntomas foliares, la infección típicamente ya ha causado daño significativo al sistema de raíces, causando de 30 a 50% de pérdida en densidad fibrosa de la raíz.

10 La densidad de la raíz continúa a disminuir gradualmente a medida que los síntomas se desarrollan en el dosel. Esto probablemente se debe a taponamiento en el floema, lo cual restringe el movimiento de azúcares al sistema de raíz. La pérdida de dicho gran porcentaje de las raíces reduce ampliamente la salud inmune del árbol, así como su capacidad de absorber nutrientes eficientemente y soportar
15 tensión de agua durante periodos extendidos de sequía. Así, una de las características más cruciales para cultivos saludables es una rizosfera saludable.

 La rizosfera es la zona del suelo donde el sistema de raíz de una planta crece y absorbe agua y nutrientes. Para complementar los suelos con ciertos nutrientes, varios granjeros han confiado mucho en el uso de químicos sintéticos y fertilizantes
20 químicos para aumentar la producción del cultivo y proteger los cultivos de sequía y enfermedades. Con capacidad de absorción reducida, sin embargo, cuando, por ejemplo, el sistema de raíz de una planta está comprometido debido a la enfermedad, adicionar más agua y/o nutrientes al suelo puede no llevar a absorción aumentada por parte del sistema de raíz. Por el contrario, lo que se aplica fluirá a
25 través de la rizosfera y dentro del agua subterránea. Como fuentes de contaminación, el uso responsable de estas sustancias es un indispensable ecológico y comercial. El exceso de dependencia y el uso a largo plazo de ciertos fertilizantes, pesticidas y antibióticos químicos alteran perjudicialmente los

ecosistemas del suelo, reducen la tolerancia a estrés, aumentan la prevalencia de plagas resistentes, e impiden el crecimiento de la planta y la vitalidad.

La absorción eficiente de nutrientes y agua en la rizosfera depende no sólo de la cantidad de agua y nutrientes presentes allí, sino también del microbioma particular que existe dentro del suelo. Los suelos contienen billones de microorganismos diferentes, los cuales coexisten entre sí y con las plantas para formar una red compleja de relaciones simbióticas.

La combinación óptima de microorganismos en una rizosfera varía entre el tipo de planta, así como el tipo de suelo en el cual crece. No hay dos especies de plantas o regiones que tengan la misma red de microbios dentro de una rizosfera. Por lo tanto, aunque los agentes biológicos tienen el potencial de jugar un papel cada vez más vital en la salud del cultivo y la remediación del suelo, tratar un amplio rango de especies de plantas sobre varias regiones diferentes posee dificultades debido a la complejidad y la especificidad del microbioma rizosférico óptimo de cada planta.

Los costos económicos y los impactos adversos ambientales y de salud de los métodos actuales de producción de cultivo continúan cargando la sostenibilidad de productos de consumo a base de cultivo. Así, hay una necesidad continua por métodos mejorados, no tóxicos y amigables con el medio ambiente para mejorar la producción del cultivo a un bajo costo.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención suministra productos a base de microbio, así como métodos para usar estos productos a base de microbios en aplicaciones agrícolas. Ventajosamente, los productos a base de microbios y los métodos de la presente invención son amigables con el medio ambiente, no tóxicos y económicos.

En modalidades preferidas, la presente invención suministra composiciones a base de microbios para tratamiento de suelo y métodos para su uso para mejorar

la salud, el crecimiento y la producción total de plantas de cultivo, por ejemplo, al mejorar las propiedades de retención de nutrientes y humedad de la rizosfera. Ventajosamente, las composiciones de tratamiento de suelo de la presente invención pueden mejorar, por ejemplo, la salud del cultivo, así como el crecimiento
5 del cultivo y las producciones, incluso en situaciones donde una o más de las plantas en un cultivo están infectadas con un patógeno o donde la salud inmune de las plantas de cultivo está comprometida.

Por ejemplo, en una modalidad, la presente invención puede ser usada para mejorar la salud, el crecimiento y el rendimiento de plantas de cítricos infectadas
10 con, por ejemplo, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (enfermedad de enverdecimiento de cítricos) y/o *Xanthomonas axonopodis* (enfermedad de cranco de cítricos).

En una modalidad, la presente invención suministra composiciones de tratamiento de suelo que comprenden una combinación de microorganismos y/o sus
15 subproductos de crecimiento. También se suministran métodos para cultivar los microorganismos y/o subproductos de crecimiento de la composición de tratamiento de suelo.

En una modalidad, la composición de tratamiento de suelo comprende un primer microorganismo y un segundo microorganismo. Más específicamente, el
20 primer microorganismo es una cepa fúngica no patogénica formadora de conidios (es decir, formadora de esporas), y el segundo microorganismo es una cepa bacteriana no patogénica formadora de esporas. Preferiblemente, la composición comprende un hongo *Trichoderma spp.* y un bacterio *Bacillus spp.*, aunque se contemplan otras combinaciones. En una modalidad específica, la composición
25 comprende *Trichoderma harzianum* y *Bacillus amyloliquefaciens*.

En una modalidad, la composición puede comprender de 1 a 99% de *Trichoderma* en volumen y de 99 a 1% de *Bacillus* en volumen. En modalidades

preferidas, la relación de conteo celular de *Trichoderma* a *Bacillus* es aproximadamente 1:4.

En una modalidad, la composición puede además comprender uno o más microorganismos beneficiosos adicionales, tales como, por ejemplo, fijadores de nitrógeno (por ejemplo, *Azotobacter vinelandii*), movilizadores de potasio (por ejemplo, *Fratureia aurantia*), y otros incluyendo, por ejemplo, *Myxococcus xanthus*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Starmerella bombicola*, *Saccharomyces boulardii*, *Pichia occidentalis*, *Pichia kudriavzevii*, y/o *Meyerozyma guilliermondii*.

Las especies y la relación de microorganismos y otros ingredientes en la composición puede ser determinada de acuerdo con, por ejemplo, la planta a ser tratada, el tipo de suelo donde la planta está creciendo, la salud de la planta al momento del tratamiento, así como otros factores. Así, la composición puede ser personalizada para cualquier cultivo dado.

Los microorganismos de las presentes composiciones de tratamiento de suelo pueden ser obtenidos por medio de procesos de cultivación que varía de pequeña a gran escala. Estos procesos de cultivación incluyen, pero no se limitan a, cultivación/fermentación sumergida, fermentación de estado sólido (SSF), y modificaciones, híbridos y/o combinaciones de éstos. En modalidades preferidas, los microbios son cultivados usando SSF o modificaciones de éste.

La composición de tratamiento de suelo puede comprender el sustrato sobrante de fermentación y/o subproductos purificados o no purificados, tal como biotensoactivos, enzimas y/u otros metabolitos. Los microbios pueden ser vivos o inactivos, aunque en modalidades preferidas, los microbios son vivos.

La composición es preferiblemente formulada para aplicación a suelo, semillas, plantas completas, o partes de plantas (incluyendo, pero no limitado a, raíces, tubérculos, tallos, flores y hojas). En ciertas modalidades, la composición es

formulada como, por ejemplo, líquido, polvo, gránulos, microgránulos, bolas, polvo humectable, polvo fluido, emulsiones, microcápsulas, aceites, o aerosoles.

Para mejorar o estabilizar los efectos de la composición, esta se puede mezclar con adyuvantes adecuados y luego es usada como tal o después de dilución, si es necesario. En ciertas modalidades, la composición es formulada como una preparación líquida concentrada, o como un polvo seco o gránulos secos que se pueden mezclar con agua y otros componentes para formar un producto líquido. En una modalidad, la composición comprende el sustrato, microbios y subproductos de crecimiento, mezclados juntos y secados para formar polvo o gránulos.

En una modalidad, la composición puede comprender glucosa (por ejemplo, en la forma de melaza), glicerol, glicerina, y/u otras sustancias osmóticas, para promover la presión osmótica durante el almacenamiento y transporte del producto seco.

En una modalidad, se suministran métodos para mejorar la salud, el crecimiento y/o la producción de la planta en donde una combinación de microorganismos se pone en contacto con la planta y/o su ambiente circundante. El método puede comprender poner en contacto una composición de tratamiento de suelo de la presente invención, que comprende un primer microorganismo y un segundo microorganismo, y/o un subproducto de crecimiento de uno o ambos de estos microorganismos, con la planta y/o su ambiente circundante. Preferiblemente, el primer microorganismo es un hongo *Trichoderma spp.* y el segundo microorganismo es una bacteria *Bacillus spp.*

En ciertas modalidades, los microorganismos de la composición trabajan sinérgicamente entre sí para mejorar la salud, el crecimiento y/o la producción en plantas.

En una modalidad, el método puede mejorar la salud, el crecimiento y/o la producción de la planta al mejorar la salud y el crecimiento de la raíz. Más específicamente, en una modalidad, los métodos pueden ser usados para mejorar

las propiedades de la rizosfera en la cual las raíces de una planta están creciendo, por ejemplo, las propiedades de retención de nutrientes y/o humedad.

Adicionalmente, en una modalidad, el método puede ser usado para inocular la rizosfera de una planta con uno o más microorganismos beneficiosos. Por ejemplo, en modalidades preferidas, los microbios de la composición de tratamiento de suelo pueden colonizar la rizosfera y suministrar múltiples beneficios a una planta cuyas raíces están creciendo allí, incluyendo protección y alimento.

Ventajosamente, en ciertas modalidades, los presentes métodos pueden ser usados para mejorar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento en plantas que tienen la salud inmune comprometida debido a una infección de un agente patogénico o de un estresor ambiental, tal como, por ejemplo, sequía. Así, en ciertas modalidades, los presentes métodos también pueden ser usados para mejorar la salud inmune, o la respuesta inmune, de plantas.

En ciertas modalidades, la composición de tratamiento de suelo se pone en contacto con la parte de una planta. En una modalidad específica, la composición se pone en contacto con una o más raíces de la planta. La composición puede ser aplicada directamente a las raíces, por ejemplo, por rociado o mojado de las raíces, y/o indirectamente, por ejemplo, al administrar la composición al suelo en el cual crece la planta (por ejemplo, la rizosfera). La composición puede ser aplicada a las semillas de la planta antes o al momento de plantar, o a cualquier otra parte de la planta y/o su ambiente circundante.

Las composiciones y métodos de la presente invención pueden ser usados bien sea solos o en combinación con otros compuestos y/o métodos para mejorar eficientemente la salud, el crecimiento y/o el rendimiento de las plantas, y/o para complementar el crecimiento del primer y segundo microbios. Por ejemplo, en una modalidad, la composición puede incluir y/o puede ser aplicada concurrentemente con nutrientes y/o micronutrientes para mejorar el crecimiento de la planta y/o el microbio, tal como magnesio, fosfato, nitrógeno, potasio, selenio, calcio, azufre,

hierro, cobre, y zinc; y/o uno o más prebióticos, tales como extracto de algas, ácido fúlvico, quitina, humato y/o ácido húmico. Los materiales exactos y las cantidades de éstos pueden ser determinadas por un granjero o un científico agrícola que tiene el beneficio de la presente divulgación.

5 Las composiciones y métodos también pueden ser usados en combinación con otros sistemas de manejo de cultivo. En una modalidad, la composición puede opcionalmente comprender, o ser aplicada con, pesticidas y/o repelentes naturales y/o químicos, tales como, por ejemplo, cualquier pesticida comercial y/o casero conocido que sea compatible con la combinación de microorganismos que son
10 aplicados. En algunas modalidades, la composición también puede comprender, o ser aplicada con, por ejemplo, herbicidas, fertilizantes, y/u otras enmiendas de suelo compatibles, incluyendo productos comerciales que contienen fuentes de nutrientes (por ejemplo, nitrógeno-fósforo-potasio (NPK) y/o micronutrientes).

Ventajosamente, la presente invención puede ser usada sin liberar grandes
15 cantidades de compuestos inorgánicos en el ambiente. Adicionalmente, las composiciones y métodos utilizan componentes que son biodegradables y toxicológicamente seguros. Así, la presente invención puede ser usada como un tratamiento de suelo “verde”.

20 **BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS**

Las Figuras 1A-1B muestran la masa de raíz seca (g) de plantas de naranja en Ft. Basinger, Florida (A) y plantas de toronja en Ft. Pierce, Florida (B) tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención (“Rhizolizer™”) y comparado con plantas de control sin tratar
25 (práctica estándar de granjero).

La Figura 2 muestra la masa de raíz seca (g) de plantas de toronja en el Condado St. Lucie, Florida, tratadas con una composición de tratamiento de suelo

de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

Las Figuras 3A-3B muestran la masa de raíz seca de árboles de naranja Hamlin en el Condado Highlands, Florida (A) y árboles de toronja blanca en el
5 Condado St. Lucie, Florida (B), tratados con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

Las Figuras 4A-4B muestran el peso de raíz promedio en árboles de naranja Hamlin en el Condado Polk, Florida (A) y árboles de naranja Valencia en el Condado
10 Collier, Florida (B), tratados con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

Las Figuras 5A-5B muestran el porcentaje de crecimiento de nuevos brotes (A) y conteo promedio de brotes (B) en árboles de naranja Valencia en el Condado
15 Highlands, Florida, tratados con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

Las Figuras 6A-6B muestran el aumento en densidad de dosel para árboles de naranja Hamlin maduros (A) y árboles de naranja Hamlin jóvenes (B) en el
20 Condado Highlands, Florida, tratados con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

La Figura 7 muestra el cambio de calibre promedio en árboles de naranja Valencia jóvenes en el Condado Highlands, Florida, tratados con una composición
25 de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

Las Figuras 8A-8B muestran el peso del fruto para árboles de toronja blanca (A) y el diámetro para árboles de toronja roja rubí (B) en el Condado Charlotte, Florida, tratados con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

Las Figuras 9A-9B muestran las medidas brix para toronjas blancas en el Condado Lucie, Florida (A) y el Condado Charlotte, Florida (B), tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

Las Figuras 10A-10B muestran cajas de peso para naranjas Hamlin en el Condado Lake, Florida, tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

Las Figuras 11A-11B muestran los rendimientos totales de cosecha en libras sólidas para naranjas Hamlin en el Condado Lake, Florida, tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

Las Figuras 12A-12B muestran los rendimientos totales de cosecha en libras sólidas por caja (A) y por acre (B) para naranjas Hamlin en el Condado Polk, Florida, tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

Las Figuras 13A-13B muestran la producción de fruta (toneladas/acre, eje y) para plantas de tomate tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con control sin tratar, chequeo comercial, *T. harzianum* y *B. amyloliquefaciens*

combinado con extracto de papa, *T. harzianum* y *B. amyloliquefaciens* combinado con humato y melaza, y Terra Treat. Las barras sólidas representan el rendimiento de fruta roja (fruta cosechable), mientras que los diamantes negros marcan el rendimiento total de fruta para cada tratamiento (A). Una comparación lado a lado del rendimiento de fruta cosechable entre el control sin tratar y el tratamiento de alga y Rhizolizer™ se muestra en (B).

Las Figuras 14A-14B muestran el aumento en rendimiento de fruta comercializable en mT por acre (A) y grados brix (B) para tomates en el Condado Fresno, California, tratados con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

Las Figuras 15A-15B muestran la masa de raíz seca (g) de plantas de tomate tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™"), comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar). 15B muestra raíces de tomate cosechadas a partir de una planta de tomate. Las raíces de la planta tratada (imagen inferior) fueron visiblemente más densas que la planta de práctica del productor (imagen superior).

Las Figuras 16A-16B muestran mediciones de diámetro de tronco de árbol de almendra cuando es tratado con una composición de acuerdo con una modalidad de la presente invención. 16A muestra el cambio total en crecimiento de tronco de árbol de almendra (diámetro, mm), donde el 6º tratamiento (Rhizolizer™) produjo un cambio en diámetro de tronco de 1.25 mm. El control sin tratar únicamente midió un aumento de 0.96 mm en diámetro de tronco. 16B muestra el crecimiento del tronco con el tiempo de árboles tratados con el tratamiento de Rhizolizer™.

La Figura 17 muestra la floración inicial/asentamiento de nueces para árboles de almendra en el Condado San Joaquin, California, tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención

("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

Las Figuras 18A-18F muestran datos de prueba que comparan el aumento de masa de raíz (A, B), aumento en conteo de flores (C), aumento en conteo de
5 frutas (D), conteo de melón y rendimiento por acre (E), y peso de fruta y valores brix (F) de plantas de sandía tratadas con una composición de acuerdo con una modalidad de la presente invención comparado con plantas de practica de granjero estándar sin tratar.

Las Figuras 19A-19B muestran datos de prueba que comparan conteo de
10 flores (A) y rendimiento cosechable promedio (19B) para plantas de melón tratadas con una composición de acuerdo con una modalidad de la presente invención comparado con plantas de práctica del productor estándar sin tratar.

Las Figuras 20A-20B muestran la aparición de planta de papa en el Condado Imperial, California para papas rojizas rosa amarilla plantadas 5 semanas después
15 de plantado (A) y múltiples cultivares 6 semanas después de plantado (B). Las papas fueron tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

Las Figuras 21A-21B muestran la producción de papa de papas de horneado
20 de mercado fresco Reveille Russet en el Condado Hartley, Texas (A) y papas Russet Burbank en el Condado Walworth, Wisconsin (B). Las paras fueron tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

25 Las Figuras 22A-22B muestran la calidad de cosecha de papa para papas Russet Burbank (A) y el rendimiento por grado para papas Colomba (B). Las papas fueron tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una

modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

Las Figuras 23A-23B muestran el aumento en tamaño de fruta para fresas tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una
5 modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar). Se midió el diámetro de fruta (A-B) y el peso de fruta (C).

La Figura 24 muestra el aumento en Clasificación Brix para fresas tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la
10 presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

La Figura 25 muestra el aumento en ancho de dosel para fresas tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la
15 presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

La Figura 26 muestra el aumento en masa de raíz para fresas tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la
presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

20 La Figura 27 muestra el aumento en conteo de frutas para fresas tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

Las Figuras 28A-28B muestran el aumento en rendimientos de fruta a mitad
25 de temporada para fresas. Se midieron los pisos/acre promedio (A) y los pisos totales (B). Las fresas fueron tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™") y comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

La Figura 29 muestra el aumento en peso de raíz para plantas de maíz tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™"), bien sea una vez en el plantado, una vez a mitad de la temporada, o dos veces (una vez al plantado y una vez a mitad de temporada). Los tres grupos de tratamiento fueron comparados con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

La Figura 30 muestra el aumento en vigor de planta para plantas de maíz tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™"), bien sea una vez al plantado, una vez a mitad de temporada, o dos veces (una vez al plantado y una vez a mitad de temporada). Los tres grupos de tratamiento fueron comparados con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

La Figura 31 muestra el aumento en rendimiento para plantas de maíz tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™"), bien sea una vez al plantado, una vez a mitad de temporada, o dos veces (una vez al plantado y una vez a mitad de temporada). Los tres grupos de tratamiento fueron comparados con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

La Figura 32 muestra el aumento en rendimiento proyectado para dos grupos de plantas de algodón tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™"), comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

La Figura 33 muestra el aumento en clorofila promedio (parte superior izquierda), ancho de hoja promedio (parte superior derecha), y longitud de hoja promedio (inferior) para plantas de tabaco tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™"), comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

La Figura 34 muestra el aumento en rendimiento proyectado para plantas de maní (cacahuate) tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención (“Rhizolizer™”), comparado con plantas de control sin tratar (práctica del productor estándar).

5

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención suministra productos a base de microbio, así como métodos para usar estos productos a base de microbio en aplicaciones agrícolas. Ventajosamente, los productos a base de microbio y los métodos de la presente invención son amigables con el medio ambiente, no tóxicos y económicos.

10

En modalidades preferidas, la presente invención suministra composiciones de tratamiento de suelo basadas en microbio y métodos para su uso para mejorar la salud, crecimiento y rendimiento total de plantas de cultivo, por ejemplo, al mejorar las propiedades de retención de nutrientes y humedad de la rizosfera. Ventajosamente, las composiciones de tratamiento de suelo de la presente invención pueden mejorar, por ejemplo, la salud del cultivo, así como el crecimiento y el rendimiento del cultivo, incluso en situaciones donde una o más de las plantas en un cultivo están infectadas con un patógeno o donde la salud inmune de las plantas de cultivo está comprometida.

15

20

Definiciones Seleccionadas

La presente invención utiliza “composiciones a base de microbio”, lo que significa una composición que comprende componentes que fueron producidas como resultado del crecimiento de microorganismos u otros cultivos celulares. Así, la composición a base de microbio puede comprender los microbios como tal y/o subproductos de crecimiento microbiano. Los microbios pueden estar en un estado vegetativo, en forma de espora o conidio, en forma de hifas, en cualquier otra forma de propágulo, o una mezcla de estos. Los microbios pueden ser plantónicos o en

25

forma de una biopelícula, o una mezcla de éstos. Los subproductos de crecimiento pueden ser, por ejemplo, metabolitos, componentes de membrana celular, proteínas expresadas, y/u otros componentes celulares. Los microbios pueden estar intactos o lisados. En modalidades preferidas, los microbios están presente, con el medio de crecimiento en el que ellos se crecen, en la composición a base de microbio. Los microbios pueden estar presente a, por ejemplo, una concentración de por lo menos 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} o 1×10^{13} o más CFU por gramo o por ml de la composición.

La presente invención además suministra “productos a base de microbio”, los cuales son productos que serán aplicados en la práctica para lograr un resultado deseado. El producto a base de microbio puede ser simplemente la composición a base de microbio cosechada del proceso de cultivación de microbio. Alternativamente, el producto a base de microbio puede comprender ingredientes adicionales que han sido adicionados. Estos ingredientes adicionales pueden incluir, por ejemplo, estabilizantes, amortiguadores, portadores adecuados, tales como agua, soluciones de sal, o cualquier otro portador adecuado, nutrientes añadidos para soportar crecimiento microbiano adicional, mejoradores de crecimiento no nutriente y/o agentes que facilitan el rastreo de los microbios y/o la composición en el ambiente en el que se aplica. El producto a base de microbio también puede comprender mezclas de composiciones a base de microbio. El producto a base de microbio también puede comprender uno o más componentes de una composición a base de microbio que han sido procesados en alguna forma tal como, pero no limitado a, filtrado, centrifugación, lisado, secado, purificación y similares.

Como se usa acá, “cosechado” en el contexto de fermentación de una composición a base de microbio se refiere a la remoción de algo o toda la composición a base de microbio de un recipiente de crecimiento.

Como se usa acá, una “biopelícula” es un agregado complejo de microorganismos, en donde las células se adhieren entre sí y/o a superficies. En algunas modalidades, las células secretan una barrera de polisacárido que rodea todo el agregado. Las células en biopelículas son fisiológicamente distintas de las células plantónicas del mismo organismo, las cuales son células simples que pueden flotar o nadar en medio líquido.

Como se usa acá, un compuesto “aislado” o “purificado” es sustancialmente libre de otros compuestos, tales como material celular, con el cual está asociado en la naturaleza. Un polinucleótido purificado o aislado (ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN)) es libre de los genes o secuencias que lo rodean en su estado que ocurre naturalmente. Un polipéptido purificado o aislado es libre de los aminoácidos o secuencias que lo rodean en su estado que ocurre naturalmente. “Aislado” en el contexto de una cepa microbiana significa que la cepa es removida del ambiente en el cual existe en la naturaleza. Así, la cepa aislada puede existir como, por ejemplo, un cultivo biológicamente puro, o como esporas (u otras formas de la cepa) en asociación con un portador.

Como se usa acá, un “cultivo biológicamente puro” es un cultivo que ha sido aislado de materiales con los cuales está asociado en la naturaleza. En una modalidad preferida, el cultivo ha sido aislado de todas las otras células vivas. En modalidades más preferidas, el cultivo biológicamente puro tiene características ventajosas en comparación con un cultivo del mismo microbio como existe en la naturaleza. Las características ventajosas pueden ser, por ejemplo, producción mejorada de uno o más subproductos de crecimiento.

En ciertas modalidades, los compuestos purificados son por lo menos 60% en peso el compuesto de interés. Preferiblemente, la preparación es por lo menos 75%, más preferiblemente por lo menos 90%, y más preferiblemente por lo menos 99% en peso del compuesto de interés. Por ejemplo, un compuesto purificado es uno que es por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 98%, 99%, o 100% (p/p)

del compuesto deseado en peso. La pureza es medida por cualquier método estándar adecuado, por ejemplo, por cromatografía de columna, cromatografía de capa delgada, o análisis de cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC).

Un “metabolito” se refiere a cualquier sustancia producida por metabolismo (por ejemplo, un subproducto de crecimiento) o una sustancia necesaria para tomar parte en un proceso metabólico particular. Ejemplos de metabolitos incluyen, pero no se limitan a, biotensioactivos, biopolímeros, enzimas, ácidos, solventes, alcoholes, proteínas, vitaminas, minerales, microelementos, y aminoácidos.

Como se usa acá, “modulado” significa hacer una alteración (por ejemplo, aumento o disminución).

Se entiende que los rangos provistos acá son la abreviatura para todos los valores dentro del rango. Por ejemplo, se entiende que un rango de 1 a 20 incluye cualquier número, combinación de números, o subrango del grupo que consiste de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, así como todos los valores decimales que intervienen entre los enteros anteriormente mencionados, tal como, por ejemplo, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, y 1.9. Con respecto a los subrangos, los “subrangos anidados” que se extienden desde cualquier punto extremo del rango están específicamente contemplados. Por ejemplo, un subrango anidado de un rango ejemplar de 1 a 50 puede comprender 1 a 10, 1 a 20, 1 a 30, y 1 a 40 en una dirección, o 50 a 40, 50 a 30, 50 a 20, y 50 a 10 en la otra dirección.

Como se usa acá, “reducir” se refiere a una alteración negativa, y el término “aumentar” se refiere a una alteración positiva, cada una de por lo menos 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, o 100%.

Como se usa acá, “referencia” se refiere a una condición estándar o de control.

Como se usa acá, “tensoactivo” se refiere a un compuesto que reduce la tensión superficial (o tensión interfacial) entre dos líquidos o entre un líquido y un sólido. Los tensoactivos actúan como, por ejemplo, detergentes, agentes

humectantes, emulsionantes, agentes espumantes, y dispersantes. Un “biotensoactivo” es un tensoactivo producido por un organismo vivo.

Como se usa acá, “agricultura” significa la cultivación o cría de plantas, algas y/o hongos para alimento, fibra, biocombustible, medicinas, cosméticos, suplementos, propósitos ornamentales y otros usos. De acuerdo con la presente invención, agricultura también puede incluir horticultura, paisajismo, jardinería, conservación de plantas, huertas y arboricultura. Además, se incluye en la agricultura el cuidado, monitoreo y mantenimiento del suelo.

Como se usa acá, “mejorar” significa mejorar o aumentar. Por ejemplo, salud de planta mejorada significa mejorar la capacidad de la planta de crecer y prosperar, lo cual incluye la capacidad de la planta de rechazar plagas y/o enfermedades, y para sobrevivir estresores ambientales, tales como sequias y/o riego excesivo. El crecimiento de planta mejorado significa aumentar el tamaño y/o la masa de una planta, y/o mejorar la capacidad de la planta de alcanzar un tamaño y/o masa deseada. Rendimientos mejorados significan mejorar la cantidad, calidad (por ejemplo, sabor, textura) y/o tamaño de productos finales producidos por una planta.

Como se usa acá, “prevenir” o “prevención” de una situación u ocurrencia significa retrasar, inhibir, suprimir, evadir, y/o minimizar el comienzo, extensión o progresión de la situación u ocurrencia. La prevención puede incluir, pero no requiere, prevención indefinida, absoluta o completa, lo que significa que el signo o síntoma puede aún desarrollarse posteriormente. La prevención puede incluir reducir la severidad del comienzo de dicha enfermedad, condición o desorden, y/o inhibir el progreso de la condición o desorden a una condición o desorden más severo.

Como se usa acá, el término “control” usado en referencia a una plaga significa matar, deshabilitar, inmovilizar, o reducir los números de población de una plaga, o de otra forma hacer que la plaga sea sustancialmente incapaz de causar daño.

Como se usa acá, una “plaga” es cualquier organismo, diferente a un humano, que es destructivo y/o perjudicial para humanos o asuntos de humanos (por ejemplo, agricultura, horticultura). En algunos, pero no en todos los casos, una plaga puede ser un organismo patogénico. Las plagas pueden causar o ser un vector para infecciones, infestaciones y/o enfermedad, o ellos pueden simplemente alimentarse o causar otro daño físico en el tejido vivo. Las plagas pueden ser organismos unicelulares o multicelulares, incluyendo pero no limitados a, virus, hongos, bacterias, parásitos, y/o nematodos.

Como se usa acá, una “enmienda de suelo” o un “acondicionador de suelo” es cualquier compuesto, material, o combinación de compuestos o materiales que son añadidos al suelo para mejorar las propiedades físicas del suelo. Las enmiendas del suelo pueden incluir materia orgánica e inorgánica, y además pueden incluir, por ejemplo, fertilizantes, pesticidas y/o herbicidas. Un suelo rico en nutrientes y bien drenado es esencial para el crecimiento y la salud de plantas, y así, las enmiendas de suelo pueden ser usadas para mejorar el crecimiento y la salud de plantas al alterar el contenido de nutrientes y humedad de suelo. Las enmiendas del suelo también pueden ser usadas para mejorar varias cualidades diferentes de suelo, incluyendo pero no limitado a, estructura del suelo (por ejemplo, prevenir compactación); mejorar la concentración de nutrientes y las capacidades de almacenamiento; mejorar la retención de agua en suelos secos; y mejorar el drenaje en suelos anegados.

Como se usa acá, “estresor ambiental” se refiere a un antibiótico, o condición no vida que tiene un impacto negativo en un organismo vivo en un ambiente específico. El estresor ambiental debe influenciar el ambiente más allá de su rango normal de variación para afectar adversamente el desempeño de población o fisiología individual del organismo es una forma significativa. Ejemplos de estresores ambientales incluyen, pero no se limitan a, sequía, temperaturas extremas,

inundación, altos vientos, desastres naturales, cambios de pH del suelo, alta radiación, compactación del suelo, contaminación, y otros.

El término transicional “que comprende”, el cual es sinónimo con “que incluye” o “que contiene”, es inclusivo o de extremo abierto y no excluye elementos
5 adicionales no definidos o pasos de método. En contraste, la frase transicional “que consiste de” excluye cualquier elemento, paso, o ingrediente no especificado en la reivindicación. La frase transicional “que consiste esencialmente de” limita el alcance de una reivindicación a los materiales o pasos especificados “y aquellos que no afectan materialmente las características básicas y novedosas” de la
10 invención reivindicada. El uso del término “que comprende” contempla otras modalidades que “consisten” o “consisten esencialmente de” los componentes definidos.

A menos que se indique específicamente o que sea obvio a partir del contexto, como se usa acá, el término “o” se entiende que es inclusivo. A menos
15 que se indique específicamente o que sea obvio a partir del contexto, como se usa acá, los términos “un”, “uno” y “el” se entiende que son singulares y plurales.

A menos que se indique específicamente o que sea obvio a partir del contexto, como se usa acá, el término “aproximadamente” se entiende como dentro de un rango de tolerancia normal en el arte, por ejemplo, dentro de 2 desviaciones
20 estándar de la media. Aproximadamente se puede entender como dentro de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, o 0.01% del valor definido.

La recitación de un listado de grupos químicos en cualquier definición de una variable acá incluye las definiciones de esta variable como cualquier grupo simple
25 o combinación de grupos definidos. La recitación de una modalidad para una variable o aspecto acá incluye esa modalidad como cualquier modalidad simple o en combinación con cualquier otra modalidad o porciones de ésta.

Todas las referencias citadas acá se incorporan acá por referencia en su totalidad.

Composiciones de Tratamiento de Suelo

5 En una modalidad, la presente invención suministra composiciones de tratamiento de suelo que comprenden una combinación de microorganismos y/o sus subproductos de crecimiento. La composición de tratamiento de suelo puede ser usada para mejorar la salud, crecimiento y/o rendimiento de la planta, y en algunas modalidades, incluso en plantas que han sido infectadas por un patógeno o

10 enfermedad. Más específicamente, las presentes composiciones pueden ser usadas para mejorar el crecimiento y la salud de la raíz, y/o para mejorar la salud inmune de una planta. En ciertas modalidades, la composición de tratamiento de suelo también puede ser usada para inocular las raíces de la planta con uno o más microorganismos beneficiosos.

15 Ventajosamente, las composiciones a base de microbio de acuerdo con la presente invención son no tóxicas y pueden ser aplicadas en altas concentraciones sin causar irritación, por ejemplo, a la piel o el tracto digestivo de un humano u otro animal no plaga. Así, la presente invención es particularmente útil donde la aplicación de las composiciones a base de microbio ocurre en la presencia de

20 organismos vivos, tales como granjeros y ganado.

 En una modalidad, la composición de tratamiento de suelo puede comprender un primer microorganismo, el cual es preferiblemente una cepa fúngica formadora de conidios (formadora de esporas), y un segundo microorganismo, el cual es preferiblemente una cepa bacteriana formadora de esporas.

25 Preferiblemente, el primer microorganismo es un hongo *Trichoderma spp.* y el segundo microorganismo es una bacteria *Bacillus spp.* formadora de esporas, aunque se contemplan otras combinaciones. En ciertas modalidades, la composición comprende *Trichoderma harzianum* y *Bacillus amyloliquefaciens*. En

una modalidad específica, la cepa de *B. amyloliquefaciens* es *B. amyloliquefaciens subsp. locus*.

En una modalidad, la composición puede comprender de 1 a 99% de *Trichoderma* en peso y de 99 a 1% de *Bacillus* en peso. En algunas modalidades, la relación de conteo celular de *Trichoderma* a *Bacillus* es aproximadamente 1:9 a aproximadamente 9:1, aproximadamente 1:8 a aproximadamente 8:1, aproximadamente 1:7 a aproximadamente 7:1, aproximadamente 1:6 a aproximadamente 6:1, aproximadamente 1:5 a aproximadamente 5:1, o aproximadamente 1:4 a aproximadamente 4:1.

En una modalidad, los microorganismos de la presente composición comprenden aproximadamente 5 a 20% de la composición total en peso, o aproximadamente 8 a 15%, o aproximadamente 10 a 12%. En una modalidad, la composición comprende aproximadamente 1×10^6 a 1×10^{12} , 1×10^7 a 1×10^{11} , 1×10^8 a 1×10^{10} , o 1×10^9 CFU/ml de *Trichoderma*. En una modalidad específica, la composición comprende aproximadamente 1×10^6 a 1×10^{12} , 1×10^7 a 1×10^{11} , 1×10^8 a 1×10^{10} , o 1×10^9 CFU/ml de *Bacillus*.

En algunas modalidades, la composición puede además comprender uno o más microbios adicionales. En una modalidad, los microbios adicionales pueden comprender uno o más de, por ejemplo, una microbacteria y/u otro tipo de bacteria, una levadura y/o un hongo. En una modalidad ejemplar, se incluye una micobacteria, en donde la micobacteria es *Myxococcus xanthus*.

En ciertas modalidades, los microbios adicionales son capaces de fijar, solubilizar y/o movilizar nitrógeno, potasio, fósforo (o fosfato) y/u otros micronutrientes en el suelo. En una modalidad, una bacteria de fijación de nitrógeno puede ser incluida, tal como, por ejemplo, *Azotobacter vinelandii*. En otra modalidad, se puede incluir una bacteria movilizadora de potasio, tal como, por ejemplo, *Frateuria aurantia*.

Otros microbios adicionales pueden incluir, por ejemplo, *Pseudomonas chlororaphis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Starmerella bombicola*, *Saccharomyces boulardii*, *Pichia occidentalis*, *Pichia kudriavzevii*, y/o *Meyerozyma guilliermondii*.

5 En una modalidad específica, el uno o más microbios adicionales son adicionados a una concentración de 1×10^8 a 1×10^{11} , o 1×10^9 a 1×10^{10} CFU/ml cada uno.

Las especies y las relaciones de microorganismos y otros ingredientes en la composición pueden ser personalizados de acuerdo con, por ejemplo, la planta que
10 es tratada, el tipo de suelo donde la planta está creciendo, la salud de la planta al momento del tratamiento, así como otros factores.

Los microbios y las composiciones a base de microbio de la presente invención tienen un número de propiedades beneficiosas que son útiles para mejorar la salud de la planta, el crecimiento y/o el rendimiento. Por ejemplo, las
15 composiciones pueden comprender productos que resultan del crecimiento de los microorganismos, tal como biotensoactivos, proteínas y/o enzimas, bien sea en forma purificada o cruda.

En una modalidad, los microorganismos de la presente composición son capaces de producir un biotensoactivo. En otra modalidad, los biotensoactivos
20 pueden ser productos de forma separada por otros microorganismos y son adicionados a la composición, bien sea en forma purificada o en forma cruda. Los biotensoactivos de forma cruda pueden comprender, por ejemplo, biotensoactivos y otros productos de crecimiento celular en el medio de fermentación sobrante de la cultivación de un microbio productor de biotensoactivo. Esta composición de
25 biotensoactivo en forma cruda puede comprende de aproximadamente 0.001% a aproximadamente 90%, aproximadamente 25% a aproximadamente 75%, aproximadamente 30% a aproximadamente 70%, aproximadamente 35% a aproximadamente 65%, aproximadamente 40% a aproximadamente 60%,

aproximadamente 45% a aproximadamente 55%, o aproximadamente 50% del biotensoactivo puro.

Los biotensoactivos forman una clase importante de metabolitos secundarios producidos por una variedad de microorganismos tales como bacterias, hongos, y
5 levaduras. Como moléculas anfifílicas, los biotensoactivos microbianos reducen las tensiones superficiales e interfaciales entre las moléculas de líquidos, sólidos, y gases. Además, los biotensoactivos de acuerdo con la presente invención son biodegradables, tienen baja toxicidad, son efectivos en solubilizar y degradar compuestos insolubles en el suelo y pueden ser producidos usando recursos de
10 bajo costo y renovables. Ellos pueden exhibir adhesión de microorganismos indeseables a una variedad de superficies, prevenir la formación de biopelículas, y pueden tener poderosas propiedades emulsionantes y demulsificantes. Además, los biotensoactivos también pueden ser usados para mejorar la humectabilidad y para lograr solubilización y/o distribución uniforme de fertilizantes, nutrientes, y agua en
15 el suelo.

Los biotensoactivos de acuerdo con los presentes métodos pueden seleccionarse de, por ejemplo, glicolípidos de bajo peso molecular (por ejemplo, soforolípidos, lípidos de celobiosa, ramnolípidos, lípidos de manosileritritol y lípidos de trehalosa), lipopéptidos (por ejemplo, surfactina, iturina, fengicina, artrofactina y
20 liquenisina), flavolípidos, fosfolípidos (por ejemplo, cardiolipinas), y polímeros de alto peso molecular tal como lipoproteínas, complejos de lipopolisacárido-proteína, y complejos de polisacárido-proteína-ácido graso.

La composición puede comprender uno o más biotensoactivos a una concentración de 0.001% a 10%, 0.01% a 5%, 0.05% a 2%, y/o de 0.1% a 1%.

25 Ventajosamente, de acuerdo con la presente invención, la composición de tratamiento de suelo puede comprender el medio en el cual cada uno de los microorganismos crecieron. La composición puede ser, por ejemplo, por lo menos, en peso, 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, o 100% de medio de crecimiento.

El medio de fermentación puede contener un subproducto de crecimiento en forma de cultivo, purificado o crudo vivo y/o inactivo, tal como biotensoactivos, enzimas, y/u otros metabolitos, y/o cualquier nutriente residual. La cantidad de biomasa en la composición, en peso, puede ser, por ejemplo, cualquiera de

5 aproximadamente 0.01% a 100%, aproximadamente 1% a 90%, aproximadamente 5% a aproximadamente 80%, o aproximadamente 10% a aproximadamente 75%.

El producto de fermentación puede ser usado directamente, con o sin extracción o purificación. Si se desea, la extracción y purificación pueden ser logradas fácilmente usando métodos de extracción y/o purificación estándar o

10 técnicas descritas en la literatura.

Los microorganismos en la composición de tratamiento de suelo pueden estar en una forma activa o inactiva, o en la forma de células vegetales, esporas reproductivas, micelios, hifas, conidios o cualquier otra forma de propágulo microbiano. La composición también puede contener una composición de

15 cualquiera de estas formas microbianas.

En una modalidad, diferentes especies de microorganismos se crecen de forma separada y luego se mezclan juntos para producir la composición de tratamiento de suelo. En una modalidad, los microorganismos pueden ser co-cultivados, por ejemplo, *B. amyloliquefaciens* y *M. xanthus*.

En una modalidad, la composición es preferiblemente formulada para aplicación al suelo, semillas, plantas completas, o partes de planta (incluyendo, pero no limitado a, raíces, tubérculos, tallos, flores y hojas). En ciertas modalidades, la composición es formulada como, por ejemplo, líquido, polvo, gránulos, microgránulos, bolas, polvo humectable, polvo fluido, emulsiones, microcápsulas,

20 aceites, o aerosoles.

Para mejorar o estabilizar los efectos de la composición, esta se puede mezclar con adyuvantes adecuados y luego es usada como tal o después de dilución, si es necesario. En modalidades preferidas, la composición es formulada

como un líquido, un líquido concentrado, o como polvo seco o gránulos que pueden mezclarse con agua y otros componentes para formar un producto líquido.

En una modalidad, la composición puede comprender glucosa (por ejemplo, en la forma de melaza), glicerol y/o glicerina, como, o en adición a, una sustancia
5 osmótica, para promover la presión osmótica durante el almacenamiento y el transporte del producto seco.

Las composiciones pueden ser usadas bien sea solas o en combinación con otros compuestos y/o métodos para mejorar eficientemente la salud, el crecimiento y/o el rendimiento de la planta, y/o para complementar el crecimiento del primer y
10 segundo microbios. Por ejemplo, en una modalidad, la composición puede incluir y/o puede ser aplicada concurrentemente con nutrientes y/o micronutrientes para mejorar el crecimiento de la planta y/o del microbio, tal como magnesio, fosfato, nitrógeno, potasio, selenio, calcio, azufre, hierro, cobre, y zinc; y/o uno o más prebióticos, tal como extracto de algas, ácido fúlvico, quitina, humato y/o ácido
15 húmico. Los materiales y las cantidades exactas de éstos pueden ser determinadas por un granjero o un científico agrícola que tiene el beneficio de la presente divulgación.

Las composiciones también pueden ser usadas en combinación con otros compuestos agrícolas y/o sistemas de manejo de cultivo. En una modalidad, la
20 composición puede opcionalmente comprender, o ser aplicada con, por ejemplo, pesticidas, repelentes, herbicidas, fertilizantes, tratamientos de agua, tensoactivos no iónicos y/o enmiendas de suelo naturales y/o químicos. Preferiblemente, sin embargo, la composición no comprende y/o no es usada con benomilo, cloruro de amonio de dimetilo de dodecilo, dióxido de hidrógeno/ácido peroxiacético, imazilil,
25 propiconazol, tebuconazol, o triflumizol.

Si la composición es mezclada con aditivos químicos compatibles, los químicos son preferiblemente diluidos con agua antes de la adición a la presente composición.

Se pueden adicionar componentes adicionales a la composición, por ejemplo, agentes amortiguadores, portadores, otras composiciones a base de microbio producidas en la misma o en diferente instalación, modificadores de viscosidad, conservantes, nutrientes para crecimiento de microbio, agentes de rastreo, biocidas, otros microbios, tensoactivos, agentes emulsionantes, lubricantes, agentes de control de solubilidad, agentes de ajuste de pH, conservantes, estabilizantes y/o agentes resistentes a luz ultravioleta.

El pH de la composición a base de microbio debe ser adecuada para el microorganismo de interés. En una modalidad preferida, el pH de la composición es aproximadamente 3.5 a 7.0, aproximadamente 4.0 a 6.5, o aproximadamente 5.0.

Opcionalmente, la composición puede ser almacenada antes de su uso. El tiempo de almacenamiento es preferiblemente corto. Así, el tiempo de almacenamiento puede ser menor 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 modalidad preferida, si hay células vivas presentes en el producto, el producto es almacenado a temperaturas frías tales como, por ejemplo, menos de 20°C, 15°C, 10°C, o 5°C.

Las composiciones a base de microbio pueden ser usadas sin estabilización, conservación, y almacenamiento adicional, sin embargo. Ventajosamente, el uso directo de estas composiciones a base de microbio conserva una alta viabilidad de los microorganismos, reduce la posibilidad de contaminación de agentes extraños y microorganismos indeseados, y mantiene la actividad de los subproductos de crecimiento microbiano.

En otras modalidades, la composición (microbios, medio de crecimiento, o microbios y medio) puede ser ubicada en contenedores de tamaño adecuado, teniendo en consideración, por ejemplo, el uso destinado, el método contemplado de aplicación, el tamaño del recipiente de fermentación, y cualquier modo de transporte desde la instalación de crecimiento de microbio a la ubicación de uso. Así, los contenedores en los cuales se ubica la composición a base de microbio

pueden ser, por ejemplo, de 1 pinta a 1000 galones o más. En ciertas modalidades, los contenedores son de 1 galón, 2 galones, 5 galones, 25 galones, o más grandes.

Crecimiento de Microbios de Acuerdo con la Presente Invención

5 La presente invención utiliza métodos para cultivación de microorganismos y producción de metabolitos microbianos y/u otros subproductos de crecimiento microbiano. La presente invención además utiliza procesos de cultivación que son adecuados para cultivación de microorganismos y producción de metabolitos microbianos a una escala deseada. Estos procesos de cultivación incluyen, pero no
10 se limitan a, cultivación/fermentación sumergida, fermentación de estado sólido (SSF), y modificaciones, híbridos y/o combinaciones de éstos.

 Como se usa acá, “fermentación” se refiere a cultivación o crecimiento de células bajo condiciones controladas. El crecimiento puede ser aeróbico o anaeróbico. En modalidades preferidas, los microorganismos se crecen usando
15 SSF y/o versiones modificaciones de éste.

 En una modalidad, la presente invención suministra materiales y métodos para la producción de biomasa (por ejemplo, material celular viable), metabolitos extracelulares (por ejemplo, moléculas pequeñas y proteínas excretadas), nutrientes residuales y/o componentes intracelulares (por ejemplo, enzimas y otras
20 proteínas).

 El recipiente de crecimiento de microbio usado de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier fermentador o reactor de cultivación para uso industrial. En una modalidad, el recipiente puede tener controles/sensores funcionales o puede conectarse a controles/sensores funcionales para medir
25 factores importantes en el proceso de cultivación, tal como pH, oxígeno, presión, temperatura, humedad, densidad microbiana y/o concentración de metabolito.

 En una modalidad adicional, el recipiente también puede ser capaz de monitorear el crecimiento de microorganismos dentro del recipiente (por ejemplo,

medición de número de células y fases de crecimiento). Alternativamente, se puede tomar una muestra diaria del recipiente y se somete a enumeración por técnicas conocidas en el arte, tal como técnica de dilución en placas. La dilución en placas es una técnica simple usada para calcular el número de organismos en una muestra.

- 5 La técnica puede también suministrar un índice por el cual se pueden comparar diferentes ambientes o tratamientos.

En una modalidad, el método incluye complementar la cultivación 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, amoniaco, urea,
10 y/o cloruro de amonio. Estas fuentes de nitrógeno pueden ser usadas de forma independiente o en una combinación de dos o más.

El método puede suministrar oxigenación al cultivo de crecimiento. Una modalidad utiliza movimiento lento de aire para remover aire que contiene bajo oxígeno e introducir aire oxigenado. En el caso de fermentación sumergida, el aire
15 oxigenado puede ser aire ambiente complementado diariamente a través de mecanismos que incluyen propulsores para agitación mecánica de líquido, y aspersores de aire para suministrar burbujas de gas al líquido para disolución de oxígeno en el líquido.

El método además puede comprender complementar la cultivación con una
20 fuente de carbono. La fuente de carbono es típicamente un carbohidrato, tal como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, trehalosa, manosa, manitol, y/o maltosa; ácidos 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
25 aceites, tales como aceite de soya, aceite de canola, aceite de salvado de arroz, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de sésamo, y/o aceite de linaza; etc. Estas fuentes de carbono pueden ser usadas de forma independiente o en una combinación de dos o más.

En una modalidad, los factores de crecimiento y los nutrientes de rastreo para microorganismos están incluidos en el medio. Esto es particularmente preferido cuando se crecen microbios que son incapaces de producir todas las vitaminas que requieren. También se pueden incluir nutrientes inorgánicos, incluyendo elementos de rastreo tales como hierro, zinc, cobre, manganeso, molibdeno y/o cobalto en el medio. Además, fuentes de vitaminas, aminoácidos esenciales, y microelementos pueden ser incluidos, por ejemplo, en la forma de harinas o comidas, tales como harina de maíz, o en la forma de extractos, tales como extracto de levadura, extracto de papa, extracto de carne, extracto de soya, extracto de cáscara de banano, y similares, o en formas purificadas. También se pueden incluir aminoácidos tales como, por ejemplo, aquellos útiles para biosíntesis de proteínas.

En una modalidad, también se pueden incluir sales inorgánicas. Las sales inorgánicas utilizables pueden ser fosfato de dihidrógeno de potasio, fosfato de hidrógeno de dipotasio, fosfato de hidrógeno de disodio, 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, cloruro de sodio, carbonato de calcio, y/o carbonato de sodio. Estas sales inorgánicas pueden ser usadas de forma independiente o en una combinación de dos o más.

En algunas modalidades, el método para cultivación puede además comprende adicionar ácidos y/o antimicrobianos adicionales en el medio antes, y/o durante el proceso de cultivación. Los agentes antimicrobianos o antibióticos son usados para proteger el cultivo de contaminación.

Adicionalmente, también se pueden adicionar agentes antiespumantes para prevenir la formación y/o acumulación de espuma durante la cultivación sumergida.

El pH de la mezcla debe ser adecuado para el microorganismo de interés. Amortiguadores, y reguladores pH, tales como carbonatos y fosfatos, pueden ser usados para estabilizar el pH cercano a un valor preferido. Cuando hay iones de

metal presentes en altas concentraciones, puede ser necesario el uso de un agente quelante en el medio.

Los microbios se pueden crecer en forma plantónica o como biopelícula. En el caso de biopelícula, el recipiente puede tener dentro de éste un sustrato con el cual los microbios pueden crecer en un estado de biopelícula. El sistema también
5 puede tener, por ejemplo, la capacidad de aplicar estímulo (tal como esfuerzo cortante) que promueve y/o mejora las características de crecimiento de la biopelícula.

En una modalidad, el método para cultivación de microorganismos es llevado
10 a cabo de aproximadamente 5 a aproximadamente 100°C, preferiblemente 15 a 60°C, más preferiblemente 25 a 50°C. En una modalidad adicional, la cultivación se lleva a cabo continuamente a una temperatura constante. En otra modalidad, la cultivación puede estar sujeta a temperaturas cambiantes.

En una modalidad, el equipo usado en el método y el proceso de cultivación
15 es estéril. El equipo de cultivación tal como el reactor/recipiente puede ser separado de, pero conectado a, una unidad de esterilización, por ejemplo, una autoclave. El equipo de cultivación también puede tener una unidad de esterilización que esteriliza *in situ* antes de empezar la inoculación. El aire se puede esterilizar por métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, el aire ambiente puede pasar a través
20 de por lo menos un filtro antes de ser introducido en el recipiente. En otras modalidades, el medio puede ser pasteurizado u opcionalmente sin calor adicionado, donde el uso de baja actividad de agua y bajo pH puede explotarse para controlar el crecimiento indeseado bacteriano.

En una modalidad, la presente invención además suministra un método para
25 producir metabolitos microbianos tales como, por ejemplo biotensoactivos, enzimas, proteínas, etanol, ácido láctico, beta glucano, péptidos, intermedios metabólicos, ácido graso poliinsaturado, y lípidos, al cultivar una cepa de microbio de la presente invención bajo condiciones adecuadas para el crecimiento y producción de

metabolito; y, opcionalmente, purificar el metabolito. El contenido de metabolito producido por el método puede ser, por ejemplo, por lo menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90%.

5 El subproducto de crecimiento microbiano producido por los microorganismos de interés puede ser retenido en los microorganismos o ser secretado en el medio de crecimiento. El medio puede contener compuestos que estabilizan la actividad del subproducto de crecimiento microbiano.

El contenido de biomasa del medio de fermentación puede ser, por ejemplo, de 5 g/l a 180 g/l o más, o de 10 g/l a 150 g/l.

10 La concentración celular puede ser, por ejemplo, por lo menos 1×10^6 a 1×10^{12} , 1×10^7 a 1×10^{11} , 1×10^8 a 1×10^{10} , o 1×10^9 CFU/ml.

El método y equipo para cultivación de microorganismos y producción de los subproductos microbianos puede ser realizado en un proceso por lotes, un proceso casi continuo, o un proceso continuo.

15 En una modalidad, toda la composición de cultivación microbiana es removida al completar la cultivación (por ejemplo, al lograr una densidad celular deseada, o densidad de un metabolito especificada). En este procedimiento por lotes, se inicia un lote completamente nuevo al cosechar el primer lote.

En otra modalidad, únicamente una porción del producto de fermentación es
20 removida en cualquier momento. En esta modalidad, la biomasa con células viables, esporas, conidios, hifas y/o micelios permanece en el recipiente como un inoculante para un nuevo lote de cultivación. La composición que es removida puede ser un medio libre de célula o contener células, esporas, u otros propágulos reproductivos, y/o una combinación de éstos. De esta forma, se crea un sistema casi continuo.

25 Ventajosamente, el método no requiere equipos complicados o alto consumo de energía. Los microorganismos de interés pueden ser cultivados a pequeña o gran escala en el sitio y son utilizados incluso cuando aún son mezclados con su medio.

Ventajosamente, los productos a base de microbio pueden ser producidos en ubicaciones remotas. Las instalaciones de crecimiento de microbio pueden operar fuera de la red mediante el uso de, por ejemplo, energía solar, eólica y/o hidroeléctrica.

5

Cepas Microbianas

Los microorganismos útiles de acuerdo con la presente invención pueden ser, por ejemplo, cepas no patogénicas de bacteria, levadura y/u hongo. Estos microorganismos pueden ser naturales, o microorganismos genéticamente modificados. Por ejemplo, los microorganismos se pueden transformar con genes específicos para exhibir características específicas. Los microorganismos también pueden ser mutantes de una cepa deseada. Como se usa acá, “mutante” significa una cepa, variante genética o subtipo de un microorganismo de referencia, en donde el mutante tiene una o más variaciones genéticas (por ejemplo, una mutación de punto, una mutación sin sentido, una eliminación, duplicación, mutación de marco o expansión de repetición) en comparación con el microorganismo de referencia. Los procedimientos para hacer mutantes son bien conocidos en el arte microbiológico. Por ejemplo, la mutagénesis UV y nitrosoguanidina son usadas extensivamente hacia este fin.

20

En una modalidad, el microorganismo es una levadura o un hongo. Las especies de levaduras u hongos para uso de acuerdo con la presente invención incluyen *Aureobasidium* (por ejemplo, *A. pullulans*), *Blakeslea*, *Candida* (por ejemplo, *C. apicola*, *C. bombicola*, *C. nodaensis*), *Cryptococcus*, *Debaryomyces* (por ejemplo, *D. hansenii*), *Entomophthora* , *Hanseniaspora*, (por ejemplo, *H. uvaruni*), *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces* (por ejemplo, *K. phaffii*), *Mortierella*, *Mycorrhiza* , *Penicillium*, *Phycomyces* , *Pichia* (por ejemplo, *P. anomala*, *P. guilliermondii* , *P. occidentals*, *P. kudriavzevii*), *Pleurotus spp.* (por ejemplo, *P. ostreatus*), *Pseudozyma* (por ejemplo, *P. aphidis*), *Saccharomyces* (por ejemplo, *S.*

25

boulardii sequela, *S. cerevisiae* , *S. torula*), *Slarmerella* (por ejemplo, *S. bombicola*), *Torulopsis*, *Trichoderma* (por ejemplo, *T. reesei*, *T. harzianum* , *T. hamatum*, *T. viride*), *Ustilago* (por ejemplo, *U. maydis*), *Wickerhamomyces* (por ejemplo, *W. anomalus*), *Williopsis* (por ejemplo, *W. mrakii*), *Zygosaccharomyces* (por ejemplo, *Z. bailii*), y otros.

En una modalidad preferida, el microorganismo es un hongo *Trichoderma spp.* productor de espora. En una modalidad preferida específica, el microorganismo es *Trichoderma harzianum*.

Ciertas especies de *Trichoderma* son útiles cuando se adicionan al suelo, donde ellas se pueden multiplicar y crecer en asociación cercada con las raíces de las plantas. Ellas son capaces de proteger parcialmente las raíces de invasión por otros hongos patogénicos de plantas y otras plagas microbianas y animales, adicional a ayudar a estimular el crecimiento de la planta.

Trichoderma puede establecer colonización fuerte y duradera de las superficies de la raíz, penetrándola en la epidermis y las células subsuperficiales poco profundas. Estas asociaciones raíz-microorganismo causa cambios sustanciales al proteoma y el metabolismo de la planta. Ellos producen y/o liberan una variedad de compuestos que incluyen respuestas de resistencia localizada o sistémica, causando una falta de patogenicidad a plantas.

Adicionalmente, las plantas se protegen de numerosas clases de patógeno de planta mediante respuestas que son similares a la resistencia sistémica adquirida y la resistencia sistémica inducida por rizobacteria. *Trichoderma spp.* puede reducir efectivamente enfermedades causadas algunos patógenos de planta transmitidos por el suelo. Por ejemplo, las especies *T. harzianum*, *T. hamatum*, y *T. viride* tienen actividad fungicida contra *Sclerotium*, *Rhizoctonia*, *Solani*, *Pythium*, *Fusarium*, *Cercospora*, *Ralstonia*, *Fragaria*, *Rhizopus*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Magnaporthe*, y varios otros. Además, algunas cepas de *Trichoderma* son capaces de suprimir

efectivamente el crecimiento de algunos patógenos virales y bacterianos de planta y suelo, así como producir algunos efectos nematocidas significativos.

Adicional a proteger plantas de patógenos y plagas, la colonización de la raíz por parte de *Trichoderma spp.* puede mejorar el crecimiento de la raíz y el desarrollo, la productividad de cultivo, la resistencia a tensiones abióticas, y la biodisponibilidad de nutrientes.

En ciertas modalidades, los microorganismos son bacterias, incluyendo bacterias grampositivas y gramnegativas. Las bacterias pueden ser, por ejemplo, *Agrobacterium* (por ejemplo, *A. radiobacter*), *Azotobacter* (*A. vinelandii*, *A. chroococcum*), *Azospirillum* (por ejemplo, *A. brasiliensis*), *Bacillus* (por ejemplo, *B. amyloliquefaciens*, *B. circulans*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *Bacillus mucilaginosus*, *B. subtilis*), *Fratureia* (por ejemplo, *F. aurantia*), *Microbacterium* (por ejemplo, *M. laevaniformans*), *myxobacteria* (por ejemplo, *Myxococcus xanthus*, *Stigmatella aurantiaca*, *Sorangium cellulosum*, *Minicystis rosea*), *Pantoea* (por ejemplo, *P. agglomerans*), *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* (Kluyver), *P. putida*), *Rhizobium spp.*, *Rhodospirillum* (por ejemplo, *R. rubrum*), *Sphingomonas* (por ejemplo, *S. paucimobilis*), y/o *Thiohacillus thiooxidans* (*Acidithiobacillus thiooxidans*)

En una modalidad específica, el microorganismo es *Bacillus amyloliquefaciens*, tal como, por ejemplo, la cepa *B. amyloliquefaciens subsp. locus*. En algunas modalidades, el microbio *Bacillus* puede solubilizar compuestos de fósforo en el suelo.

En una modalidad, el microorganismo es una micobacteria, o bacteria formadora de limo. Específicamente, en una modalidad, la micobacteria es una bacteria *Myxococcus spp*, por ejemplo, *M. xanthus*.

En ciertas modalidades, el microorganismo es uno que es capaz de fijar y/o solubilizar nitrógeno, potasio, fósforo y/o sus micronutrientes en el suelo.

En una modalidad, el microorganismo es un microorganismo fijador de nitrógeno, o un diazotrofo, seleccionado de especies de, por ejemplo, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Chlorobiaceae*, *Cyanothece*, *Frankia*, *Klebsiella*, *rhizobia*, *Trichodesmium*, y algunos *Archaea*. En una modalidad específica, la bacteria de fijación de nitrógeno es *Azotobacter vinelandii*.

En otra modalidad, el microorganismo es un microorganismo movilizador de potasio, o KMB, seleccionado de, por ejemplo, *Bacillus mucilaginosus*, *Frateuria aurantia* o *Glomus mosseae*. En una modalidad específica, el microorganismo movilizador de potasio es *Frateuria aurantia*.

Microbios adicionales pueden incluir, por ejemplo, *Pseudomonas chlororaphis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Starmerella bombicola*, *Saccharomyces boulardii*, *Pichia occidentalis*, *Pichia kudriavzevii*, y/o *Meyerozyma guilliermondii*.

En una modalidad, la combinación de microorganismos aplicados a una planta y/o su ambiente circundante se personaliza para una planta y/o ambiente dado. Ventajosamente, en algunas modalidades, la combinación de microbios trabajan sinérgicamente entre sí para mejorar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento de la planta.

Preparación de Productos a Base de Microbio

Un producto a base de microbio de la presente invención es simplemente el medio de fermentación que contiene los microorganismos y/o los metabolitos microbianos producidos por los microorganismos y/o cualquier nutriente residual. El producto de fermentación puede ser usado directamente sin extracción o purificación. Si se desea, la extracción y purificación pueden lograrse fácilmente usando métodos estándar de extracción y/o purificación o técnicas descritas en la literatura.

Los microorganismos en los productos a base de microbio pueden estar en forma activa o inactiva, o en la forma de células vegetales, esporas reproductivas, conidios, micelios, hifas, o cualquier otra forma de propágulo microbiano. Los productos a base de microbio también pueden contener una combinación de
5 cualquiera de estas formas de microorganismo.

En una modalidad, diferentes cepas de microbio se crecen de forma separada y luego se mezclan juntas para producir el producto a base de microbio. Los microbios pueden, opcionalmente, mezclarse con el medio en el cual crecen y se secan antes de mezclarse.

10 En una modalidad, las diferentes cepas no se mezclan juntas, sino que son aplicadas a una planta y/o su ambiente como productos a base de microbio separados.

Los productos a base de microbio pueden ser usados sin estabilización, conservación, y almacenamiento adicional. Ventajosamente, el uso directo de estos
15 productos a base de microbio conserva una alta viabilidad de los microorganismos, reduce la posibilidad de contaminación de agentes extraños y microorganismo indeseables, y mantiene la actividad de los subproductos de crecimiento microbiano.

Al cosechar la composición a base de microbio de los recipientes de crecimiento, se pueden adicionar componentes adicionales a medida que el
20 producto cosechado se ubica en contenedores o es transportado para su uso. Los aditivos pueden ser, por ejemplo, amortiguadores, portadores, otras composiciones a base de microbio producidas en la misma o diferente instalación, modificadores de viscosidad, conservantes, nutrientes para crecimiento de microbios, tensoactivos, agentes emulsionantes, lubricantes, agentes de control de solubilidad,
25 agentes de rastreo, solventes, biocidas, antibióticos, agentes de ajuste de pH, quelantes, estabilizantes, agentes resistentes a luz ultravioleta, otros microbios y otros aditivos adecuados que son usados de forma personalizada para dichas preparaciones.

En una modalidad, se pueden adicionar agentes amortiguadores que incluyen ácidos orgánicos y aminoácidos o sus sales. Los amortiguadores adecuados pueden incluir citrato, gluconato, tartarato, malato, acetato, lactato, oxalato, aspartato, malonato, glucoheptonato, piruvato, galactarato, glucarato, tartronato, glutamato, glicina, lisina, glutamina, metionina, cisteína, arginina y una mezcla de éstos. Ácidos fosfóricos y de fósforo o sus sales también pueden ser usados. Amortiguadores sintéticos son adecuados para ser usados, pero es preferible utilizar amortiguadores naturales, tales como ácidos orgánicos y aminoácidos o sus sales indicadas anteriormente.

En una modalidad adicional, los agentes de ajuste de pH incluyen hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, carbonato de potasio o bicarbonato, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico o una mezcla.

El pH de la composición a base de microbio debe ser adecuado para el microorganismo de interés. En una modalidad preferida, el pH de la composición es aproximadamente 3.5 a 7.0, aproximadamente 4.0 a 6.5, o aproximadamente 5.0.

En una modalidad, componentes adicionales tales como una preparación acuosa de una sal, tal como bicarbonato de sodio o carbonato, sulfato de sodio, fosfato de sodio, bifosfato de sodio, pueden incluirse en la formulación.

En ciertas modalidades, una sustancia adherente puede adicionarse a la composición para prolongar la adherencia del producto a las partes de la planta. Se pueden usar polímeros, tales como polímeros cargados, o sustancias a base de polisacárido, por ejemplo, goma de xantano, goma de guar, levan, xilinan, goma gellan, curdlan, pululan, dextrano y otros.

En modalidades preferidas, goma de xantano de grado comercial es usado como el adherente. La concentración de la goma se debe seleccionar con base en el contenido de la goma en el producto comercial. Si la goma de xantano es altamente pura, entonces 0.001% (p/v – goma de xantano/solución) es suficiente.

En una modalidad, se puede adicionar glucosa, glicerol y/o glicerina al producto a base de microbio para servir como, por ejemplo, un osmótico durante almacenamiento y transporte. En una modalidad, se puede incluir melaza.

En una modalidad, se pueden adicionar prebióticos y/o aplicarlos concurrentemente con el producto a base de microbio para mejorar el crecimiento microbiano. Prebióticos adecuados incluyen, por ejemplo, extracto de algas, ácido fúlvico, quitina, humato y/o ácido húmico. En una modalidad específica, la cantidad de prebióticos aplicada es aproximadamente 0.1 L/acre a aproximadamente 0.5 L/acre, o aproximadamente 0.2 L/acre a aproximadamente 0.4 L/acre.

Opcionalmente, el producto puede ser almacenado antes de su uso. El tiempo de almacenamiento es preferiblemente corto. Así, el tiempo de almacenamiento puede ser menor 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 modalidad preferida, si hay células vivas presente en el producto, el producto es almacenado a una temperatura fría tal como, por ejemplo, menos de 20°C, 15°C, 10°C, o 5°C.

Producción Local de Productos a Base de Microbio

En ciertas modalidades de la presente invención, una instalación de crecimiento de microbio produce microorganismos frescos y de alta densidad y/o subproductos de crecimiento microbiano de interés a una escala deseada. La instalación de crecimiento de microbio puede ubicarse en o cerca al sitio de aplicación. La instalación produce composiciones a base de microbio de alta densidad en cultivación por lotes, casi continua, o continua.

Las instalaciones de crecimiento de microbio de la presente invención se pueden ubicar en la ubicación donde será utilizado el producto a base de microbio (por ejemplo, un huerto de cítricos). Por ejemplo, la instalación de crecimiento de microbio puede estar a menos de 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 15, 10, 5, 3, o 1 milla de la ubicación de uso.

Debido a que el producto a base de microbio puede ser generado localmente, sin recurso a los procesos de estabilización, conservación, almacenamiento y transporte de microorganismo de la producción microbiana convencional, se puede generar una densidad mucho mayor de microorganismos, requiriendo de esta forma un menor volumen del producto a base de microbio para uso en la aplicación en el sitio o la cual permite aplicaciones microbianas de mucha más densidad cuando sea necesario lograr la eficacia deseada. Esto permite un reactor a menor escala (por ejemplo, recipiente de fermentación más pequeño, suministros de material de inicio menores, nutrientes y agentes de control de pH), lo que hace al sistema eficiente y puede eliminar la necesidad de estabilizar células o separarlas de su medio de cultivo. La generación local del producto a base de microbio también facilita la inclusión del medio de crecimiento en el producto. El medio puede contener agentes producidos durante la fermentación que son particularmente bien adecuados para uso local.

Los cultivos de microbios de alta densidad, producidos localmente y robustos son más efectivos en el campo que aquellos que han permanecido en la cadena de suministro por algún tiempo. Los productos a base de microbio de la presente invención son particularmente ventajosos en comparación con productos tradicionales en donde las células han sido separadas de metabolitos y los nutrientes presentes en el medio de crecimiento de fermentación. Los tiempos de transporte reducidos permiten la producción y entrega de lotes frescos de microbios y/o sus metabolitos al momento y volumen requeridos por la demanda local.

Las instalaciones de crecimiento de microbio de la presente invención producen composiciones a base de microbio frescas, que comprenden los microbios como tal, metabolitos microbianos, y/u otros componentes del medio en el cual se crecen los microbios. Si se desea, las composiciones pueden tener una alta densidad de células vegetales o propágulos, o una mezcla de células vegetales y propágulos.

Ventajosamente, las composiciones pueden ser a la medida para uso en una ubicación específica. En una modalidad, la instalación de crecimiento de microbio se ubica en, o cerca, de un sitio donde se utilizarán los productos a base de microbio (por ejemplo, huerto de cítricos).

5 Ventajosamente, estas instalaciones de crecimiento de microbio suministran una solución al problema actual de confiar en productos de tamaño industrial lejanos cuya calidad del producto sufre debido a los retrasos de procesamiento, cuellos de botella de la cadena de suministro, almacenamiento inadecuado, y otras contingencias que inhiben la entrega a tiempo y la aplicación de, por ejemplo, un
10 producto viable con conteo celular alto y el medio asociado y los metabolitos en los cuales las células se crecieron originalmente.

Las instalaciones de crecimiento de microbio suministran versatilidad de fabricación por su capacidad de ajustar los productos a base de microbio para mejorar las sinergias con geografías de destino. Ventajosamente, en modalidades
15 preferidas, los sistemas de la presente invención aprovechan la energía de microorganismos locales que ocurren naturalmente y sus subproductos metabólicos para mejorar la producción agrícola.

El tiempo de cultivación para los recipientes individuales puede ser, por ejemplo, de 1 a 7 días o más. El producto de cultivación puede ser cosechado en
20 cualquiera de un número de formas diferentes.

La producción y entrega local dentro de, por ejemplo, 24 horas de fermentación resulta en composiciones puras con densidad celular alta y costos de envío sustancialmente menores. Dados los prospectos para el avance rápido en el desarrollo de inoculantes microbianos más efectivos y poderosos, los consumidores
25 se beneficiarán en gran medida de esta capacidad para entregar rápidamente productos a base de microbio.

Métodos para Mejorar la Salud de la Raíz y la Salud Inmune de la Planta

En modalidades preferidas, se suministra un método para mejorar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento de la planta, en donde una combinación de microorganismos beneficiosos, y/o sus subproductos de crecimiento, son aplicados a una planta y/o su ambiente circundante. En algunas modalidades, múltiples
5 plantas y/o sus ambientes circundantes son tratados de acuerdo con los presentes métodos.

Como se usa acá, el “ambiente circundante” de una planta significa el suelo y/u otro medio en el cual la planta crece, el cual puede incluir la rizosfera. En ciertas modalidades, el ambiente circundante no se extiende más allá, por ejemplo, de un
10 radio de por lo menos 5 millas, 1 milla, 1000 pies, 500 pies, 300 pies, 100 pies, 10 pies, 8 pies, o 6 pies de la planta.

En modalidades específicas, los métodos pueden comprender aplicar un primer microorganismo y un segundo microorganismo, y/o un subproducto de crecimiento de uno o ambos de estos microorganismos, a la planta y/o su ambiente
15 circundante. Preferiblemente, el primer microorganismo es un hongo *Trichoderma spp* y el segundo microorganismo es una bacteria *Bacillus spp*. En modalidades específicas el método comprende aplicar una composición de tratamiento de suelo a la presente descripción de la planta y/o su ambiente.

En una modalidad, el método comprende cultivar el primer y segundo
20 microorganismo de forma separada y luego combinarlos para producir una composición de tratamiento de suelo. En una modalidad, el primer y segundo microorganismos no se mezclan juntos en un producto, sino que son aplicados a la planta y/o su ambiente como tratamientos separados.

Para mejorar o estabilizar los efectos de la composición de tratamiento, esta
25 se puede mezclar con adyuvantes adecuados y luego es usada como tal o después de dilución, si es necesario. En modalidades preferidas, la composición es formulada como un polvo seco o como gránulos, los cuales se pueden mezclar con agua y otros componentes para formar un producto líquido.

En una modalidad, se pueden aplicar microorganismos adicionales contemporáneamente con el *Trichoderma* y/o *Bacillus*. Por ejemplo, también se puede aplicar una microbacteria tal como *Myxococcus xanthus*, y/o uno o más microorganismos capaces de fijar, movilizar y/o solubilizar nitrógeno, potasio, fósforo (o fosfato) y/u otros micronutrientes en el suelo. En una modalidad, también se puede aplicar un microbio fijador de nitrógeno, tal como, por ejemplo, *Azotobacter vinelandii*. En otra modalidad, también se puede aplicar un microbio movilizador de potasio, tal como, por ejemplo, *Frateuria aurantia*.

En algunas modalidades, los métodos además comprenden aplicar materiales con la composición para mejorar el crecimiento de microbio durante la aplicación (por ejemplo, nutrientes y/o prebióticos para mejorar el crecimiento microbiano). En una modalidad, las fuentes de nutrientes pueden incluir, por ejemplo, fuentes de nitrógeno, potasio, fósforo, magnesio, proteínas, vitaminas y/o carbono. En una modalidad, los prebióticos pueden incluir, por ejemplo, extracto de algas, ácido fúlvico, quitina, humato y/o ácido húmico.

En una modalidad, el método puede mejorar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento de la planta al mejorar la salud y el crecimiento de la raíz. Más específicamente, en una modalidad, los métodos pueden ser usados para mejorar las propiedades de la rizosfera en la cual las raíces de una planta están creciendo, por ejemplo, las propiedades de retención de nutrientes y/o humedad.

Adicionalmente, en una modalidad, el método puede ser usado para inocular una rizosfera con uno o más microorganismos beneficiosos. Por ejemplo, en modalidades preferidas, los microbios de la composición de tratamiento de suelo pueden colonizar la rizosfera y suministrar múltiples beneficios a la planta cuyas raíces están creciendo allí, incluyendo protección y alimento.

Ventajosamente, en una modalidad, los presentes métodos pueden ser usados para mejorar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento en plantas que tienen la salud inmune comprometida debido a una infección de un agente patogénico o

de un estresor ambiental, tal como, por ejemplo, sequía. Así, en ciertas modalidades, los presentes métodos también pueden ser usados para mejorar la salud inmune, o la respuesta inmune, de plantas.

Como se usa acá, “aplicar” una composición o producto se refiere a poner en
5 contacto una composición o producto con un objetivo o sitio de modo que la composición o producto pueden tener un efecto sobre ese objetivo o sitio. El efecto se puede deber a, por ejemplo, crecimiento microbiano y/o interacción con una planta, así como la acción de un metabolito, enzima, biotensoactivo u otro subproducto de crecimiento microbiano. Aplicar también puede incluir “tratar” un
10 objetivo o sitio con una composición.

La aplicación además puede incluir poner en contacto el producto a base de microbio directamente con una planta, parte de la planta, y/o el ambiente circundante de la planta (por ejemplo, el suelo o la rizosfera). El producto a base de microbio puede ser aplicado como un tratamiento de semilla o a la superficie del
15 suelo, o a la superficie de una planta o parte de la planta (por ejemplo, a la superficie de las raíces, tubérculos, tallos, flores, hojas, frutos, o flores). Este puede rociado, vertido, esparcido, inyectado o pulverizado como líquido, polvo seco, polvo, gránulos, microgránulos, bolas, polvo humectable, polvo fluido, emulsiones, microcápsulas, aceites, geles, pastas o aerosoles.

20 En una modalidad específica, la composición se pone en contacto con una o más raíces de la planta. La composición puede ser aplicada directamente a las raíces, por ejemplo, por rociado o sumergido de las raíces, y/o indirectamente, por ejemplo, al administrar la composición al suelo en el cual crece la planta (por ejemplo, la rizosfera). La composición puede ser aplicada a las semillas de la planta
25 antes o al momento de plantar, o en cualquier otra parte de la planta y/o su ambiente circundante.

En ciertas modalidades, las composiciones provistas acá son aplicadas a la superficie del suelo sin incorporación mecánica. El efecto beneficioso de la

aplicación al suelo puede ser activado por lluvia, rociador, inundación, o irrigación por gota, y posteriormente es entregado, por ejemplo, a las raíces de las plantas.

Las plantas y/o sus ambientes pueden ser tratados en cualquier punto durante el proceso de cultivación de la planta. Por ejemplo, la composición de
5 tratamiento de suelo puede ser aplicada al suelo antes, concurrentemente, o después del momento cuando las semillas son plantadas allí. Esta también puede ser aplicada en cualquier punto después durante el desarrollo y crecimiento de la planta, incluyendo cuando la planta está floreciendo, es fructífera, y durante y/o después de la abscisión de hojas.

10 En una modalidad, el método puede ser usado en un escenario agrícola a gran escala. El método puede comprender administrar la composición de tratamiento de suelo en un tanque conectado a un sistema de irrigación usado para suministrar agua, fertilizantes u otras composiciones líquidas a un cultivo, huerto o campo. Así, la planta y/o el suelo que rodea la planta pueden ser tratados con la
15 composición de tratamiento de suelo por medio de, por ejemplo, inyección en suelo, empapado de suelo, o usando un sistema de irrigación de pivote central, o con un rociador sobre el surco de semillas, o con rociadores o irrigadores de gota. Ventajosamente, el método es adecuado para tratar cientos de acres de cultivo, huertos o campos de una sola vez.

20 En una modalidad, el método puede ser usado en un escenario a escala menor, tal como en un jardín de casa o invernadero. En dichos casos, el método puede comprender rociar una planta y/o su ambiente circundante con la composición de tratamiento de suelo usando un rociador manual de césped y jardín. La composición puede mezclarse con agua, y opcionalmente, otros tratamientos de
25 césped y jardín, tal como fertilizantes y pesticidas. La composición también se puede mezclar en una regadera manual estándar y verterse sobre el suelo.

En ciertas modalidades, la planta que recibe tratamiento es saludable. Ventajosamente, la presente invención puede ser útil para mejorar la respuesta

inmune de una planta que tiene un sistema inmune comprometido, por ejemplo, debido a que la planta es afectada por enfermedad y/o síntomas de enfermedad.

Por ejemplo, la planta puede estar afectada por una cepa patogénica de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. savastanoi*, *P. syringae pathovars*); *Ralstonia solanacearum*; *Agrobacterium* (por ejemplo, *A. tumefaciens*); *Xanthomonas* (por ejemplo, *X. oryzae* pv. *Oryzae*, *X. campestris pathovars*, *X. axonopodis pathovars*); *Erwinia* (por ejemplo, *E. amylovora*); *Xylella* (por ejemplo, *X. fastidiosa*); *Dickeya* (por ejemplo, *D. dadantii* y *D. solani*); *Pectobacterium* (por ejemplo, *P. carotovorum* y *P. atrosepticum*); *Clavibacter* (por ejemplo, *C. michiganensis* y *C. sepedonicus*); *Candidatus Liberibacter asiaticus Pantoea*, *Burkholderia*; *Acidovorax* *Streptomyces*; *Spiroplasma*, y/o *Phytoplasma*; así como huanglongbing (HLB, enfermedad de enverdecimiento de cítricos), enfermedad de cancro de cítricos, enfermedad de puntos bacterianos de cítricos, clorosis variegada de cítricos, pudrición café, pudrición de la raíz de cítricos, enfermedad de manchas negras de cítricos.

En una modalidad, los métodos son usados para mejorar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento de árboles de cítricos afectados por enfermedad de enverdecimiento de cítricos y/o enfermedad de cancro de cítricos.

La presente invención puede ser usada para mejorar la salud, crecimiento y/o rendimiento de plantas y/o cultivos en, por ejemplo, agricultura, horticultura, invernaderos, paisajismo, y similares.

En una modalidad, la presente invención también puede ser usada para mejorar una o más cualidades del suelo, mejorando de esta forma el desempeño de los suelos para propósitos agrícolas, de hogar y jardinería.

En ciertas modalidades, la composición de tratamiento de suelo también puede ser aplicada con el fin de promover la colonización de las raíces y/o rizosfera, así como el sistema vascular de la planta con el fin de mejorar la salud y vitalidad de la planta. Así, se pueden promover microbios fijadores de nutrientes tales como *Rhizobium* y/o *Mycorrhizae*, así como otros microbios endógenos y exógenos

beneficiosos, y/o sus subproductos que promueven el crecimiento, salud y/o producción del cultivo.

En una modalidad, el método puede ser usado para mejorar la penetración de moléculas beneficiosas a través de las capas externas de las células de raíz.

5 La presente invención puede ser usada para mejorar cualquier número de cualidades en cualquier tipo de suelo, por ejemplo, arcilla, arena, limoso, turboso, gredoso, suelo franco, y/o combinaciones de éstos. Además, los métodos y composiciones pueden ser usados para mejorar la calidad de suelos secos, anegados, porosos, agotados, compactados y/o combinaciones de éstos.

10 En una modalidad, el método puede ser usado para mejorar el drenaje y/o dispersión de agua en suelos anegados. En una modalidad, el método puede ser usado para mejorar la retención de agua en suelos secos.

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

15 En una modalidad, el método controla bacterias patogénicas. En una modalidad, el método trabaja al mejorar la salud inmune de plantas para mejorar la capacidad de luchar infecciones.

En otra modalidad, el método controla plagas que pueden actuar como vectores o portadores para bacterias patogénicas, tal como moscas, áfidos, 20 hormigas, escarabajos, y moscas blancas. Así, los presentes métodos pueden prevenir la propagación de bacterias patogénicas de plantas al controlar, por ejemplo, matar, estas plagas portadoras.

Los productos a base de microbio pueden ser usados bien sea solos o en combinación con otros compuestos para la mejora eficiente de la salud, crecimiento 25 y/o rendimiento de la planta, así como otros compuestos para el tratamiento y prevención eficientes de plagas patogénicas de plantas. Por ejemplo, los métodos pueden ser usados concurrentemente con fuentes de nutrientes y/o micronutrientes para mejorar el crecimiento de planta y/o microbio, tal como magnesio, fosfato,

5 nitrógeno, potasio, selenio, calcio, azufre, hierro, cobre, y zinc; y/o uno o más prebióticos, tal como extracto de algas, ácido fúlvico, quitina, humato y/o ácido húmico. Los materiales exactos y las cantidades de éstos pueden ser determinadas por un granjero o un científico agrícola que tiene el beneficio de la presente divulgación.

10 Las composiciones también pueden ser usadas en combinación con otros compuestos agrícolas y/o sistemas de manejo de cultivos. En una modalidad, la composición puede opcionalmente comprender, o ser aplicada con, por ejemplo, pesticidas, repelentes, herbicidas, fertilizantes, tratamientos de agua, tensoactivos no iónicos y/o enmiendas de suelo naturales y/o químicas.

En una modalidad, las presentes composiciones son compatibles para uso con compuestos agrícolas caracterizados como incrustantes, tales como, por ejemplo, ácido difosfónico de hidroxietilideno;

15 bactericidas, tales como, por ejemplo, sulfato de estreptomicina y/o Galltrol® (cepa *A. radiobacter* K84);

biocidas, tales como, por ejemplo, dióxido de cloro, cloruro de amonio de didecildimetilo, heterocíclico halogenado, y/o dióxido de hidrógeno/ácido peroxiacético;

20 fertilizantes, tales como, por ejemplo, fertilizantes N-P-K, nitrato de amonio de calcio 17-0-0, tiosulfato de potasio, nitrógeno (por ejemplo, 10-34-0, Kugler KQ-XRN, Kugler KS-178C, Kugler KS-2075, Kugler LS 6-24-6S, UN 28, UN 32), y/o potasio;

25 fungicidas, tales como, por ejemplo, clorotalonil, manicozeb hexametilentetramina, tris de aluminio, azoxistrobina, *Bacillus spp.* (por ejemplo, *B. licheniformis* cepa 3086, *B. subtilis*, *B. subtilis* cepa QST 713), benomil, boscalid, piraclostrobina, captan, carboxina, cloroneb, clorotalonil, culfato de cobre, ciazofamida, diclorán, dimetomorfo, etridiazol, tiofanato-metilo, fenamidona, fenarimol, fludioxonil, fluopico! ide, flutolanil, iprodione, mancozeb, maneb,

mefanoxam, fludioxonil, mefenoxam, metalaxyl, myclobutanil, oxatiapiprolina, pentacloronitrobenceno (quintozeno), ácido de fósforo, propamocarb, propanbil, piraclostrobina, *Reynoutria sachalinensis*, *Streptomyces spp.* (por ejemplo, *S. griseoviridis* cepa K61, *S. lydicus* WYEC 108), azufre, urea, tiabendazol, tiofanato
 5 de metilo, tiram, triadimefón, triadimenol y/o vinclozolina;

reguladores de crecimiento, tales como, por ejemplo, ancimidol, cloruro de clormecuat, diaminozida, paclobutrazol, y/o uniconazol;

herbicidas, tales como, por ejemplo, glifosato, oxifluorfenol, y/o pendimetalina;

insecticidas, tales como, por ejemplo, acefato, azadiractina, *B. thuringiensis*
 10 (por ejemplo, *israelensis* cepa AM 65-52), *Beauveria bassiana* (por ejemplo, cepa GHA), carbarilo, clorpirifos, ciantraniliprol, ciromacina, dicofol, diacinon, dinotefurano, imidacloprid, *Isaria fumosoroseae* (por ejemplo, Apopka cepa 97), lindano, y/o malatión;

tratamientos de agua, tales como, por ejemplo, peróxido de hidrógeno (30-
 15 35%), ácido fosfónico (5-20%), y/o cloruro de sodio;

así como glicolípidos, lipopéptidos, deet, tierra diatomácea, citronela, aceites esenciales, aceites minerales, extracto de ajo, extracto de chile, y/o cualquier pesticida comercial y/o casero conocido que es determinado que es compatible por el experto en la materia que tiene el beneficio de la presente divulgación.

20 Preferiblemente, la composición no comprende y/o no es aplicada simultáneamente con, o dentro de 7 a 10 días antes o después de la aplicación de los siguientes compuestos: benomil, cloruro de amonio de dimetilo de dodecilo, dióxido de hidrógeno/ácido peroxiacético, imizilil, propoconazol, tebuconazol, o triflumizol.

25 En ciertas modalidades, las composiciones y métodos pueden ser usados para mejorar la efectividad de otros compuestos, por ejemplo, al mejorar la penetración de un compuesto pesticida en una planta o plaga, o mejorar la biodisponibilidad de un nutriente a las raíces de la planta. Los productos a base de

microbio también pueden ser usados para complementar otros tratamientos, por ejemplo, tratamientos antibióticos. Ventajosamente, la presente invención ayuda a reducir la cantidad de antibióticos que deben ser administrados a un cultivo o planta con el fin de ser efectivos en el tratamiento y/o prevención de infección bacteriana.

5 En una modalidad, los métodos y composiciones de acuerdo con la presente invención llevan a un aumento en uno o más de: masa de la raíz, diámetro del tronco, densidad de dosel, valor brix, contenido de clorofila, conteo de flores y/o niveles de nitrógeno en tejido de hoja de una planta, por aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, o más, en
10 comparación con una planta que crece en un ambiente sin tratar.

 En ciertas modalidades, los métodos y composiciones de acuerdo con la presente invención llevan a un aumento en el rendimiento del cultivo de aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, o más, en comparación con cultivos sin tratar.

15 En una modalidad, los métodos y composiciones de acuerdo con la presente invención llevan a una reducción en el número de plagas en una planta o en el ambiente circundante de una planta por aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, o más, en comparación con una planta que crece en un ambiente sin tratar.

20 En una modalidad, los métodos y composiciones de acuerdo con la presente invención reducen el daño a una planta causado por plagas por aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, o más, en comparación con plantas que crecen en un ambiente sin tratar.

25 **Plantas Objetivo**

 Como se usa acá, el término “planta” incluye, pero no se limita a, cualquier especie de planta de madera, ornamental o decorativa, cultivo o cereal, planta de frutas o planta de vegetales, flores o árbol, macroalga, microalga, fitoplancton o alga

fotosintética (por ejemplo, alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*). “Planta” también incluye una planta unicelular (por ejemplo, microalga) y una pluralidad de células de planta que son ampliamente diferenciadas en una colonia (por ejemplo, volvox) o una estructura que está presente en cualquier etapa del desarrollo de una planta.

5 Dichas estructuras incluyen, pero no se limitan a, una fruta, una semilla, un brote, un tallo, una hoja, una raíz, un pétalo de flor, etc. Las plantas pueden estar solas, por ejemplo, en un jardín, o pueden ser una de varias plantas, por ejemplo, como parte de un huerto, cultivo o pastar.

10 Como se usa acá, “plantas de cultivo” se refiere a cualquier especie de planta o alga comestible por humanos o usada como alimento para animales o peces o animales marinos, o consumida por humanos, o usada por humanos (por ejemplo, producción de textiles o cosméticos), o vista por humanos (por ejemplo, flores o arbustos en paisajismo o jardinería) o cualquier planta o alga, o una parte de ésta, usada en la industria o comercio o educación.

15 Los tipos de plantas de cultivo que se pueden beneficiar de la aplicación de los productos y métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: cultivos de fila (por ejemplo, maíz, soya, sorgo, maní, papas, etc.), cultivos de campo (por ejemplo, alfalfa, trigo, granos, etc.), cultivos de árbol (por ejemplo, nueces, almendras, pecanas, avellanas, pistachos, etc.), cultivos cítricos (por ejemplo, 20 naranja, limón, toronja, etc.), cultivos de fruta (por ejemplo, manzanas, peras, fresas, arándanos, moras, etc.), cultivos de césped (por ejemplo, césped), cultivos ornamentales (por ejemplo, flores, enredaderas, etc.), vegetales (por ejemplo, tomates, zanahorias, etc.), cultivos de enredadera (por ejemplo, uvas, etc.), silvicultura (por ejemplo, pino, abeto, eucalipto, álamo, etc.), pastos gestionados 25 (cualquier mezcla de plantas usadas para soportar animales de pastoreo).

Ejemplos adicionales de plantas para las cuales la presente invención es útil incluyen, pero no se limitan a, cereales y pastos (por ejemplo, trigo, cebada, centeno, avena, arroz, choclo, sorgo, maíz), remolacha (por ejemplo remolacha de

azúcar o forrajera); fruta (por ejemplo, uvas, fresas, frambuesas, moras, fruta pomácea, fruta de piedra, frutas suaves, manzanas, peras, ciruelas, duraznos, almendras, cerezas o bayas); cultivos de leguminosas (por ejemplo, frijoles, lentejas, arvejas o soya); cultivos de aceite (por ejemplo, colza, mostaza, amapola, 5 olivos, girasol, coco, castor, cocoa o nueces molidas); cucurbitáceas (por ejemplo, calabaza, pepino cohombro, calabacín o melones); plantas de fibra (por ejemplo, algodón, lino, cáñamo o yute); frutos cítricos (por ejemplo, naranjas, limones, toronja o mandarina); vegetales (por ejemplo, espinaca, lechuga, espárragos, repollo, zanahorias, cebollas, tomates, papas o pimientos); Lauraceae (por ejemplo, 10 aguacate, canela o alcanfor); y también tabaco, nueces, hierbas, especies, plantas medicinales, café, berenjena, caña de azúcar, té, pimienta, vides, lúpulo, la familia del plátano, plantas de látex, flores de corte y ornamentales.

En ciertas modalidades, la planta de cultivo es una planta de cítrico. Ejemplos de plantas de cítricos de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se 15 limitan a, árboles de naranja, árboles de limón, árboles de lima y árboles de toronja. Otros ejemplos incluyen *Citrus maxima* (Pomelo), *Citrus medica* (Citrón), *Citrus micrantha* (Papeda), *Citrus reticulata* (Naranja mandarina), *Citrus paradisi* (toronja), *Citrus japonica* (kumquat), *Citrus australasica* (Limón de dedo australiano), *Citrus australis* (Limón redondo australiano), *Citrus glauca* (Limón de desierto australiano), 20 *Citrus garrawayae* (Limón Blanco de Monte), *Citrus gracilis* (Limón Kakadu o Limón Humpty Doo), *Citrus inodora* (Limón de Río Russel), *Citrus warburgiana* (Limón Salvaje de Nueva Guinea), *Citrus wintersii* (Limón de dedo de río café), *Citrus halimii* (limau kadangsa, limau kedut kera), *Citrus indica* (naranja salvaje india), *Citrus acroptera*, y *Citrus latipes*, *Citrus x aurantiifolia* (lima), *Citrus x aurantium* (naranja 25 amarga), *Citrus x latifolia* (lima persa), *Citrus x limon* (Limón), *Citrus x limonia* (Rangpur), *Citrus x sinensis* (Naranja dulce), *Citrus x tangerina* (Mandarina), limón imperial, tangelo, orangelo, tangor, kinnow, kiyomi, Minneola tangelo, oroblanco,

ugli, mano de Buda, cidra, naranja bergamota, naranja sanguina, calamondin, clementina, limón Meyer y yuzu.

En algunas modalidades, la planta de cultivo es un pariente de una planta de cítrico, tal como naranja jazmín, lima, y naranja trifoliar (*Citrus trifolata*).

- 5 Ejemplos adicionales de plantas objetivo incluyen todas las plantas que pertenecen a la superfamilia Viridiplantae, en particular plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas incluyendo forraje o leguminosas forrajeras, plantas ornamentales, cultivos de alimento, árboles o arbustos seleccionados de *Acer spp.*, *Actinidia spp.*, *Abelmoschus spp.*, *Agave sisalana*, *Agropyron spp.*, *Agrostis stolonifera*, *Allium*
- 10 *spp.*, *Amaranthus spp.*, *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, *Annona spp.*, *Apium graveolens*, *Arachis spp.*, *Artocarpus spp.*, *Asparagus officinalis*, *Avena spp.*(por ejemplo, *A. saliva*, *A. fatua*, *A. byzantina*, *A. fatua var. sativa*, *A. hybrida*), *Averrhoa*
- carambola*, *Bambusa sp.*, *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsea*, *Beta vulgaris*, *Brassica spp.*(por ejemplo, *B. napus*, *B. rapa ssp. [canola, oilseed rape, turnip*
- 15 *rape]*), *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.*,
- 20 *Crataegus spp.*, *Crocus sativus*, *Cucurbita spp.*, *Cucumis spp.*, *Cynara spp.*, *Daucus carota*, *Desmodium spp.*, *Dimocarpus longan*, *Dioscorea spp.*, *Diospyros spp.*, *Echinochloa spp.*, *Elaeis*(por ejemplo, *E. guineensis*, *E. oleifera*), *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef* *Erianthus sp.*, *Eriobotrya japonica*, *Eucalyptus sp.*, *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum spp.*, *Fagus spp.*, *Festuca arundinacea*, *Ficus carica*, *Fortunella*
- 25 *spp.*, *Fragaria spp.*, *Ginkgo biloba*, *Glycine spp.*(por ejemplo, *G. max*, *Soja hispida* or *Soj a max*), *Gossypium hirsutum*, *Helianthus spp.*(por ejemplo, *//. annuus*), *Hemerocallis fulva*, *Hibiscus spp.*, *Hordeum spp.*(por ejemplo, *H. vulgare*), *Ipomoea batatas*, *Juglans spp.*, *Lactuca sativa*, *Lathyrus spp.*, *Lens culinaris*, *Linum*

usitatissimum, *Litchi chinensis*, *Lotus* spp., *Luffa acutangula*, *Lupinus* spp., *Luzula*
sylvatica, *Lycopersicon* spp.(por ejemplo, *L. esculentum*, *L. lycopersicum*, *L.*
pyriforme), *Macrotyloma* spp., *Malus* spp., *Malpighia emarginata*, *Mammea*
americana, *Mangifera indica*, *Manihot* spp., *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*,
5 *Melilotus* spp., *Mentha* spp., *Miscanthus sinensis*, *Momordica* spp., *Morus nigra*,
Musa spp., *Nicotiana* spp., *Olea* spp., *Opuntia* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp.(por
ejemplo, *O. sativa*, *O. latifolia*), *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora*
edulis, *Pastinaca sativa*, *Pennisetum* sp., *Persea* spp., *Petroselinum crispum*,
Phalaris arundinacea, *Phaseolus* spp., *Phleum pratense*, *Phoenix* spp., *Phragmites*
10 *australis*, *Physalis* spp., *Pinus* spp., *Pislacia vera*, *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus*
spp., *Prosopis* spp., *Prunus* spp., *Psidium* spp., *Punica granatum*, *Pyrus communis*,
Quercus spp., *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes* spp., *Ricinus*
communis, *Rubus* spp., *Saccharum* spp., *Salix* sp., *Sambucus* spp., *Secale cereale*,
Sesamum spp., *Sinapis* sp., *Solanum* spp.(por ejemplo, *S. tuberosum*, *S.*
15 *integrifolium* or *S. lycopersicum*), *Sorghum bicolor*, *Spinacia* spp., *Syzygium* spp.,
Tagetes spp., *Tamarindus indica*, *Theobroma cacao*, *Trifolium* spp., *Tripsacum*
dactyloides, *Triticosecale rimpau*, *Triticum* spp.(por ejemplo, *T. aestivum*, *T. durum*,
T. turgidum, *T. hybernum*, *T. macha*, *T. sativum*, *T. monococcum* or *T. vulgare*),
Tropaeolum minus, *Tropaeolum majus*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vigna* spp., *Viola*
20 *odorata*, *Vilis* spp., *Zea mays*, *Zizania palustris*, *Ziziphus* spp., entre otros.

Las plantas objetivo también pueden incluir, pero no se limitan a, maíz (*Zea*
mays), *Brassica* sp. (por ejemplo, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), particularmente
aquellas especies *Brassica* útiles como fuentes de aceite de semilla, alfalfa
(*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum*
25 *bicolor*, *Sorghum vulgare*), mijo (por ejemplo, mijo perla (*Pennisetum glaucum*), mijo
proso (*Panicum miliaceum*), mijo cola de zorro (*Setaria italica*), mijo de 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 carbadense*, *Gossypium hirsutum*), papa dulce o batata (*Ipomoea batatus*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea spp.*), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Ananas comosus*), árboles cítricos (*Citrus spp.*), cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia sinensis*),
 5 banano (*Musa spp.*), aguacate (*Persea americana*), higo (*Ficus casica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifera indica*), oliva (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), marañón (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), remolacha de azúcar (*Beta vulgaris*), caña de azúcar (*Saccharum spp.*), avena, cebada, vegetales, ornamentales, y coníferas.

10 Las plantas de vegetales objetivo incluyen tomates (*Lycopersicon esculentum*), lechuga (por ejemplo, *Lactuca sativa*), habichuelas (*Phaseolus vulgaris*), habas (*Phaseolus limensis*), arveja (*Lathyrus spp.*), y miembros del género *Cucumis* tal como pepino cohombro (*C. sativus*), melón o cantalupo (*C. cantalupensis*), y melón (*C. melo*). Ornamentales incluyen azalea (*Rhododendron*
 15 *spp.*), hortensia (*Macrophylla hydrangea*), hibisco (*Hibiscus rosasanensis*), rosas (*Rosa spp.*), tulipanes (*Tulipa spp.*), narcisos (*Narcissus spp.*), petunias (*Petunia hybrida*), clavel (*Dianthus caryophyllus*), ponsetia (*Euphorbia pulcherrima*), y crisantemo. Coníferas que pueden ser empleadas en la práctica de las modalidades incluyen, por ejemplo, pinos tales como pino loblolly (*Pinus taeda*), pino barra (*Pinus*
 20 *elliotii*), pino ponderosa (*Pinus ponderosa*), pino lodgepole (*Pinus contorta*), y pino Monterrey (*Pinus radiata*); abeto Douglas (*Pseudotsuga menziesii*); cicuta occidental (*Tsuga canadensis*); abeto Sitka (*Picea glauca*); secuoya (*Sequoia sempervirens*); abetos verdaderos tales como abeto plateado (*Abies amabilis*) y abeto de bálsamo (*Abies balsamea*); y cedros tales como cedro rojo occidental
 25 (*Thuja plicata*) y cedro amarillo de Alaska (*Chamaecyparis nootkatensis*). Plantas de las modalidades incluyen plantas de cultivo (por ejemplo, maíz alfalfa, girasol, Brassica, soya, algodón, cártamo, maní, sorgo, trigo, mijo, tabaco, etc.), tal como plantas de maíz y soya.

Los céspedes objetivo incluyen, pero no se limitan a: bluegrass anual (*Poa annua*); raigrás anual (*Lolium multiflorum*); bluegrass de Canadá (*Poa compressa*); festuca masticable (*Festuca rubra*); bentgrass colonial (*Agrostis tenuis*); bentgrass rastrero (*Agrostis palustris*); pasto de trigo crestado (*Agropyron desertorum*); pasto de trigo de calle (*Agropyron cristatum*); festuca dura (*Festuca longifolia*); bluegrass de Kentucky (*Poa pratensis*); orchardgrass (*Dactylis glomerata*); raigrás perenne (*Lolium perenne*); festuca roja (*Festuca rubra*); redtop (*Agrostis alba*); pasto azul áspero (*Poa trivialis*); festuca de oveja (*Festuca ovine*); bromegrass suave (*Bromus inermis*); festuca alta (*Festuca arundinacea*); timothy (*Phleum pratense*); bentgrass de terciopelo (*Agrostis canina*); Alcaligraso llorón (*Puccinellia distans*); pasto de trigo occidental (*Agropyron smithii*); Pasto Bermuda (*Cynodon spp.*); Hierba de San Agustín (*Stenotaphrum secundatum*); hierba zoysia (*Zoysia spp.*); Hierba Bahía (*Paspalum notatum*); pasto de alfombra (*Axonopus affinis*); pasto ciempiés (*Eremochloa ophiuroides*); hierba kikuyu (*Pennisetum clandestinum*); paspalum de la orilla del mar (*Paspalum vaginatum*); grama azul (*Bouteloua gracilis*); pasto de búfalo (*Buchloe dactyloids*); grama sideoats (*Bouteloua curtipendula*).

Plantas adicionales de interés incluyen plantas de grano que suministran semillas de interés, plantas de semilla oleaginosa, y plantas leguminosas. Semillas de interés incluyen semillas de grano, tales como maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, centeno, mijo, etc. Las plantas de semillas oleaginosas incluyen algodón, soya, cártamo, girasol, Brassica, maíz, alfalfa, palma, coco, linaza, castor, oliva, etc. Plantas leguminosas incluyen frijoles y arvejas. Frijoles incluyen guar, algarroba, fenogreco, soya, frijoles de jardín, caupí, frijol mungo, haba de lima, haba, lentejas, garbanzos, etc.

Plantas adicionales de interés incluyen Cannabis (por ejemplo, sativa, índica, y ruderalis) y cáñamo industrial

Todas las plantas y partes de planta pueden ser tratadas de acuerdo con la invención. En este contexto, se entiende que las plantas significan todas las plantas

y poblaciones de planta tales como plantas salvajes o plantas de cultivo deseadas o indeseadas (incluyen plantas de cultivo que ocurren naturalmente). Las plantas de cultivo pueden ser plantas que se pueden obtener por métodos tradicionales de cultivo y optimización o por métodos biotecnológicos y recombinantes, o combinaciones de estos métodos, incluyendo las plantas transgénicas y las variedades de planta.

Se entiende que las partes de planta significan todas las partes aéreas y subterráneas y órganos de las plantas tales como brotes, hojas, flores y raíces, cuyos ejemplos pueden ser hojas, agujas, troncos, tallos, flores, cuerpos de fruta, frutas y semillas, pero también raíces, tubérculos y rizomas. Las partes de planta también incluyen material de cultivo y material de propagación vegetativa y generativa, por ejemplo, cortes, tubérculos, rizomas, fundas y semillas.

En algunas modalidades, la planta es una planta infectada por una enfermedad patogénica o plaga. En modalidades específicas, la planta es infectada con enfermedad de enverdecimiento de cítricos y/o enfermedad de cancro de cítricos, y/o una planta que porta dichas enfermedades.

EJEMPLOS

Se puede tener un mayor entendimiento de la presente invención y de sus varias ventajas a partir de los siguientes ejemplos, dados a modo de ilustración. Los siguientes ejemplos son ilustrativos de algunos de los métodos, aplicaciones, modalidades y variantes de la presente invención. Ellos no deben ser considerados como limitantes de la invención. Se pueden realizar numerosos cambios y modificaciones con respecto a la invención.

25

EJEMPLO 1 – FERMENTACION DE ESTADO SOLIDO DE MICROBIOS
BACILLUS

Para producción de esporas de *Bacillus spp*, se utilizó un medio a base de salvado de trigo. El medio se esparció sobre placas de acero inoxidable en una capa de aproximadamente 1 a 2 pulgadas de gruesas y se esterilizó.

Después de la esterilización, las placas se inocularon con cultivo de semilla.

5 Opcionalmente, se pueden incluir nutrientes adicionales para mejorar el crecimiento microbiano, incluyendo, por ejemplo, sales y/o fuentes de carbono tales como melaza, almidones, glucosa y sacarosa. Para aumentar la velocidad de crecimiento y aumentar la motilidad y la distribución de las bacterias a lo largo del medio de cultivo, se adicionó extracto de papa y extracto de cáscara de banano al cultivo.

10 Las esporas de la cepa *Bacillus* de selección luego fueron rociadas o pipeteadas sobre la superficie del sustrato y las bandejas se incubaron entre 32-40°C. Se bombeó aire ambiente a través del horno para estabilizar la temperatura. La incubación por 48-72 horas puede producir 1×10^{10} esporas/gramo o más de la cepa.

15

EJEMPLO 2 – FERMENTACION DE ESTADO SOLIDO DE ESPORAS FUNGICAS

Para crecer *Trichoderma spp*, se mezclaron 250 g de harina de maíz nixtamalizada con agua desionizada y esterilizada en una bandeja de acero inoxidable, sellada con una tapa y bandas de bandeja. El medio de harina de maíz
20 se inoculó asépticamente con cultivo de semilla *Trichoderma* por rociado y pipeteado. Las bandejas luego se inocularon a 30°C por 10 días. Después de 10 días, se pueden cosecha aproximadamente 10^9 propágulos/gramo o más de *Trichoderma*. Los propágulos de *Trichoderma* (conidio y/o hifas) cosechados de un lote pueden tratar, por ejemplo, 1000 a 2000 acres de tierra.

25

EJEMPLO 3 – PREPARACION DE PRODUCTO A BASE DE MICROBIO

Los microbios, el sustrato, y cualquier nutriente residual que resulta de la producción usando los métodos descritos en los Ejemplos 1 y 2 se pueden mezclar

y/o micronizar y secar para formar gránulos o una sustancia en polvo. Se producen diferentes cepas de microbio de forma separada y luego se mezclan juntas antes o después del secado.

Se puede utilizar una bolsa sellable para almacenar y transportar un producto que contiene una mezcla de 10^9 células/g de *T. harzianum* y 10^{10} células/g de *B. amyloliquefaciens*. Micronutrientes, u otros microbios producidos de forma similar, pueden ser adicionados al producto.

Para preparar para su uso, el producto seco es disuelto en agua. La concentración puede alcanzar por lo menos 5×10^9 a 5×10^{10} células/ml. El producto luego es diluido con agua en un tanque de mezclado a una concentración de 1×10^6 a 1×10^7 células/ml.

Una bolsa puede ser usada para tratar aproximadamente 20 acres de cultivo, o 10 acres de arboleda de cítricos.

EJEMPLO 4 – RPEUBA DE RAIZ DE ARBOL DE NARANJA, FT. BASINGER, FLORIDA

Una composición de tratamiento de suelo de la presente invención (referida como Rhizolizer™), que comprende 37.5 ml de cultivo de *Trichoderma harzianum* y 37.5 de cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens subsp. locus* con 2 cuartos de extracto de algas, se aplicó en dos repeticiones a plantas de naranja en una plantación en Ft. Basinger, Florida. La masa de raíz húmeda (fresca) y la masa de raíz seca se compararon con aquellas de las plantas de control sin tratar.

Como se muestra en la Tabla 1, las mediciones lavadas de raíz promedio de las plantas tratadas con Rhizolizer™ fueron mayores para peso seco (Figura 1A) y peso fresco que las cultivadas usando prácticas estándar de granjero (control sin tratar).

Tabla 1. Mediciones promedio de lavado de raíz de control sin tratar y Rhizolizer™ (Tratamiento B)

Código de Tratamiento	Tratamiento	Rep No	Peso seco (g)	Peso fresco (g)
UTC	UTC	1	8.75	33.97
UTC	UTC	2	12.26	45.77
		Suma	21.01	79.74
TRATAMIENTO A	TDH10/BCA10	1	19.8	80.18
TRATAMIENTO B	TDH10/BCA10	2	16.79	67.64
		Suma	36.59	147.82

EJEMPLO 5 – PRUEBA DE RAIZ DE ARBOL DE TORONJA, FT. PIERCE, FLORIDA

Una composición de tratamiento de suelo de la presente invención (referida como Rhizolizer™), que comprende 37.5 ml de cultivo de *Trichoderma harzianum* y 37.5 de cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens subsp. locus* con 2 cuartos de extracto de algas, se aplicó en cuatro repeticiones a plantas de toronja en una plantación en Ft. Pierce, Florida. Las repeticiones ocurrieron cada dos meses. Después de la cuarta repetición, la masa de raíz húmeda (fresca) y la masa de raíz seca se compararon con aquellas de las plantas de control sin tratar.

Las mediciones lavadas de raíz promedio de las plantas tratadas con Rhizolizer™ fueron mayores para peso seco (Figura 1B) y peso fresco/húmedo que las cultivadas usando prácticas estándar de granjero (control sin tratar).

EJEMPLO 6 – PRUEBAS DE CITRICOS DE FLORIDA

Plantas de cítricos en varios condados en Florida fueron tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención y se compararon con plantas de control sin tratar (práctica del productor). Se estudió la masa/peso de raíz, crecimiento de brotes, densidad de dosel, calibre de tronco, tamaño de fruta, clasificación Brix de fruta, y rendimiento (cajas de peso).

La Figura 2 muestra la masa de raíz seca de plantas de toronja en el Condado St. Lucie. La composición de tratamiento de suelo se aplicó trimestralmente, para un total de 8 tratamientos (1.5 fl. oz/acre cada uno). Se observó un incremento de 153% en masa de raíz seca en comparación con plantas de práctica del productor.

La Figura 3A muestra la masa de raíz seca (g/muestra) de árboles de naranja Hamlin en el Condado Highlands. La composición de tratamiento de suelo se aplicó trimestralmente, para un total de 3 tratamientos (1.5 fl. oz/acre cada uno). Se observó un incremento de 76% en la masa de raíz seca en comparación con las plantas de práctica del productor. La Figura 3B muestra la masa de raíz seca (g/muestra) de árboles de toronja blanca en el Condado St. Lucie. La composición de tratamiento de suelo fue aplicada trimestralmente, para un total de 3 tratamientos (1.5 fl. oz/acre cada uno). Se observó un incremento de 82% en masa de raíz seca en comparación con las plantas de práctica del productor.

La Figura 4A muestra el peso promedio de raíz (g) de árboles de naranja Hamlin en el Condado Polk. La composición de tratamiento de suelo se aplicó trimestralmente, para un total de 4 tratamientos (1.5 fl. oz/acre para los tres primeros tratamientos; 3 fl. oz/acre para el tratamiento final). Se observó un incremento de 93% en peso promedio de raíz. La Figura 4B muestra el peso promedio de raíz (g) de árboles de naranja Valencia en el Condado Collier. La composición de tratamiento de suelo se aplicó trimestralmente, para un total de 4 tratamientos (1.5 fl oz/acre para los tres primeros tratamientos; 3 fl oz/acre para el tratamiento final). Se observó un incremento de 35% en el peso promedio de raíz.

Las Figuras 5A-5B muestran el porcentaje de árboles con crecimiento de nuevos brotes (5A) y conteo promedio de brotes (5B) en árboles de naranja Valencia jóvenes en el Condado Highlands. La composición de tratamiento de suelo se aplicó bimensualmente, para un total de 6 tratamientos (1.5 fl oz/acre cada uno). Se observó un incremento de 73% en porcentaje de árboles con crecimiento de nuevos brotes, y se observó un total de 38 nuevos brotes en promedio para árboles jóvenes.

Las Figuras 6A-6B muestran un incremento en densidad de dosel para árboles de naranja Hamlin maduros (6A) y árboles de naranja Hamlin jóvenes (6B) en el Condado Highlands. La composición de tratamiento de suelo fue aplicada trimestralmente, para un total de 3 tratamientos (1.5 fl oz/acre cada uno). Se observó un incremento de 19% en clasificación visual de dosel para árboles maduros, y se observó un incremento de 33% para árboles jóvenes.

La Figura 7 muestra el cambio promedio en calibre en árboles de naranja Valencia jóvenes en el Condado Highlands. La composición de tratamiento de suelo fue aplicada bimensualmente, para un total de 4 tratamientos (1.5 fl oz/acre cada uno). Se observó un incremento de 102% en calibre para plantas tratadas entre febrero y octubre, mientras que se observó únicamente un incremento de 81% en calibre para plantas con práctica del productor.

Las Figuras 8A-8B muestran el peso de fruta para árboles de toronja blanca (8A) y el diámetro para árboles de toronja rojo rubí (8B) en el Condado Charlotte. La composición de tratamiento de suelo fue aplicada trimestralmente, para un total de 4 tratamientos (1.5 fl oz/acre cada uno). Se observó un incremento de 6% en peso para las toronjas blancas, y se observó un incremento de 2% en diámetro de fruta para la rojo rubí.

Las Figuras 9A-9B muestran las clasificaciones Brix para toronjas blancas en el Condado Lucie (9A) y el Condado Charlotte (9B). La composición de tratamiento de suelo fue aplicada bimensualmente en el Condado Lucie, para un total de 5 tratamientos (1.5 fl oz/acre cada uno), y trimestralmente en el Condado Charlotte, para un total de tres tratamientos (1.5 fl oz/acre cada uno). Se observó un incremento de 4% en grados Brix para las toronjas del Condado Lucie, y se observó un incremento de 8% para las toronjas del condado Charlotte.

Las Figuras 10A-10B muestran cajas de peso para naranjas Hamlin cultivadas por dos granjeros diferentes en el Condado Lake. La composición de tratamiento de suelo fue aplicada trimestralmente para un total de 4 tratamientos

(1.5 fl oz/acre cada uno). Se observó un incremento de 42% por parte del Granjero 1 (10A) y se observó un incremento de 14% por parte del Granjero 2 (10B).

Las Figuras 11A-11B muestran el rendimiento de cosecha total en libras sólidas para naranjas Hamlin cultivadas por dos diferentes granjeros en el Condado Lake. La composición de tratamiento de suelo fue aplicada trimestralmente para un total de 4 tratamientos (1.5 fl oz/acre cada uno). Se observó un incremento de 32% por parte del Granjero 1 (11A) y se observó un incremento de 9% por parte del Granjero 2 (11B).

Las Figuras 12A-12B muestran el rendimiento de cosecha total en libras sólidas por caja (12A) y por acre (12B) para naranjas Hamlin en el Condado Polk. La composición de tratamiento de suelo fue aplicada bimestralmente para un total de 4 tratamientos (1.5 fl oz/acre cada uno). Se observó un incremento en libras sólidas/caja de 5%, y se observó un incremento de 6% en libras sólidas/acre.

EJEMPLO 7 – PRUEBA DE CAMPO DE TOMATE, VALLE CENTRAL DE CALIFORNIA

Una composición de tratamiento de suelo de la presente invención (referido como Rhizolizer™), que comprende 37.5 ml de cultivo de *Trichoderma harzianum* y 37.5 ml de cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens subsp. locus* con 2 cuartos de extracto de algas, fue aplicada en tres repeticiones, que varían de 26 a 33 días separados, a plantas de tomate. Aproximadamente 29-32 días después de la aplicación de la tercera repetición, los frutos de tomate fueron cosechados y se midieron los rendimientos. Se midieron los rendimientos de cosecha en toneladas por acre para parcelas de 10ft x 5ft (0.001 acre).

Como se muestra en la Figura 13A, se compararon los rendimientos de fruto rojo (barras) y los rendimientos de frutas totales (diamantes) entre plantas tratadas con los tratamientos mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2. Tratamientos de suelo para estudio de planta de tomate.

1	Control sin tratar
2	37.85 ml de cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i> + 37.85 ml de cultivo de <i>Bacillus amyloliquefaciens subsp. locus</i>
3	37.85 ml de cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i> + 37.85 ml de cultivo de <i>Bacillus amyloliquefaciens subsp. locus</i> + 1.89 ml de extracto de papa
4	37.85 ml de cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i> + 37.85 ml de cultivo de <i>Bacillus amyloliquefaciens subsp. locus</i> + 1L de humato + 2lb de melaza
5	Rhizolizer™
6	2 pt de Terra Treat™
7	Chequeo comercial (Viusid a 3, 1.5, 2.3 fl oz)

Como se muestra en las Figuras 13A-13B, las plantas de tomate tratadas con Rhizolizer™ produjeron 42 toneladas de fruta roja por acre (de 48 toneladas totales de fruta por acre), mientras que el control sin tratar produjo 30 toneladas de fruta roja por acre (de 38 toneladas totales de fruta por acre).

EJEMPLO 8 – PRUEBA DE CAMPO DE TOMATE, CONDADO FRESNO, CALIFORNIA

Plantas de tomate en el Condado Fresno, CA, fueron tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención (“Rhizolizer™”) y se comparó con plantas de control sin tratar (práctica estándar de granjero). Se midió el rendimiento, clasificación Brix, y masa de raíz seca.

La Figura 14A muestra los rendimientos totales de frutas comercializables en mT por acre para plantas de tomate tratadas mensualmente con la composición de tratamiento de suelo, para un total de 3 tratamientos (3 fl oz/acre cada uno). Se

observó un incremento de 40% en rendimiento en comparación con las plantas de práctica del productor.

La Figura 14B muestra la clasificación Brix para plantas de tomate tratadas mensualmente con la composición de tratamiento de suelo, para un total de 3 5 tratamientos (3 fl oz/acre cada uno). Se observó un incremento de 26% en grados Brix sobre las plantas de control sin tratar.

La Figura 15A muestra la masa de raíz seca (g) de plantas de tomate tratadas una vez con la composición de tratamiento de suelo a 3 fl oz/acre. Se observó un incremento de 50% en masa de raíz sobre las plantas de control sin tratar. La Figura 10 15B muestra las raíces de tomate cosechadas de una planta de tomate. Las raíces de la planta tratada (imagen inferior) fue visiblemente más densa que la planta de práctica del productor (imagen superior).

EJEMPLO 9 – ESTUDIO DE CRECIMIENTO DE TRONCO EN ÁRBOLES DE 15 ALMENDRA EN CALIFORNIA

Árboles de almendra en Ceres, California se midieron para crecimiento de diámetro de tronco cuando se trataron con ocho tratamientos diferentes de suelo por el curso de 5 meses. Los ocho tratamientos de suelo fueron como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos de suelo para medición de crecimiento de árbol de almendra.

1	Control positivo
2	Cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i> 0.001% v/v
3	Cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i> 0.01% v/v
4	Cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i> 0.1% v/v
5	Cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i> 0.001% v/v + cultivo de <i>Bacillus amyloliquefaciens subsp. locus</i> 0.001% v/v

6	Cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i> 0.01% v/v + cultivo de <i>Bacillus amyloliquefaciens subsp. locus</i> 0.01% v/v (Rhizolizer™
7	Cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i> 0.1% v/v + cultivo de <i>Bacillus amyloliquefaciens subsp. locus</i> 0.1% v/v
8	Control sin tratar

La Figura 16A muestra los resultados de las mediciones de diámetro de tronco de árbol, donde el tratamiento #6 desde la izquierda (Rhizolizer™) mostró un cambio en diámetro de tronco de 1.25 mm, mientras que el control sin tratar únicamente midió un aumento de 0.96 mm en diámetro de tronco. La Figura 16B muestra el crecimiento de tronco con el tiempo de árboles tratados con el tratamiento con Rhizolizer™.

EJEMPLO 10 – PRUEBAS DE FLORACION/NUECES DE ALMENDRAS

Árboles de almendra en el Condado San Joaquin, California fueron tratados con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención (Rhizolizer™), y se comparó con plantas de control sin tratar (práctica estándar de granjero). La composición de tratamiento de suelo fue aplicada dos veces, después de la cosecha, a 3 fl oz/acre cada una.

Después de florecer, se midió el número de nueces establecidas. Se observó un incremento de 21% en nueces establecidas para los árboles tratados sobre los árboles de control sin tratar (Figura 17).

EJEMPLO 11 – PRUEBAS DE CAMPO DE SANDIA

Plantas de sandía en el Condado Hillsborough, Florida fueron tratadas dos veces con Rhizolizer™ (un tratamiento por mes por dos meses) y se comparó con plantas de sandía de práctica estándar de granjero. Las Figuras 18A-18F muestran el tamaño de raíz (A-B), conteo de flores (C), conteo de frutas (D), rendimientos (E),

peso y clasificación Brix (F) para plantas tratadas en comparación con plantas de practica de granjero sin tratar, donde se observaron aumentos para cada conjunto de datos.

5 EJEMPLO 12 – PRUEBAS DE CAMPO DE CANTALUPO (MELON)

Plantas de melón en el Condado Polk, Florida fueron tratadas dos veces con Rhizolizer™ (un tratamiento por mes por dos meses) y se comparó con la práctica estándar de granjero. La Figura 19A muestra el incremento en conteo de flores y la Figura 19B muestra el rendimiento promedio cosechable para plantas tratadas en
10 comparación con plantas de práctica del productor sin tratar, donde se observaron aumentos para cada conjunto de datos.

EJEMPLO 13 – PRUEBAS DE CAMPO DE PAPA

Plantas de papa en varias ubicaciones fueron tratadas con una composición
15 de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención ("Rhizolizer™") y se comparó con plantas de control sin tratar (práctica estándar de granjero). Se midió la aparición después de plantado, el rendimiento, y la calidad de las papas.

Las Figuras 20A-20B muestran la aparición de planta de papa en el Condado
20 Imperial, California para papas russet amarillas rosadas plantas 5 semanas después de plantadas (A) y múltiples cultivares 6 semanas después de plantadas (B). La composición de tratamiento de suelo fue aplicada una vez al momento de plantar, a 1 fl oz/acre. En 5 semanas, la russet rosada amarilla mostró un incremento de 246% sobre las plantas de práctica del productor (plantas/867 ft lineal). En 6 semanas, los
25 múltiples cultivares mostraron un incremento de 56% (plantas/1250 ft lineal) sobre las plantas de práctica del productor.

Las Figuras 21A-21B muestran los rendimientos de papa de papas de Horneado de Mercado Fresco Reveille Russet en el Condado Hartley, Texas (A) y

papas Russet Burbank en el Condado Walworth, Wisconsin (B). La composición de tratamiento de suelo fue aplicada a las Reveille Russet una vez al plantar, a 3 fl oz/acre. Las plantas tratadas mostraron aumento de 31% en rendimiento sobre las plantas de práctica del productor (Figura 21A). La composición de tratamiento de

5 suelo fue aplicada a las papas Russet Burbank 3 veces a 3 fl oz/acre cada una. Se observó un incremento de 5% entre el tratamiento número 3 y las plantas de práctica del productor (Figura 21B).

Las Figuras 22A-22B muestran la calidad de cosecha de papa para papas Russet Burbank (22A) y el rendimiento por grado para papas Colomba (22B). Las

10 papas Russet Burbank fueron tratadas hasta 3 veces con la composición de tratamiento de suelo, con los grupos de tratamiento 1, tratamiento 2 y tratamiento 3 todos mostrando un incremento en número de papas No. 1 (22A). Las papas Colomba fueron tratadas mensualmente, para un total de 3 tratamientos. Se observó un incremento de 26% en papas Grado A en comparación con las papas de práctica

15 del productor.

EJEMPLO 14 – PRUEBAS DE CAMPO DE FRESA

Plantas de fresa en el Condado Hillsborough, Florida fueron tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente

20 invención (“Rhizolizer™”) y se comparó con plantas de control sin tratar (práctica estándar de granjero).

Se midió el diámetro y el peso de la fruta para dos grupos de fresas Radiance tratadas dos veces con la composición de tratamiento de suelo a 3 fl oz/acre (Figura 23A). Se observó un incremento de 6% y 8.5% en diámetro de fruta para las fresas

25 tratadas sobre las plantas de práctica del productor. Se observó un aumento visible en tamaño de fruta entre las fresas tratadas y las no tratadas (Figura 23B). además, se observó un incremento de 15% y un incremento de 17% en peso (g) para los dos grupos comparados con los grupos de control sin tratar (Figura 23C).

También se midió la clasificación Brix, el ancho de dosel, la masa de raíz, el conteo de frutas, las parcelas promedio/acre y las parcelas totales y se comparó con las plantas de fresa de práctica del productor:

Se observó un incremento de 11% en grados Brix para fresas Radiance que recibieron 2 tratamientos mensuales de la composición de tratamiento de suelo a 3 fl oz/acre (Figura 24);

se observó un incremento de 6% en ancho de dosel (in) para fresas Brilliance que recibieron 5 tratamientos mensuales de la composición de tratamiento de suelo a 6 fl oz/acre (Figura 25);

se observó un incremento de 20% en masa de raíz (g/planta) para fresas Brilliance que recibieron dos tratamientos mensuales de la composición de tratamiento de suelo a 6 fl oz/acre (Figura 26);

se observó un incremento de 7% en conteo de fruta para fresas Radiance que recibieron dos tratamientos mensuales de la composición de tratamiento de suelo a 3 fl oz/acre (Figura 27); y

se observó un incremento de 22% en parcelas/acre (Figura 28A), y un incremento de 22% en parcelas totales (Figura 28B) para plantas de fresas Radiance que recibieron 4 tratamientos mensuales de la composición de tratamiento de suelo a 3 fl oz/acre.

EJEMPLO 15 – PRUEBAS DE CAMPO DE MAIZ

Plantas de maíz variedad DKC 56-45 en el Condado Walworth, Wisconsin fueron tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención (“Rhizolizer™”) bien sea una vez al plantado, una vez a mitad de temporada, o dos veces (una vez al plantado y una vez a mitad de temporada). Los grupos de tratamiento se compararon con plantas de control sin tratar (práctica estándar de granjero).

Se midió el peso de raíz (g), la clasificación de vigor de planta (1-5) y el rendimiento (bu/acre). El grupo de doble tratamiento mostró el mayor aumento en peso de raíz (24%) (Figura 29), vigor (Figura 30), y rendimiento (5%) (Figura 31) en comparación con las plantas de práctica del productor.

5

EJEMPLO 16 – PRUEBAS DE CAMPO DE ALGODON

Dos grupos de plantas de algodón en el Condado Lubbock, Texas fueron tratados con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención (“Rhizolizer™”) y se compararon con plantas de control sin tratar (práctica estándar de granjero).

10

Cada grupo recibió tres tratamientos (bisemanales) de la composición de tratamiento de suelo a 3 fl oz/acre. Los rendimientos proyectados de algodón mostraron un incremento de 14% y 10% en libras de algodón por acre para los dos grupos, respectivamente, en comparación con las plantas de práctica del productor (Figura 32).

15

EJEMPLO 17 – PRUEBAS DE CAMPO DE TABACO

Plantas de tabaco variedad CC1063 en el Condado Lenoir, Carolina del Norte fueron tratadas con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención (“Rhizolizer™”) y se comparó con plantas de control sin tratar (práctica estándar de granjero).

20

Las plantas fueron tratadas una vez al momento de trasplantar (3 fl oz/acre). Se midió la clorofila promedio (verdura relativa), ancho promedio de hoja (in) y longitud promedio de hoja (in). Se observó un incremento de 4% en verdura relativa, un incremento de 35% en ancho de hoja, y un incremento de 18% en longitud de hoja (Figura 33).

25

EJEMPLO 18 – PRUEBAS DE CAMPO DE MANI

Maníes Runner en el Condado Bulloch, Georgia fueron tratados con una composición de tratamiento de suelo de acuerdo con una modalidad de la presente invención (“Rhizolizer™”) y se comparó con plantas de control sin tratar (práctica estándar de granjero).

- 5 Las plantas fueron tratadas una vez al plantado (3 fl oz/acre). Los rendimientos proyectados (lbs/acre) aumentó en 4% en comparación con las plantas de práctica del productor (Figura 34).

EJEMPLO 19 – CEPAS MICROBIANAS

- 10 La presente invención utiliza cepas microbianas beneficiosas. Las cepas de *Trichoderma harzianum* pueden incluir, pero no se limitan a, T-315 (ATCC 20671); T-35 (ATCC 20691); 1295-7 (ATCC 20846); 1295-22 [T-22] (ATCC 20847); 1295-74 (ATCC 20848); 1295-106 (ATCC 20873); T12 (ATCC 56678); WT-6 (ATCC 52443); Rifa T-77 (CMI CC 333646); T-95 (60850); T12m (ATCC 20737); SK-55 (No. 15 13327; BP 4326 NIBH (Japón)); RR17Bc (ATCC PTA 9708); TSHTH20-1 (ATCC PTA 10317); AB 63-3 (ATCC 18647); OMZ 779 (ATCC 201359); WC 47695 (ATCC 201575); m5 (ATCC 201645); (ATCC 204065); UPM-29 (ATCC 204075); T-39 (EPA 119200); y/o F11Bab (ATCC PTA 9709).

- Las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* pueden incluir, pero no se limitan a, 20 FZB24 (EPA 72098-5; BGSC 10A6), TA208, NJN-6, N2-4, N3-8, y aquellas que tienen números de acceso ATCC 23842, 23844, 23843, 23845, 23350 (cepa DSM 7), 27505, 31592, 49763, 53495, 700385, BAA- 390, PTA-7544, PTA-7545, PTA-7546, PTA-7549, PTA-7791, PTA-5819, PTA-7542, PTA- 7790, y/o PTA-7541.