

COMPOSICIONES A BASE DE LEVADURA PARA MEJORAR LAS PROPIEDADES DE LA RIZÓSFERA Y LA FITOSANIDAD

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense N.º 62/771.703, presentada el 27 de noviembre de 2018, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

En la industria agrícola, algunos problemas comunes continúan dificultando la capacidad de los agricultores de maximizar los rendimientos de la producción mientras y, al mismo tiempo, mantener bajos los costos. Estos incluyen, entre otros, infecciones e infestaciones causadas por bacterias, hongos, nematodos y otras plagas y patógenos; los costos altos de los fertilizantes y herbicidas químicos, que incluyen su impacto ambiental y en la salud; y la dificultad de las plantas de absorber eficazmente los nutrientes y el agua de diferentes tipos de suelo.

En la producción de cítricos, por ejemplo, la infección generalizada de las plantas cítricas por patógenos, tales como aquellos que provocan la enfermedad de enverdecimiento de los cítricos y la cancrrosis de los cítricos, ha producido dificultades significativas para los agricultores de cítricos. Se perdieron cultivos enteros debido a estas infecciones bacterianas, lo que produjo una disminución en la producción, y aumento en el precio, de productos cítricos a nivel mundial.

La enfermedad de enverdecimiento de los cítricos, que también se conoce como *Huanglongbing* (HLB) o enfermedad del dragón amarillo, es una infección incurable causada por las bacterias gram-negativas *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Esta enfermedad provocó la destrucción de millones de acres de cultivos de cítricos a lo largo de los Estados Unidos de América y otras partes del mundo. Los árboles infectados producen frutos que son verdes, deformes y amargos, que no son adecuados para la venta. Esta enfermedad se propaga por un insecto infectado con la enfermedad, el psílido asiático de los cítricos, y ha puesto en peligro el futuro de los árboles de cítricos del mundo.

La HLB vive en, e interfiere con la función de, el floema, o el sistema vascular de la planta que transporta azúcares a todas las partes de un árbol. De este modo, *Liberibacter* se puede mover y crecer a lo largo de un árbol entero, incluso las raíces. Por lo general, antes de cualquier expresión de síntomas foliares, la infección ya causó daños significativos al sistema de raíces, generando hasta 50 % de pérdida de la

densidad de raíz fibrosa.

La densidad de raíz continúa disminuyendo gradualmente mientras los síntomas se desarrollan en la copa. Esto se debe probablemente a una obstrucción en el floema, que restringe el movimiento de los azúcares al sistema de raíces. Las raíces son fundamentales para la capacidad de la planta de sobrevivir y crecer. La pérdida de un porcentaje tan grande de raíces reduce enormemente la salud inmunitaria del árbol, así como su capacidad de absorber nutrientes eficazmente y soportar estrés hídrico durante periodos secos extensos. De este modo, una de las características más importantes para cultivos saludables es una rizósfera saludable.

La rizósfera es la zona de suelo en donde el sistema de raíces de la planta crece y absorbe agua y nutrientes. Para enriquecer los suelos con determinados nutrientes, muchos agricultores dependen considerablemente del uso de productos químicos sintéticos y fertilizantes químicos para aumentar el rendimiento de los cultivos y proteger los cultivos de la sequía y las enfermedades. Sin embargo, con una capacidad de absorción reducida cuando, por ejemplo, el sistema de raíces de una planta está comprometido, agregar más agua y/o nutrientes al suelo puede no derivar en una mayor absorción en el sistema de raíces. En su lugar, lo aplicado fluirá a través de la rizósfera hacia el agua subterránea. Como fuentes de contaminación, el uso responsable de estas sustancias es un deber a nivel ecológico y comercial. La sobredependencia y el uso a largo plazo de determinados fertilizantes químicos, plaguicidas y antibióticos puede alterar los ecosistemas del suelo, reducir la tolerancia al estrés, aumentar la prevalencia de plagas resistentes, e impedir el crecimiento y vitalidad de la planta.

La absorción eficaz de agua y nutrientes en la rizósfera depende no solo de la cantidad de agua y nutrientes presentes en esta, sino también del microbioma en particular que existe en el suelo. El suelo contiene miles de millones de microorganismos diferentes, que coexisten entre sí y con las plantas para formar una compleja red de relaciones.

La combinación óptima de microorganismos en una rizósfera varía de acuerdo con el tipo de planta, así como el tipo de suelo en el que crece. Dos regiones o especies vegetales nunca tendrán la misma red de microbios en una rizósfera. De este modo, mientras los agentes biológicos tienen potencial para desempeñar una función cada vez más vital en la salud de los cultivos y la remediación de los suelos, tratar un rango amplio de especies vegetales en muchas regiones diferentes presenta dificultades debido a la complejidad y especificidad del microbioma rizosférico óptimo

de cada planta.

Los costos económicos y el impacto adverso ambiental y en la salud de los métodos de producción de cultivos actuales siguen siendo una carga para la sustentabilidad de los productos finales a base de cultivos. De este modo, hay una necesidad continua de métodos mejorados, no tóxicos y ecológicos para mejorar la producción de cultivos a bajo costo. En particular, se necesitan productos para enriquecer los suelos para crecimiento y rendimiento mejorado de los cultivos, en particular, en circunstancias de salud inmunitaria comprometida de la planta.

BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCION

La presente invención proporciona productos basados en microbios, así como métodos para usar estos productos basados en microbios en aplicaciones agrícolas. De manera ventajosa, los productos basados en microbios y los métodos de la presente invención son ecológicos, no tóxicos y rentables.

En formas de realización preferidas, la presente invención proporciona composiciones para el tratamiento del suelo basadas en microbios y sus métodos de para mejorar la salud, el crecimiento y el rendimiento general de las plantas de cultivo, por ejemplo, al mejorar la salud y/o el crecimiento del sistema de raíces de la planta, y también al estimular el sistema inmunitario y otros sistemas metabólicos naturales de la planta que contribuyen a la fitosanidad y productividad. En algunas formas de realización, los métodos pueden mejorar las propiedades de retención de humedad y/o nutrientes de la rizósfera.

De manera ventajosa, las composiciones de tratamiento del suelo de la presente invención pueden mejorar, por ejemplo, la salud del cultivo, así como el crecimiento y rendimiento del cultivo, incluso en situaciones en donde una o más de las plantas en un cultivo están infectadas con un patógeno o en donde la salud inmunitaria de las plantas de cultivo está comprometida de otra manera.

Por ejemplo, en una forma de realización, la presente invención se puede usar para mejorar la salud, el crecimiento y el rendimiento de plantas cítricas infectadas con, por ejemplo, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (enfermedad de enverdecimiento de los cítricos) y/o *Xanthomonas axonopodis* (cancrosis de los cítricos). De este modo, en una forma de realización, la presente invención se puede usar para mejorar la salud inmunitaria y/o respuesta inmunitaria de una planta.

En una forma de realización, la presente invención proporciona composiciones de tratamiento del suelo que comprenden un microorganismo y/o un subproducto de crecimiento de este. También se proporcionan métodos para cultivar el

microorganismo y/o subproducto de crecimiento.

En una forma de realización, la composición para el tratamiento del suelo comprende microorganismos caracterizados como una cepa de levadura no patógena. Preferentemente, la composición comprende una cepa de “levadura *killer*” no patógena, tal como *Wickerhamomyces anomalus*, u otras levaduras relacionadas con esta.

En una forma de realización, la composición comprende uno o más subproductos de crecimiento o metabolitos de la levadura. Por ejemplo, *W. anomalus* es capaz de producir una variedad de metabolitos, que incluye enzimas tales como fitasa y exo beta-1, 3 glucanasa, así como biotensioactivos, que incluyen fosfolípidos y/o glucolípidos.

En una forma de realización, los microorganismos adicionales se pueden incluir en la composición, siempre que sean compatibles con la levadura y/o sus subproductos de crecimiento. La especie y la relación de los microorganismos y otros ingredientes en la composición se pueden determinar según, por ejemplo, la planta en tratamiento, el tipo de suelo en donde está creciendo la planta, la fitosanidad al momento del tratamiento, así como otros factores. De este modo, la composición puede adaptarse para cualquier cultivo determinado.

Los microorganismos de las composiciones de tratamiento del suelo de la presente se pueden obtener mediante procesos de cultivo que varían de pequeña a gran escala. Estos procesos de cultivo incluyen, entre otros, cultivo/fermentación sumergida, fermentación en estado sólido (SSF), y modificaciones, híbridos y/o combinaciones de estos. En formas de realización preferidas, los microbios se cultivan mediante SSF o modificaciones de esta.

La composición para el tratamiento del suelo puede comprender el sustrato restante de la fermentación y/o subproductos de crecimiento purificados o no purificados, tales como biotensioactivos, enzimas y/u otros metabolitos. Los microbios pueden estar vivos o inactivos, aunque en formas de realización preferidas, los microbios están vivos.

La composición preferentemente se formula para aplicación al suelo, semillas, plantas enteras, o partes de plantas (que incluyen, entre otras, raíces, tubérculos, tallos, flores y hojas). En algunas formas de realización, la composición se formula como, por ejemplo, líquido, polvo, gránulos, microgránulos, pelets, polvo humectable, polvo fluidizable, emulsiones, microcápsulas, aceites, o aerosoles.

Para mejorar o estabilizar los efectos de la composición, puede mezclarse con

adyuvantes adecuados y luego usarse como tal o después de dilución, de ser necesario. En algunas formas de realización, la composición se formula como una preparación líquida concentrada, o como polvo seco o gránulos secos que se pueden mezclar con agua y otros componentes para formar un producto líquido. En una forma de realización, la composición comprende el sustrato, los microbios y los subproductos de crecimiento, mezclados entre sí y secados para formar polvo o gránulos.

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

En una forma de realización, se proporcionan métodos para mejorar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento de la planta, en donde una composición para el tratamiento del suelo que comprende una levadura y/o subproductos de crecimiento de esta se pone en contacto con la planta y/o su entorno circundante. Preferentemente, la levadura es *Wickerhamomyces anomalus* o una especie dentro del mismo género y/o familia.

En algunas formas de realización, la composición para el tratamiento del suelo se pone en contacto con una parte de la planta. En una forma de realización específica, la composición se pone en contacto con una o más raíces de la planta. La composición se puede aplicar directamente en las raíces, por ejemplo, mediante pulverización o inmersión de las raíces, y/o indirectamente, por ejemplo, mediante administración de la composición al suelo en donde crecen las plantas (por ejemplo, la rizósfera). La composición se puede aplicar a las semillas de la planta antes o al momento de la plantación, o a cualquier otra parte de la planta y/o su entorno.

En una forma de realización, el método puede mejorar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento al mejorar la salud y/o el crecimiento de las raíces de la planta. Esto se puede lograr, por ejemplo, al mejorar la habitabilidad de la rizósfera en la que crecen las raíces de la planta. Más específicamente, en una forma de realización, los métodos se pueden usar para mejorar las propiedades de retención de humedad y/o nutrientes de la rizósfera. En algunas formas de realización, las composiciones y métodos de la invención actual facilitan la absorción de nutrientes y/o absorción de agua en las plantas.

Además, en una forma de realización, el método se puede usar para inocular la rizósfera de una planta con un microorganismo beneficioso. Por ejemplo, la levadura de la composición para el tratamiento del suelo puede colonizar la rizósfera de la

planta y proporcionar múltiples beneficios a la planta a través de la interfase raíz-suelo, que incluyen protección, nutrición y señalización metabólica que soporta la interacción directa entre los genomas microbianos y los de la planta.

En otra forma de realización, el método se puede usar para estimular a los microorganismos beneficiosos para que colonicen una rizósfera. En otra forma de realización, el método se puede usar para combatir y/o desalentar la colonización de la rizósfera por microorganismos del suelo que son perjudiciales o que pueden competir con microorganismos del suelo beneficiosos.

Asimismo, en una forma de realización, el método se puede usar para proporcionar un nutriente a una planta, y/o para tratar y/o prevenir una deficiencia de nutrientes en una planta. Por ejemplo, en una forma de realización, cuando la levadura de la composición para el tratamiento del suelo está inactiva, o cuando muere, sus células proporcionan una abundancia de nutrientes, proteínas, vitaminas, y minerales que son utilizadas por las plantas y/o otra microbiota del suelo.

En otra forma de realización, el método se puede usar para proporcionarle a la planta fósforo en forma de fosfatos. Esto se debe a que *W. anomalus* puede producir fitasa, una enzima que es capaz de convertir ácido fítico presente en el suelo en fosfatos biodisponibles a las plantas (por ejemplo, absorbibles por las raíces). En consecuencia, el método se puede usar para tratar y/o prevenir una deficiencia de fósforo en una planta.

De manera ventajosa, los métodos de la presente se pueden usar para mejorar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento de las plantas que tienen la salud inmunitaria comprometida debido a una infección por un agente patógeno o biótico, o por un factor de estrés ambiental, por ejemplo, sequía. De este modo, los métodos de la presente también se pueden usar para mejorar la salud inmunitaria, o respuesta inmunitaria, de las plantas.

En algunas formas de realización, los microorganismos de la composición trabajan sinérgicamente con los otros ingredientes y/o microorganismos adicionales opcionales para mejorar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento de las plantas.

Las composiciones y métodos de la presente invención se pueden usar solos o en combinación con otros compuestos y/o métodos para mejorar eficazmente la salud, el crecimiento y/o el rendimiento, y/o para enriquecer el crecimiento del primer y segundo microbios. Por ejemplo, en una forma de realización, la composición puede incluir y/o se puede aplicar simultáneamente con nutrientes y/o micronutrientes para mejorar el crecimiento de las plantas y/o microbios, tales como magnesio, fosfato,

nitrógeno, potasio, selenio, calcio, azufre, hierro, cobre, y zinc; uno o más nanofertilizantes, tales como Aqua-Yield, NanoGroTM; y/o prebióticos, tales como extracto de alga, ácido fúlvico, quitina, humato y/o ácido húmico. Los materiales exactos y las cantidades de estos pueden ser determinados por un agricultor o un científico agrícola que tiene el beneficio de la presente divulgación.

Las composiciones y métodos también se pueden usar en combinación con otros sistemas de gestión de cultivos. En una forma de realización, la composición puede opcionalmente comprender, o se puede aplicar con, repelentes y/o plaguicidas naturales y/o químicos, tales como, por ejemplo, cualquier plaguicida comercial y/o casero conocido que sea compatible con la combinación de microorganismos que se aplica. En algunas formas de realización, la composición también puede comprender, o se puede aplicar con, por ejemplo, herbicidas, fertilizantes, y/u otros mejoradores del suelo compatibles, que incluyen productos comerciales que contienen fuentes de nutrientes (por ejemplo, nitrógeno-fósforo-potasio (NPK) y/o micronutrientes).

De manera ventajosa, la presente invención se puede usar sin liberar grandes cantidades de compuestos inorgánicos en el ambiente. Además, las composiciones y métodos utilizan componentes que son biodegradables y toxicológicamente seguros. De este modo, la presente invención se puede usar como un tratamiento del suelo “ecológico”.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra los resultados de un estudio comparativo entre árboles jóvenes de cítricos tratados con una composición que comprendía *W. anomalus* (“STR10”) y árboles de control sin tratar. Se midieron la altura, calibre del tronco e índice de crecimiento (GI) durante un período de 6 meses luego del tratamiento.

La Figura 2 muestra los resultados de un estudio comparativo entre árboles jóvenes de cítricos tratados con una composición que comprendía *W. anomalus* (“STR10”) y árboles de control sin tratar, en donde se midió la altura de árbol durante un período de 18 meses.

La Figura 3 muestra los resultados de un estudio comparativo entre árboles jóvenes de cítricos tratados con una composición que comprendía *W. anomalus* (“STR10”) y árboles de control sin tratar, en donde se midió el índice de crecimiento (GI) durante un período de 18 meses.

La Figura 4 muestra los resultados de un estudio comparativo entre árboles jóvenes de cítricos tratados con una composición que comprendía *W. anomalus* (“STR10”) y árboles de control sin tratar, en donde se midió el calibre del tronco

durante un período de 18 meses.

Figures 5A-5B muestran los resultados de un estudio comparativo entre árboles jóvenes de cítricos tratados con una composición que comprende *W. anomalus* ("STR10") y árboles de control sin tratar, en donde se midieron el porcentaje de árboles que exhiben nuevo crecimiento de los brotes (**5A**) y la cantidad promedio de brotes por árbol (**5B**).

La Figura 6 muestra los resultados de un estudio comparativo entre árboles jóvenes de cítricos tratados con una composición que comprendía *W. anomalus* ("STR10") y árboles de control sin tratar, en donde se midió la cantidad promedio de frutos por árbol.

Figures 7A-7B muestran los resultados de estudios comparativos entre plantas de lechuga tratadas con una composición que comprendía *W. anomalus* ("STR10") y plantas de control sin tratar (**7A**), y entre plantas de lechuga tratadas con STR10 más una composición que comprendía *Trichoderma harzianum* y *Bacillus amyloliquefaciens* ("ThBa") y plantas de control sin tratar (**7B**), en donde se midió el peso promedio (g) de las cabezas de lechuga.

Figures 8A-8B muestran los resultados de un estudio comparativo entre plantas de maní tratadas con una composición que comprendía *W. anomalus* ("STR10") y plantas de control sin tratar, en donde se midieron la cantidad promedio de flores por 30 pies cuadrados (**8A**) y el tamaño promedio de la copa (pulgadas) (**8B**).

Las Figuras 9A-9B muestran los resultados de estudios comparativos entre plantas de zucchini tratadas con una composición que comprendía *W. anomalus* ("STR10"), STR10 más una composición que comprendía *Trichoderma harzianum* y *Bacillus amyloliquefaciens* ("ThBa"), y plantas de control sin tratar, en donde se midieron el contenido de nitrógeno (**9A**) y el contenido de magnesio (**9B**) del tejido foliar.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona productos basados en microbios, así como métodos para usar estos productos basados en microbios en aplicaciones agrícolas. De manera ventajosa, los productos basados en microbios y los métodos de la presente invención son ecológicos, no tóxicos y rentables.

En formas de realización preferidas, la presente invención proporciona composiciones basadas en microbios para el tratamiento del suelo y sus métodos de uso para mejorar la salud, el crecimiento y el rendimiento general de plantas de cultivo mediante, por ejemplo, la mejora de las propiedades de retención de nutrientes y

humedad de la rizósfera. De manera ventajosa, las composiciones de tratamiento del suelo de la presente invención pueden mejorar, por ejemplo, la salud del cultivo, así como el crecimiento y rendimiento del cultivo, incluso en situaciones en donde una o más de las plantas en un cultivo están infectadas con un patógeno o en donde la salud inmunitaria de las plantas de cultivo está comprometida de otra manera. Por ejemplo, en una forma de realización, la presente invención se puede usar para mejorar la salud, el crecimiento y el rendimiento de plantas cítricas infectadas con, por ejemplo, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (enfermedad de enverdecimiento de los cítricos) y/o *Xanthomonas axonopodis* (cancrosis de los cítricos).

Definiciones seleccionadas

La presente invención utiliza “composiciones basadas en microbios”, que significa una composición que comprende componentes que se produjeron como resultado del crecimiento de microorganismos u otros cultivos celulares. De este modo, la composición basada en microbios puede comprender los microbios mismos y/o subproductos de crecimiento microbiano. Los microbios pueden estar en un estado vegetativo, en forma de espora o conidios, en forma de hifas, en cualquier otra forma de propágulo, o una mezcla de estos. Los microbios pueden ser planctónicos o estar en forma de una biopelícula, o una mezcla de ambas. 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 formas de realización preferidas, los microbios están presentes, con medio de cultivo en el que se cultivaron, en la composición basada en microbios. Los microbios pueden estar presentes, por ejemplo, a una concentración de al 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.

Además, la presente invención proporciona “productos basados en microbios”, que son productos que se deben aplicar en la práctica para lograr un resultado deseado. El producto basado en microbios puede ser simplemente la composición basada en microbios cosechada del proceso de cultivo de microbios. De manera alternativa, el producto basado en microbios puede comprender otros ingredientes agregados. Estos ingredientes adicionales pueden incluir, por ejemplo, estabilizantes, amortiguadores, portadores apropiados, tales como agua, soluciones salinas, o cualquier otro portador apropiado, nutrientes agregados para apoyar además el crecimiento microbiano, mejoradores del crecimiento no nutrientes y/o agentes que facilitan el rastreo de los microbios y/o la composición en el entorno en el que se

aplica. El producto basado en microbios también puede comprender mezclas de composiciones basadas en microbios. El producto basado en microbios también puede comprender uno o más componentes de una composición basada en microbios que se procesaron de alguna manera tal como, entre otras, filtración, centrifugación, lisis, secado, purificación y similares.

Como se usa en la presente, “cosechado” en el contexto de la fermentación de una composición basada en microbios se refiere a retirar un poco de o toda la composición basada en microbios de un recipiente de cultivo.

Como se usa en la presente, una “biopelícula” es un agregado complejo de microorganismos, tales como bacterias, en donde las células se adhieren entre sí. Las células en las biopelículas son fisiológicamente distintas de las células planctónicas del mismo organismo, que son células únicas que pueden flotar o nadar en medio líquido.

Como se usa en la presente, un compuesto “aislado” o “purificado” está sustancialmente libre de otros compuestos, tales como material celular, con los que está asociado en la naturaleza. Un polinucleótido purificado o aislado (ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN)) está libre de los genes o secuencias que lo flanquean en su estado natural. Un polipéptido purificado o aislado está libre de los aminoácidos o secuencias que lo flanquean en su estado natural. En el contexto de una cepa microbiana, “aislada” significa que la cepa se retira del entorno en el que existe en la naturaleza. De este modo, la cepa aislada puede existir como, por ejemplo, un cultivo puro biológicamente, o como esporas (u otras formas de la cepa) con asociación a un portador.

Como se usa en la presente, un “cultivo puro biológicamente” es un cultivo que se aisló de los materiales con los que se asocia en la naturaleza. En una forma de realización preferida, el cultivo se aísla de todas las otras células vivas. En otras formas de realización preferidas, el cultivo puro biológicamente 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 algunas formas de realización, los compuestos purificados son al menos 60 % en peso (peso seco) del compuesto de interés. Preferentemente, la preparación es al menos 75 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, y, con máxima preferencia, al menos 99 %, en peso del compuesto de interés. Por ejemplo, un compuesto purificado es uno que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 98 %, 99 %, o 100 %

(p/p) del compuesto deseado en peso. La pureza se mide mediante cualquier método estándar apropiado, por ejemplo, mediante cromatografía en columna, cromatografía de capa delgada, o análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Un “metabolito” se refiere a cualquier sustancia producida por metabolismo (por ejemplo, un subproducto de crecimiento) o una sustancia necesaria para formar parte de un proceso metabólico particular. Un metabolito puede ser un compuesto orgánico que es un material de inicio (por ejemplo, glucosa), un intermediario (por ejemplo, acetil-CoA) en, o un producto final (por ejemplo, n-butanol) de metabolismo. Los ejemplos de metabolitos incluyen, entre otros, biotensioactivos, biopolímeros, enzimas, ácidos, solventes, alcoholes, proteínas, vitaminas, minerales, microelementos, y aminoácidos.

Como se usa en la presente, “modular” significa causar una alteración (por ejemplo, aumento o disminución). Dichas alteraciones se detectan mediante métodos estándar conocidos en el estado de la técnica.

Los rangos que se proporcionan en la presente son abreviaturas de todos los valores dentro del rango. Por ejemplo, un rango de 1 a 20 significa que incluye cualquier cantidad, combinación de cantidades, o subrango del grupo que consiste en 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 intermedios entre los enteros mencionados anteriormente, 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 final del rango se contemplan específicamente. Por ejemplo, un subrango anidado de un rango de ejemplo 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 en la presente, “reducir” se refiere a una alteración negativa, y el término “aumentar” se refiere a una alteración positiva, cada una de al menos 1 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, o 100 %.

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

Como se usa en la presente, “tensioactivo” se refiere a un compuesto que disminuye la tensión superficial (o tensión interfacial) entre dos líquidos o entre un líquido y un sólido. Los tensioactivos actúan como, por ejemplo, detergentes, agentes humectantes, emulgentes, agentes formadores de espuma y dispersantes. Un “biotensioactivo” es un tensioactivo producido por un organismo vivo.

Como se usa en la presente, “agricultura” significa el cultivo y reproducción de

plantas, algas y/u hongos para alimento, fibra, biocombustible, medicinas, cosméticos, suplementos, fines ornamentales y otros usos. De acuerdo con la presente invención, la agricultura también puede incluir horticultura, paisajismo, jardinería, conservación de plantas, silvicultura y reforestación, restauración de pastizales y praderas, huertas frutales, arboricultura y agronomía. Además se incluyen en la agricultura el cuidado, monitoreo y mantenimiento del suelo.

Como se usa en la presente, “mejorar” significa mejorar o aumentar. Por ejemplo, la fitosanidad mejorada significa mejorar la capacidad de la planta de crecer y desarrollarse, lo que incluye mayor germinación de semilla y/o surgimiento, habilidad mejorada de repeler plagas y/o enfermedades, y habilidad mejorada de sobrevivir a factores de estrés ambientales, tales como sequías y/o exceso de riego. El crecimiento de la planta mejorado y/o biomasa de la planta mejorada significa aumentar el tamaño y/o la masa de una planta por encima y por debajo del suelo (por ejemplo, aumento del volumen de copa/foliar, altura, calibre del tronco, longitud de rama, longitud de brote, contenido proteico, tamaño/densidad de las raíces y/o índice de crecimiento general), y/o mejorar la habilidad de la planta de alcanzar un tamaño y/o masa deseados. El rendimiento mejorado significa mejorar los productos finales producidos por las plantas en un cultivo, por ejemplo, mediante el aumento de la cantidad y/o tamaño de las frutas, hojas, raíces y/o tubérculos por planta, y/o mejorar la calidad de las frutas, hojas, raíces y/o tubérculos (por ejemplo, mejorar el sabor, textura, brix, contenido de clorofila y/o color).

Como se usa en la presente “evitar” o “prevención” de una situación o suceso significa demorar, inhibir, suprimir, impedir y/o minimizar el inicio, extensión o progresión de la situación o suceso. La prevención puede incluir, pero no lo requiere, la prevención indefinida, absoluta o completa, lo que significa que el signo o síntoma aún se puede desarrollar en un momento posterior. La prevención puede incluir la reducción de la gravedad del inicio de dicha enfermedad, afección o trastorno, y/o inhibir la progresión de la afección o trastorno a una afección o trastorno más grave.

Como se usa en la presente, el término “controlar” usado en relación con una plaga significa matar, incapacitar, inmovilizar o reducir la cantidad de la población de una plaga, o de otra forma generar que la plaga sea sustancialmente incapaz de causar daño.

Como se usa en la presente, una “plaga” es cualquier organismo, que no sea ser humano, que sea destructivo, perjudicial y/o nocivo para seres humanos o actividades humanas (por ejemplo, agricultura, horticultura). En algunos casos, pero

no en todos, una plaga puede ser un organismo patógeno. Las plagas pueden causar o ser un vector de infecciones, infestaciones y/o enfermedades, o pueden simplemente alimentarse de o causar otro daño físico a tejido vivo. Las plagas pueden ser organismos unicelulares o multicelulares, que incluyen, entre otros, virus, hongos, bacterias, parásitos, protozoos y/o nematodos.

Como se usa en la presente, un “mejorador del suelo” o un “acondicionador del suelo” es cualquier compuesto, material o combinación de compuestos o materiales que se agregan en el suelo para mejorar las propiedades del suelo y/o la rizósfera. Los mejoradores del suelo pueden incluir materia orgánica e inorgánica, y pueden además incluir, por ejemplo, fertilizantes, plaguicidas y/o herbicidas. El suelo rico en nutrientes y de buen drenaje es esencial para el crecimiento y la salud de las plantas, y, por ende, los mejoradores del suelo se pueden usar para mejorar la biomasa de la planta mediante la alteración del contenido de humedad y los nutrientes del suelo. Los mejoradores del suelo también pueden usarse para mejorar muchas cualidades diferentes del suelo, que incluyen, entre otras, la estructura del suelo (por ejemplo, prevenir la compactación); mejorar la capacidad de almacenamiento y la concentración de nutrientes; mejorar la retención de agua en suelos secos; y mejorar el drenaje suelos con saturación hídrica.

Como se usa en la presente, un “factor de estrés abiótico” es una condición no viva que tiene un impacto negativo en un organismo vivo en un entorno específico. El factor de estrés abiótico debe influir sobre el entorno más allá de su rango normal de variación para afectar de manera adversa el rendimiento de la población o fisiología individual del organismo de manera significativa. Los ejemplos de factores de estrés abiótico incluyen, entre otros, sequía, temperaturas extremas (altas o bajas), inundaciones, vientos fuertes, desastres naturales (por ejemplo, huracanes, avalanchas, tornados), cambios del pH del suelo, radiación alta, compactación del suelo, contaminación y otros. De manera alternativa, un “factor de estrés biótico” es una acción dañina y/o nociva hacia un organismo vivo por otro organismo vivo. Los factores de estrés biótico pueden incluir, por ejemplo, daño y/o enfermedad causados por una plaga, competencia con otros organismos por recursos y/o espacio, y diversas actividades humanas.

La expresión transicional “que comprende,” que es sinónima con “que incluye” o “que contiene”, es inclusiva o sin limitación y no excluye elementos o etapas de métodos adicionales o no mencionados. En contraste, la frase transicional “que consiste en” excluye cualquier elemento, etapa, o ingrediente no especificado en la

reivindicación. La frase transicional “que consiste esencialmente en” limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificados “y aquellos que no afectan considerablemente las características básicas y novedosas” de la invención reivindicada. El uso de la expresión “que comprende” contempla formas de realización distintas de los componentes mencionados de las que contemplan “que consiste” o “que consiste esencialmente”.

A menos que se indique específicamente o sea evidente por el contexto, como se usa en la presente, se debe interpretar que el término “o” es inclusivo. A menos que se indique específicamente o sea evidente por el contexto, como se usa en la presente, se debe interpretar que los términos “un”, “una” y “los/las” son singulares o plurales.

A menos que se indique específicamente o sea evidente por el contexto, como se usa en la presente, se debe interpretar que la expresión “alrededor de” significa dentro de un rango de tolerancia normal en el estado de la técnica, por ejemplo, dentro de 2 desviaciones estándar de la media. Se puede interpretar que “alrededor de” es dentro de 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, o 0,01 % del valor indicado.

La mención de un listado de grupos químicos en cualquier definición de una variable en la presente incluye definiciones de esa variable como cualquier grupo único o combinación de grupos enumerados. La mención de una forma de realización para una variable o aspecto en la presente incluye esta forma de realización como cualquier forma de realización única o en combinación con cualquier otra forma de realización o porciones de estas.

Todas las referencias aquí citadas se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

Composiciones de tratamiento del suelo

En una forma de realización, la presente invención proporciona composiciones de tratamiento del suelo que comprenden un microorganismo y/o un subproducto de crecimiento de este. La composición para el tratamiento del suelo se puede usar para mejorar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento, incluso en plantas que fueron infectadas por un patógeno o enfermedad. Más específicamente, las composiciones objeto se pueden usar para mejorar el crecimiento y/o la salud de las raíces de las plantas, y/o para mejorar la salud inmunitaria de una planta. En algunas formas de realización, la composición para el tratamiento del suelo también se puede usar para inocular las raíces de las plantas, y/o la rizósfera en la que crecen las raíces, con un

microorganismo beneficioso.

De manera ventajosa, en formas de realización preferidas, las composiciones basadas en microbios de acuerdo con la presente invención son no tóxicas y se pueden aplicar en concentraciones altas sin causar irritación, por ejemplo, en la piel o tubo digestivo de un ser humano u otro animal que no sea plaga. De este modo, la presente invención es particularmente útil cuando la aplicación de las composiciones basadas en microbios se lleva a cabo en presencia de organismos vivos, tales como agricultores y ganado.

En una forma de realización, la composición para el tratamiento del suelo comprende una levadura no patógena. Preferentemente, la composición comprende una “levadura *killer*” no patógena, tal como *Wickerhamomyces anomalus*, u otras levaduras relacionadas con esta.

En una forma de realización, la composición comprende uno o más subproductos de crecimiento o metabolitos de la levadura. Por ejemplo, *W. anomalus* es capaz de producir una variedad de metabolitos, que incluyen enzimas tales como fitasa y exo beta-1, 3 glucanasa, así como biotensioactivos, que incluyen fosfolípidos y/o glucolípidos.

En algunas formas de realización, la composición además puede comprender uno o más microbios adicionales que pueden ser útiles para mejorar las propiedades de la rizósfera y/o mejorar la fitosanidad. La especie y la relación de los microorganismos adicionales y/u otros ingredientes en la composición se pueden personalizar según, por ejemplo, la planta en tratamiento, el tipo de suelo en donde está creciendo la planta, la fitosanidad al momento del tratamiento, así como otros factores. De este modo, la composición se puede ajustar para cualquier cultivo determinado.

Por ejemplo, en una forma de realización, la composición también comprende un hongo *Trichoderma* spp., por ejemplo, *T. harzianum*, *T. viride*, *T. hamatum*, y/o *T. reesei*). En una forma de realización, la composición también comprende una bacteria *Bacillus* spp., por ejemplo, *B. subtilis* y/o *B. amyloliquefaciens*.

En una forma de realización, la composición también comprende un microorganismo capaz de fijar, solubilizar y/o movilizar nitrógeno, potasio, fósforo (o fosfato) y/o micronutrientes en el suelo. En una forma de realización, se puede incluir una bacteria fijadora de nitrógeno, por ejemplo, *Azotobacter vinelandii*. En otra forma de realización, se puede incluir una bacteria movilizadora de potasio, por ejemplo, *Frateuria aurantia*.

En una forma de realización, el microorganismo o combinación de microorganismos de la presente composición comprende alrededor de 5 a 20 % de la composición total en peso, o alrededor de 8 a 15 %, o alrededor de 10 a 12 %. En una forma de realización, la composición comprende alrededor de 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 cada microorganismo.

La combinación y la relación de las especies de los microorganismos y otros ingredientes en la composición se pueden personalizar según, por ejemplo, la planta en tratamiento, el tipo de suelo en donde está creciendo la planta, la fitosanidad al momento del tratamiento, así como otros factores.

Los microbios y las composiciones basados en microbios de la presente invención tienen numerosas propiedades beneficiosas que son útiles para mejorar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento. Por ejemplo, las composiciones pueden comprender productos que resultan del crecimiento de los microorganismos, tales como biotensioactivos, proteínas y/o enzimas, en forma purificada o cruda.

En una forma de realización, los microorganismos de la presente composición son capaces de producir un biotensioactivo. En otra forma de realización, se pueden producir biotensioactivos por separado mediante otros microorganismos y agregar a la composición, en forma purificada o en forma cruda. Los biotensioactivos de forma cruda pueden comprender, por ejemplo, biotensioactivos y otros productos de crecimiento celular en un medio de fermentación que resulta del cultivo de un microbio productor de biotensioactivos. Esta composición de biotensioactivos de forma cruda puede comprender de alrededor de 0,001 % a alrededor de 90 %, alrededor de 25 % a alrededor de 75 %, alrededor de 30 % a alrededor de 70 %, alrededor de 35 % a alrededor de 65 %, alrededor de 40 % a alrededor de 60 %, alrededor de 45 % a alrededor de 55 %, o alrededor de 50 % de biotensioactivo puro.

Los biotensioactivos forman una clase importante de metabolitos secundarios producidos por una variedad de microorganismos tales como bacterias, hongos y levaduras. Como moléculas anfifílicas, los biotensioactivos microbianos reducen las tensiones interfaciales y superficiales entre las moléculas de líquidos, sólidos y gases. Asimismo, los biotensioactivos de acuerdo con la presente invención son biodegradables, tienen toxicidad baja, son eficaces en la solubilización y degradación de compuestos insolubles en suelo y se pueden producir usando recursos renovables y de bajo costo. Pueden inhibir la adhesión de microorganismos no deseados a una variedad de superficies, prevenir la formación de biopelículas, y tener poderosas propiedades emulsionantes y desemulsionantes. Asimismo, los biotensioactivos

también se pueden usar para mejorar la mojabilidad y para lograr solubilización y/o distribución parejas de fertilizantes, nutrientes y agua en el suelo.

Los biotensioactivos de acuerdo con los métodos de la presente se pueden seleccionar de, por ejemplo, glucolípidos 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 liquenisina), flavolípidos, fosfolípidos (por ejemplo, cardiolipinas), y polímeros de alto peso molecular tales como lipoproteínas, complejos lipopolisacárido-proteína, y complejos polisacárido-proteína-ácido graso.

La composición puede comprender uno o más biotensioactivos a una concentración de 0,001 % a 10 %, 0,01 % a 5 %, 0,05 % a 2 %, y/o de 0,1 % a 1 %.

De manera ventajosa, de acuerdo con la presente invención, la composición para el tratamiento del suelo puede comprender el medio en el que cada uno de los microorganismos se cultivaron. La composición puede ser, por ejemplo, al menos, en peso, 1 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, o 100 % de medio de cultivo.

El medio de fermentación puede contener un cultivo vivo y/o inactivo, subproductos de crecimiento de forma purificada o cruda, tales como biotensioactivos, enzimas, y/u otros metabolitos, y/o cualquier nutriente residual. La cantidad de biomasa en la composición, en peso, puede ser, por ejemplo, de alrededor de 0,01 % a 100 %, alrededor de 1 % a 90 %, alrededor de 5 % a alrededor de 80 %, o alrededor de 10 % a alrededor de 75 %.

El producto de la fermentación puede usarse directamente, con o sin extracción o purificación. Si resulta conveniente, la extracción y purificación pueden lograrse con facilidad usando métodos estándar de extracción y/o purificación o técnicas descritas en la literatura.

En una forma de realización, cuando una combinación de cepas de microorganismos se incluye en la composición, las diferentes cepas de microbios se cultivan por separado y luego se mezclan entre sí para producir la composición para el tratamiento del suelo.

En una forma de realización, la composición preferentemente se formula para aplicación al suelo, semillas, plantas enteras, o partes de plantas (que incluyen, entre otras, raíces, tubérculos, tallos, flores y hojas). En algunas formas de realización, la composición se formula como, por ejemplo, líquido, polvo, gránulos, microgránulos, pelets, polvo humectable, polvo fluidizable, emulsiones, microcápsulas, aceites, o aerosoles.

Para mejorar o estabilizar los efectos de la composición, puede mezclarse con adyuvantes adecuados y luego usarse como tal o después de dilución, de ser necesario. En formas de realización preferidas, la composición se formula como un líquido, líquido concentrado, o como polvo seco o gránulos que se pueden mezclar con agua y otros componentes para formar un producto líquido.

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

Las composiciones se pueden usar solos o en combinación con otros compuestos y/o métodos para mejorar eficazmente la salud, el crecimiento y/o el rendimiento, y/o para enriquecer el crecimiento del primer y segundo microbios. Por ejemplo, en una forma de realización, la composición puede incluir y/o se puede aplicar simultáneamente con nutrientes y/o micronutrientes para mejorar el crecimiento de las plantas y/o microbios, tales como magnesio, fosfato, nitrógeno, potasio, selenio, calcio, azufre, hierro, cobre, y zinc; y/o uno o más prebióticos, tales como extracto de alga, ácido fúlvico, quitina, humato y/o ácido húmico. Los materiales exactos y las cantidades de estos pueden ser determinados por un agricultor o un científico agrícola que tiene el beneficio de la presente divulgación.

Las composiciones también se pueden usar en combinación con otros compuestos agrícolas y/o sistemas de gestión de cultivos. En una forma de realización, la composición puede opcionalmente comprender, o se puede aplicar con, por ejemplo, plaguicidas naturales y/o químicos (por ejemplo, azoxistrobín, ipconazol, metalaxil, trifloxistrobín, clotianidín, VOTIVO, tiametoxam, ciantraniliprol, fludioxonil, tioxazafén, glucolípidos, lipopéptidos, DEET, tierra diatomácea, citronela, aceites esenciales, aceites minerales, extracto de ajo, extracto de ají), repelentes, herbicidas, fertilizantes, tratamientos de agua, tensioactivos no iónicos y/o mejoradores del suelo que son compatibles con el microorganismo o combinación de microorganismos que se aplica.

Otros componentes se pueden agregar a la composición, por ejemplo, agentes amortiguadores, portadores, otras composiciones basadas en microbios producidas en la misma instalación o en una distinta, modificadores de la viscosidad, conservantes, nutrientes para el crecimiento microbiano, agentes de rastreo, biocida, otros microbios, tensioactivos, emulgentes, lubricantes, agentes que controlan la solubilidad, agentes de ajuste del pH, conservantes, estabilizantes y agentes resistentes a la luz

ultravioleta.

El pH de la composición basada en microbios debe ser adecuado para el microorganismo de interés. En una forma de realización preferida, el pH de la composición basada en microbios final varía de 3,0 a 8,0, o alrededor de 3,5 a 7,0.

Opcionalmente, la composición puede almacenarse antes de su uso. El tiempo de almacenamiento es preferentemente corto. Por ende, el tiempo de almacenamiento puede ser de menos de 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 forma de realización preferida, si existen células vivas presentes en el producto, el producto se almacena a una temperatura fría, por ejemplo, menos de 20 °C, 15 °C, 10 °C o 5 °C.

Sin embargo, las composiciones basadas en microbios pueden usarse sin estabilización, conservación y almacenamiento adicionales. De manera ventajosa, el uso directo de estas composiciones basadas en microbios conserva una alta viabilidad de los microorganismos, reduce la posibilidad de contaminación por agentes exógenos y microorganismos no deseados, y mantiene la actividad de los subproductos de crecimiento microbiano.

Sin embargo, las composiciones basadas en microbios pueden usarse sin estabilización, conservación y almacenamiento adicionales. De manera ventajosa, el uso directo de estas composiciones basadas en microbios conserva una alta viabilidad de los microorganismos, reduce la posibilidad de contaminación por agentes exógenos y microorganismos no deseados, y mantiene la actividad de los subproductos de crecimiento microbiano.

En otras formas de realización, la composición (microbios, medio de cultivo, o microbios y medio) se puede colocar en contenedores de tamaño apropiado, teniendo en cuenta, por ejemplo, el uso previsto, el método de aplicación contemplado, el tamaño del recipiente de fermentación, y cualquier modo para transportar desde la instalación para crecimiento microbiano hasta el lugar de uso. De este modo, los contenedores en los que se coloca la composición basada en microbios pueden ser, por ejemplo, de 1 pinta a 1000 galones o más. En determinadas formas de realización, los contenedores son de 1 galón, 2 galones, 5 galones, 25 galones o más.

Cultivo de microbios de acuerdo con la presente invención

La presente invención utiliza métodos para el cultivo de microorganismos y producción de metabolitos microbianos y/u otros subproductos de crecimiento microbiano. La presente invención además utiliza procesos de cultivo que son adecuados para el cultivo de microorganismos y la producción de metabolitos

microbianos en una escala deseada. Estos procesos de cultivo incluyen, entre otros, cultivo/fermentación sumergida, fermentación en estado sólido (SSF), y modificaciones, híbridos y/o combinaciones de estos.

Como se usa en la presente, “fermentación” se refiere al cultivo o crecimiento de células en condiciones controladas. El crecimiento puede ser aeróbico o anaeróbico. En formas de realización preferidas, los microorganismos se cultivan mediante SSF y/o versiones modificadas de esta.

En una forma de realización, la presente invención proporciona 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 proteínas).

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

En otra forma de realización, el recipiente también puede ser capaz de monitorear el crecimiento de los microorganismos dentro del recipiente (por ejemplo, medición de cantidad de células y fases de crecimiento). De manera alternativa, se puede tomar una muestra diaria del recipiente y someterla a enumeración mediante técnicas conocidas en el estado de la técnica, tales como la técnica de dilución en placas. La dilución en placas es una técnica simple usada para estimar la cantidad de organismos en una muestra. La técnica también puede proporcionar un índice mediante el que se pueden comparar diferentes entornos o tratamientos.

En una forma de realización, el método incluye enriquecer el cultivo con una fuente de nitrógeno. La fuente de nitrógeno puede ser, por ejemplo, nitrato de potasio, nitrato de amonio, sulfato de amonio, fosfato de amonio, amoníaco, urea, y/o cloruro de amonio. Estas fuentes de nitrógeno se pueden usar de manera independiente o en una combinación de dos o más.

El método puede proporcionar oxigenación al cultivo en crecimiento. Una forma de realización utiliza un movimiento lento del aire para retirar el aire con bajo contenido de oxígeno e introducir aire oxigenado. En el caso de la fermentación sumergida, el aire oxigenado puede ser aire ambiente enriquecido diariamente a través de

mecanismos que incluyen impulsores para agitación mecánica de líquido, y aspersores de aire para proporcionar burbujas de gas al líquido para la disolución de oxígeno en el líquido.

El método puede además comprender el enriquecimiento del cultivo con una fuente de carbono. En general, la fuente de carbono es 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 aceites tales como aceite de soja, aceite de canola, aceite de salvado de arroz, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de sésamo y/o aceite de lino; etc. Estas fuentes de carbono se pueden usar de manera independiente o en una combinación de dos o más.

En una forma de realización, se incluyen en el medio los factores de crecimiento y micronutrientes para microorganismos. Esto se prefiere en particular cuando se cultivan microbios que no pueden producir todas las vitaminas que requieren. También se pueden incluir en el medio los nutrientes inorgánicos, que incluyen oligoelementos tales como hierro, zinc, cobre, manganeso, molibdeno y/o cobalto. Asimismo, fuentes de vitaminas, aminoácidos esenciales y microelementos se pueden incluir, por ejemplo, en forma de harinas o sémolas, tales como harina de maíz, o en forma de extractos, tales como extracto de levadura, extracto de papa, extracto de carne vacuna, extracto de soja, extracto de cáscara de banana, y similares, o en formas purificadas. También se pueden incluir aminoácidos tales como, por ejemplo, aquellos útiles para la biosíntesis de proteínas.

En una forma de realización, también se pueden incluir sales inorgánicas. Usable sales inorgánicas se puede dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio, hidrogenofosfato 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, cloruro de calcio y/o carbonato de sodio. Estas sales inorgánicas se pueden usar de manera independiente o en una combinación de dos o más.

En algunas formas de realización, el método para cultivo también puede comprender agregar agentes antimicrobianos y/o ácidos adicionales en el medio antes y/o durante el proceso de cultivo. Los agentes antimicrobianos o antibióticos se usan para proteger el cultivo de la contaminación.

Además, agentes antiespuma también se pueden agregar para prevenir la

formación y/o acumulación de espuma durante el cultivo sumergido.

El pH de la mezcla debe ser adecuado para el microorganismo de interés. Amortiguadores y reguladores del pH, tales como carbonatos y fosfatos, se pueden usar para estabilizar el pH cerca de un valor preferido. Cuando iones de metal están presentes en concentraciones altas, puede ser necesario el uso de un agente quelante en el medio.

Los microbios se pueden cultivar en forma planctónica o como biopelícula. En el caso de la biopelícula, el recipiente puede tener adentro un sustrato sobre el que se pueden cultivar los microbios en un estado de biopelícula. El sistema también puede tener, por ejemplo, la capacidad de aplicar estímulos (tales como tensión de cizallamiento) que promueven y/o mejoran las características de crecimiento de la biopelícula.

En una forma de realización, el método para cultivo de microorganismos se lleva a cabo de alrededor de 5° a alrededor de 100 °C, preferentemente, 15 a 60 °C, con mayor preferencia, 25 a 50 °C. En otra forma de realización, el cultivo se puede llevar a cabo de manera continua a una temperatura constante. En otra forma de realización, el cultivo se puede someter a temperaturas cambiantes.

En una forma de realización, el equipo usado en el método y proceso de cultivo es estéril. El equipo de cultivo tal como el reactor/recipiente puede estar separado de, pero conectado con, una unidad de esterilización, por ejemplo, un autoclave. El equipo de cultivo también puede tener una unidad de esterilización que esteriliza *in situ* antes de iniciar la inoculación. Se puede esterilizar aire mediante métodos conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, el aire ambiente puede pasar a través de al menos un filtro antes de ser introducido en el recipiente. En otras formas de realización, el medio se puede pasteurizar o, de manera opcional, no agregar calor, en donde el uso de poca actividad acuosa y pH bajo se pueden explotar para controlar el crecimiento bacteriano no deseado.

En una forma de realización, la presente invención además proporciona un método para producir metabolitos microbianos tales como, por ejemplo, biotensioactivos, enzimas, proteínas, etanol, ácido láctico, beta-glucano, péptidos, intermediarios metabólicos, ácido graso poliinsaturado y lípidos, mediante el cultivo de una cepa de microbio de la presente invención en condiciones apropiadas para el crecimiento y la producción de metabolito; y, de manera opcional, purificar el metabolito. El contenido de metabolito producido mediante el método puede ser, por ejemplo, al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %.

El subproducto de crecimiento microbiano producido por microorganismos de interés se puede retener en los microorganismos o secretar en el medio de cultivo. 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.

La concentración celular puede ser, por ejemplo, al 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 el cultivo de microorganismos y la producción de los subproductos microbianos se puede llevar a cabo en un lote, un proceso cuasicontinuo o un proceso continuo.

En una forma de realización, toda la composición de cultivo microbiano se retira al completar el cultivo (por ejemplo, al lograr una densidad celular deseada o la densidad de un metabolito específico). En este procedimiento en lote, un lote completamente nuevo se inicia al cosechar el primer lote.

En otra forma de realización, solo una porción del producto de fermentación se retira en cualquier momento. En esta forma de realización, la biomasa con células, esporas, conidios, hifas y/o micelios viables permanece en el recipiente como un inoculante para un nuevo lote de cultivo. La composición que se retira puede ser un medio libre de células o contener células, esporas u otros propágulos reproductivos, y/o una combinación de estos. De esta manera, se crea un sistema cuasicontinuo.

De manera ventajosa, el método no requiere equipo complejo o consumo de energía alto. Los microorganismos de interés se puede cultivar a pequeña o gran escala en el sitio y utilizar, incluso si aún se encuentran mezclados con sus medios.

De manera ventajosa, los productos basados en microbios se pueden producir en ubicaciones remotas. Las instalaciones para crecimiento microbiano pueden fuera de la red utilizando, por ejemplo, energía solar, eólica y/o hidroeléctrica.

Cepas microbianas

Los microorganismos útiles de acuerdo con la presente invención pueden ser, por ejemplo, cepas de bacterias no patógenas de las plantas, levadura y/u hongos. Estos microorganismos pueden ser microorganismos naturales o modificados genéticamente. Por ejemplo, los microorganismos se pueden transformar con genes específicos para exhibir características específicas. Además, los microorganismos pueden ser mutantes de una cepa deseada. Como se usa en la presente, "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, mutación de aminoácido, mutación interruptora, eliminación, duplicación, mutación de desplazamiento de marco o expansión por repetición) en comparación con el microorganismo de referencia. Los procedimientos para elaborar mutantes son conocidos en el estado de la técnica de la microbiología. Por ejemplo, mutagénesis por UV y nitrosoguanidina se usan extensamente para este fin.

En una forma de realización, el microorganismo es una levadura u hongo. Las especies adecuadas de levadura y hongos para el 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. uvarum*), *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces* (por ejemplo, *K. phaffii*), *Mortierella*, *Mycorrhiza*, *Penicillium*, *Phycomyces*, *Pichia* (por ejemplo, *P. anomala*, *P. guilliermondii*, *P. occidentalis*, *P. kudriavzevii*), *Pleurotus* spp. (por ejemplo, *P. ostreatus*), *Pseudozyma* (por ejemplo, *P. aphidis*), *Saccharomyces* (por ejemplo, *S. boulardii* sequela, *S. cerevisiae*, *S. torula*), *Starmerella* (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 otras.

En algunas formas de realización, el microorganismo es cualquier levadura denominada “levadura *killer*” caracterizada por secretar glucoproteínas o proteínas tóxicas, a las que la cepa misma es inmune. Estas pueden incluir, por ejemplo, *Candida* (por ejemplo, *C. nodaensis*), *Cryptococcus*, *Debaryomyces* (por ejemplo, *D. hansenii*), *Hanseniaspora*, (por ejemplo, *H. uvarum*), *Hansenula*, *Kluyveromyces* (por ejemplo, *K. phaffii*), *Pichia* (por ejemplo, *P. anomala*, *P. guilliermondii*, *P. occidentalis*, *P. kudriavzevii*), *Saccharomyces* (por ejemplo, *S. cerevisiae*), *Torulopsis*, *Ustilago* (por ejemplo, *U. maydis*), *Wickerhamomyces* (por ejemplo, *W. anomalus*), *Williopsis* (por ejemplo, *W. mrakii*), *Zygosaccharomyces* (por ejemplo, *Z. bailii*), y otras.

En algunas formas de realización, los microorganismos son bacterias, que incluyen bacterias gram-positivas y gram-negativas. Las bacterias puede 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*), *Frateriuria* (por ejemplo, *F. aurantia*), *Microbacterium* (por ejemplo, *M. laevaniformans*), mixobacterias (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 *Thiobacillus thiooxidans* (*Acidothiobacillus thiooxidans*).

En una forma de realización específica, la presente invención utiliza levaduras *killer*. Preferentemente, estas levaduras son capaces de colonizar las raíces de una planta en la interfase raíz-suelo, y proporcionar beneficios a la rizósfera. Aún más específicamente, los microbios de la presente invención incluyen *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*). También se prevén otras especies estrechamente relacionadas, que incluyen otros miembros de los clados *Wickerhamomyces* y/o *Pichia*, por ejemplo, *Pichia guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*), *Pichia kudriavzevii*, y/o *Pichia occidentalis*.

W. anomalus tiene una cantidad de características beneficiosas que son útiles para la presente invención, que incluyen su capacidad de producir metabolitos ventajosos. Por ejemplo, *W. anomalus* es capaz de producir exo- β -1,3-glucanasa, un enzima capaz de controlar o inhibir el crecimiento de un espectro amplio de hongos patógenos.

En una forma de realización, *Wickerhamomyces anomalus* es capaz de producir uno o más biotensioactivos, que incluyen por ejemplo, un fosfolípido y/o un glucolípido. En algunas formas de realización, el fosfolípido es una cardiolipina u otro fosfolípido estructuralmente similar a la cardiolipina. En algunas formas de realización, el glucolípido es un soforolípido.

Además de diversos subproductos, esta levadura es capaz de producir fitasa y proporcionar proteínas (que contienen hasta 50 % de biomasa celular seca), lípidos y fuentes de carbono, así como un espectro completo de minerales y vitaminas (B1; B2; B3 (PP); B5; B7 (H); B6; E).

En algunas formas de realización, el microorganismo es un hongo *Trichoderma* spp., por ejemplo, *T. harzianum*, *T. viride*, *T. hamatum* y/o *T. reesei*.

Además de proteger las plantas de patógenos y plagas, la colonización de las raíces por *Trichoderma* spp. puede mejorar el crecimiento y desarrollo de las raíces, productividad del cultivo, resistencia a estrés abiótico, y biodisponibilidad de nutrientes.

En algunas formas de realización, el microorganismo es una bacteria *Bacillus* spp., por ejemplo, *B. subtilis* y/o *B. amyloliquefaciens*. En una forma de realización, la bacteria es *B. amyloliquefaciens* subsp. *locus*. En algunas formas de realización, el

microbio *Bacillus* puede solubilizar compuestos de fósforo en el suelo.

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

En algunas formas de realización, el microorganismo es uno que es capaz de fijar y/o solubilizar nitrógeno, potasio, fósforo y/u otros micronutrientes en el suelo.

En una forma de realización, el microorganismo es un microorganismo fijador de nitrógeno, o un diazótrofo, seleccionado de especies de, por ejemplo, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Chlorobiaceae*, *Cyanothece*, *Frankia*, *Klebsiella*, rizobios, *Trichodesmium*, y algunas arqueas. En una forma de realización específica, la bacteria fijadora de nitrógeno es *Azotobacter vinelandii*.

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

En una forma de realización, la combinación de microorganismos aplicado a una planta y/o su entorno circundante se personaliza para una planta y/o un entorno determinados. De manera ventajosa, en algunas formas de realización, la combinación de microbios funciona sinérgicamente entre sí para mejorar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento de las plantas.

Preparación de productos basados en microbios

Un producto basado en microbios 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 la fermentación puede usarse directamente sin extracción o purificación. Si resulta conveniente, la extracción y purificación pueden lograrse con facilidad usando métodos estándar de extracción y/o purificación o técnicas descritas en la literatura.

Los microorganismos en los productos basados en microbios pueden estar en una forma activa o inactiva, o en forma de células vegetativas, esporas reproductivas, conidios, micelios, hifas, o cualquier forma de propágulo microbiano. Los productos basados en microbios también pueden contener una combinación de cualquiera de estas formas de un microorganismo.

En una forma de realización, diferentes cepas de microbios se cultivan por separado y luego se mezclan entre sí para producir el producto basado en microbios.

Los microbios pueden, opcionalmente, mezclarse con el medio en que se cultivan y secarse antes de mezclarse.

En una forma de realización, las diferentes cepas no se mezclan entre sí, sino que se aplican a una planta y/o su entorno como productos basados en microbios separados.

Los productos basados en microbios pueden usarse sin estabilización, conservación, y almacenamiento adicionales. De manera ventajosa, el uso directo de estos productos basados en microbios conserva una alta viabilidad de los microorganismos, reduce la posibilidad de contaminación por agentes exógenos y microorganismos no deseados, y mantiene la actividad de los subproductos de crecimiento microbiano.

Después de cosechar la composición basada en microbios de los recipientes de cultivo, pueden agregarse componentes a medida que el producto cosechado se ubica en contenedores o, de otro modo, se transporta para su uso. Los aditivos pueden ser, por ejemplo, amortiguadores, portadores, otras composiciones basadas en microbios producidas en la misma instalación o en una distinta, modificadores de la viscosidad, conservantes, nutrientes para el crecimiento microbiano, tensioactivos, emulgentes, lubricantes, agentes que controlan la solubilidad, agentes de rastreo, solventes, biocidas, antibióticos, agentes de ajuste del pH, quelantes, estabilizantes, agentes resistentes a la luz ultravioleta, otros microbios y otros aditivos adecuados que se usan habitualmente para dichas preparaciones.

En una forma de realización, se pueden agregar agentes amortiguadores, que incluyen ácidos orgánicos y aminoácidos o sus sales. Los amortiguadores adecuados incluyen 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 estos. También pueden usarse ácidos fosfóricos o fosforosos o sus sales. Los amortiguadores sintéticos son adecuados para su uso, pero es preferible usar amortiguadores naturales, tales como ácidos orgánicos y aminoácidos o sus sales enumeradas anteriormente.

En otra forma de realización, los agentes de ajuste del pH incluyen hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, carbonato o bicarbonato de potasio, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico o una mezcla. El pH de la composición basada en microbios debe ser adecuado para los microorganismos de interés.

En una forma de realización, en la formulación pueden incluirse componentes

adicionales, tales como una preparación acuosa de una sal, tal como carbonato o bicarbonato de sodio, sulfato de sodio, fosfato de sodio, bifosfato de sodio.

En algunas formas de realización, una sustancia adherente puede agregarse a la composición, a fin de prolongar la adherencia del producto a las partes de la planta. Pueden usarse polímeros, tales como polímeros cargados, o sustancias basadas en polisacáridos, por ejemplo, goma xantana, goma guar, levano, xilinano, goma gellan, curdlano, pululano, dextrano y otros.

En formas de realización preferidas, la goma xantana de grado comercial se usa como el adherente. La concentración de la goma debe seleccionarse en función del contenido de la goma en el producto comercial. Si la goma xantana es de alta pureza, entonces 0,001 % (p/v – goma xantana/solución) es suficiente.

En una forma de realización, glucosa, glicerol y/o glicerina pueden agregarse al producto basado en microbios para usarse como, por ejemplo, un osmótico durante el almacenamiento y el transporte. En una forma de realización, pueden incluirse melazas.

En una forma de realización, pueden agregarse prebióticos a y/o aplicarse simultáneamente con el producto basado en microbios para mejorar el crecimiento microbiano. Los prebióticos adecuados, incluyen, por ejemplo, extracto de alga, ácido fúlvico, quitina, humato y/o ácido húmico. En una forma de realización específica, la cantidad de prebióticos aplicada es de alrededor de 0,1 l/acre a alrededor de 0,5 l/acre, o alrededor de 0,2 l/acre a alrededor de 0,4 l/acre.

De manera opcional, el producto puede almacenarse antes de su uso. El tiempo de almacenamiento es preferentemente corto. Por ende, el tiempo de almacenamiento puede ser de menos de 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 forma de realización preferida, si existen células vivas presentes en el producto, el producto se almacena a una temperatura fría, por ejemplo, menos de 20 °C, 15 °C, 10 °C o 5 °C.

Producción local de productos basados en microbios

En algunas formas de realización de la presente invención, una instalación para crecimiento microbiano produce microorganismos nuevos de alta densidad y/o subproductos de interés de crecimiento microbiano en una escala deseada. La instalación para crecimiento microbiano puede ubicarse en o cerca del sitio de aplicación. La instalación produce composiciones basadas en microbios de alta densidad en cultivos por lotes, cuasicontinuos o continuos.

Las instalaciones para crecimiento microbiano de la presente invención pueden

ubicarse en el lugar en el que usará el producto basado en microbios (por ejemplo, una plantación de cítricos). Por ejemplo, la instalación para crecimiento microbiano puede encontrarse a menos de 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 15, 10, 5, 3 o 1 milla del lugar de uso.

Dado que el producto basado en microbios puede generarse localmente, sin necesitar los procesos de estabilización del microorganismo, conservación, almacenamiento y transporte de la producción microbiana convencional, puede generarse una densidad mucho mayor de microorganismos, y, por ende, requiere un menor volumen del producto basado en microbios para usar en la aplicación en el sitio o permite aplicaciones microbianas con una densidad mucho mayor en donde se necesitan para alcanzar la eficacia deseada. Esto permite el uso de un biorreactor reducido (por ejemplo, recipiente de fermentación más pequeño, menos suministros de material de inicio, nutrientes y agentes de control del pH), lo que vuelve al sistema eficaz y puede eliminar la necesidad estabilizar las células o separarlas de su medio de cultivo. La generación local del producto basado en microbios también facilita la inclusión del medio de cultivo en el producto. El medio puede contener agentes producidos durante la fermentación que son particularmente adecuados para el uso local.

Los cultivos de microbios robustos de alta densidad producidos localmente resultan más eficaces en el campo que los que se mantuvieron en la cadena de suministro durante un tiempo. Los productos basados en microbios de la presente invención son particularmente ventajosos en comparación con los productos tradicionales en los que las células se separaron de los metabolitos y nutrientes presentes en el medio de cultivo de fermentación. El tiempo reducido de transporte permite la producción y envío de lotes frescos de microbios y/o sus metabolitos según el tiempo y volumen requeridos por la demanda local.

Las instalaciones para crecimiento microbiano de la presente invención producen composiciones frescas basadas en microbios, que comprenden los microbios mismos, metabolitos microbianos y/u otros componentes del medio en el que los microbios se cultivan. Si resulta conveniente, las composiciones pueden tener una alta densidad de células vegetativas o propágulos, o una mezcla de células vegetativas y propágulos.

De manera ventajosa, las composiciones pueden ajustarse para su uso en una ubicación específica. En una forma de realización, la instalación para crecimiento microbiano se ubica en, o cerca de, un sitio en donde se usarán los productos basados

en microbios (por ejemplo, una plantación de cítricos).

De manera ventajosa, estas instalaciones para crecimiento microbiano proporcionan una solución para el actual problema que genera la dependencia de productores remotos a escala industrial cuya calidad de producto se ve afectada debido a la demora del procesamiento corriente arriba, los obstáculos en la cadena de suministro, el almacenamiento inadecuado y otras contingencias que impiden el envío y la aplicación oportunos de, por ejemplo, un producto viable de alto recuento celular y el medio y metabolitos asociados en donde las células se cultivan originalmente.

Las instalaciones para crecimiento microbiano proporcionan versatilidad de fabricación mediante su capacidad para ajustar los productos basados en microbios a fin de mejorar la sinergia con los lugares de destino. De manera ventajosa, en formas de realización preferidas, los sistemas de la presente invención aprovechan la energía de los microorganismos locales naturales y sus subproductos metabólicos para mejorar la producción agrícola.

El tiempo de cultivo para los recipientes individuales puede ser, por ejemplo, de 1 a 7 días o más. El producto de cultivo puede cosecharse de diversas maneras.

La producción local y el envío a las, por ejemplo, 24 horas de fermentación da como resultado composiciones puras y de alta densidad celular y costos de transporte sustancialmente menores. En vista de las perspectivas en cuanto a un veloz avance en el desarrollo de inoculantes microbianos más eficaces y potentes, los consumidores se beneficiarán ampliamente con esta capacidad para enviar con rapidez los productos basados en microbios.

Métodos para mejorar la salud de las raíces y salud inmunitaria en las plantas

En formas de realización preferidas, se proporciona un método para mejorar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento de las plantas, en donde una composición para el tratamiento del suelo, que comprende una levadura y/o un subproducto de crecimiento de esta, se pone en contacto con la planta y/o su entorno circundante. Preferentemente, la levadura es *Wickerhamomyces anomalus* o una especie en relación con esta. En algunas formas de realización, múltiples plantas y/o sus entornos circundantes se tratan de acuerdo con los métodos de la presente.

En algunas formas de realización, la composición para el tratamiento del suelo se pone en contacto con una planta o su entorno después de que se haya preparado la composición, por ejemplo, al disolver gránulos o polvo secos en agua. A fin de mejorar o estabilizar los efectos de la composición para el tratamiento, esta puede mezclarse con adyuvantes adecuados y luego usarse como tal o luego de diluirse, de

ser necesario.

En una forma de realización, microorganismos adicionales pueden aplicarse de manera simultánea con la levadura. Por ejemplo, puede aplicarse una micobacteria, 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 forma de realización, un microbio fijador de nitrógeno, por ejemplo, *Azotobacter vinelandii*, también puede aplicarse. En otra forma de realización, un microbio movilizador de potasio, por ejemplo, *Frateuria aurantia*, también puede aplicarse.

En algunas formas de realización, los microorganismos de la composición funcionan sinérgicamente entre sí para mejorar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento de las plantas, y/o para mejorar las propiedades de la rizósfera.

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

En una forma de realización, el método puede mejorar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento de las plantas al mejorar la salud y el crecimiento de las raíces. Más específicamente, en una forma de realización, los métodos pueden usarse para mejorar las propiedades de la rizósfera en donde crece la raíz de la planta, por ejemplo, las propiedades de retención de nutrientes y/o humedad.

De manera adicional, en una forma de realización, el método puede usarse para inocular una rizósfera con uno o más microorganismos beneficiosos. Por ejemplo, en formas de realización preferidas, los microbios de la composición para el tratamiento del suelo pueden colonizar la rizósfera y proporcionar múltiples beneficios a las plantas cuya raíz crece allí, que incluyen protección y nutrición.

De manera ventajosa, en una forma de realización, los métodos de la presente pueden usarse para mejorar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento en las plantas cuya salud inmunitaria se ve comprometida debido a una infección por un agente patógeno o un factor de estrés ambiental, por ejemplo, sequía. Por ende, en algunas formas de realización, los métodos de la presente también pueden usarse para mejorar la salud inmunitaria, o respuesta inmunitaria, de las plantas.

Como se usa en la presente, “aplicar” una composición o producto se refiere a poner en contacto una composición o producto con una diana o sitio, de modo que la composición o producto puedan tener un efecto sobre esa diana o sitio. El efecto puede deberse, por ejemplo, al crecimiento microbiano y/o interacción con una planta, así como la acción de un metabolito, enzima, biotensioactivo u otro subproducto de crecimiento microbiano. Aplicar también incluye “tratar” una diana o sitio con una composición.

La aplicación puede también incluir poner en contacto el producto basado en microbios directamente con una planta, parte de planta y/o el entorno circundante de la planta (por ejemplo, el suelo o la rizósfera). Como se usa en la presente, “entorno circundante” de la planta significa el suelo y/u otro medio en el que crece la planta, que puede incluir la rizósfera. En algunas formas de realización, el entorno circundante no se extiende, por ejemplo, a un radio de al menos 5 millas, 1 milla, 1000 pies, 500 pies, 300 pies, 100 pies, 10 pies, 8 pies o 6 pies de la planta.

El producto de microbios puede aplicarse como un tratamiento de semillas o a la superficie del suelo, o a la superficie de una planta o parte de planta (por ejemplo, a la superficie de las raíces, tubérculos, tallos, flores, hojas o frutos). Puede pulverizarse, verterse, esparcirse, inyectarse o untarse como un líquido, polvo seco, polvo, gránulos, microgránulos, pelets, polvo humectable, polvo fluidizable, emulsiones, microcápsulas, aceites, geles, pastas o aerosoles.

En una forma de realización específica, la composición se pone en contacto con una o más raíces de la planta. La composición se puede aplicar directamente en las raíces, por ejemplo, mediante pulverización o inmersión de las raíces, y/o indirectamente, por ejemplo, mediante administración de la composición al suelo en donde crecen las plantas (por ejemplo, la rizósfera). La composición se puede aplicar a las semillas de la planta antes o al momento de la plantación, o a cualquier otra parte de la planta y/o su entorno.

En algunas formas de realización, las composiciones que se proporcionan en la presente se aplican a la superficie del suelo sin incorporación mecánica. El efecto beneficioso de la aplicación en suelo puede activarse mediante precipitación, rociador, inundación o irrigación por goteo, y luego administrarse a, por ejemplo, las raíces de las plantas.

Las plantas y/o sus entornos pueden tratarse en cualquier punto del proceso de cultivación de la planta. Por ejemplo, la composición para el tratamiento del suelo puede aplicarse al suelo antes, durante o después del momento en que se plantan las

semillas. También puede aplicarse en cualquier momento a partir de entonces durante el desarrollo y el crecimiento de la planta, que incluyen la floración, el surgimiento del fruto y durante y/o después de la abscisión de las hojas.

En una forma de realización, el método puede usarse en un entorno agrícola a gran escala. El método puede comprender administrar la composición para el tratamiento del suelo en un tanque que se conecta a un sistema de irrigación usado para proporcionar agua, fertilizantes u otras composiciones líquidas a un cultivo, huerto frutal o campo. Por ende, la planta y/o el suelo que rodea la planta pueden tratarse con la composición para el tratamiento del suelo mediante, por ejemplo, inyección en el suelo, empapado del suelo, o usando un sistema de irrigación por pivote central, o con un pulverizador sobre el surco de semillas, o con rociadores o irrigadores por goteo. De manera ventajosa, el método resulta adecuado para tratar al mismo tiempo cientos de acres de cultivos, huertos frutales o campos.

En una forma de realización, el método puede usarse en un entorno de menor escala, tal como un jardín doméstico o invernadero. En esos casos, el método puede comprender pulverizar una planta y/o su entorno circundante con la composición para el tratamiento del suelo usando un rociador de jardín y césped manual. La composición se puede mezclar con agua y, opcionalmente, otros tratamientos para césped y jardín, tales como fertilizantes y plaguicidas. La composición también puede mezclarse con un sistema de riego manual estándar y verterse en el suelo.

En algunas formas de realización, la planta que recibe el tratamiento está saludable. De manera ventajosa, la presente invención puede ser útil para mejorar la respuesta inmunitaria de una planta que tiene el sistema inmunitario comprometido, por ejemplo, porque la planta está afectada por una enfermedad y/o síntomas de una enfermedad.

Por ejemplo, la planta puede estar afectada por una cepa patógena 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 los cítricos), cancrrosis de los cítricos, enfermedad de la mancha

bacteriana de los cítricos, clorosis variegada de los cítricos, podredumbre marrón, podredumbre de raíz de los cítricos, enfermedad de la mancha negra de los cítricos.

En una forma de realización, los métodos se usan para mejorar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento de los árboles de cítricos afectados por enfermedad de enverdecimiento de los cítricos y/o canchros de los cítricos.

La presente invención puede usarse para mejorar la salud, el crecimiento y/o el rendimiento de las plantas y/o cultivos en, por ejemplo, la agricultura, horticultura, invernaderos, paisajismo y similares. La presente invención también puede usarse para mejorar una o más cualidades del suelo, a fin de aumentar así el rendimiento de los suelos para fines agrícolas, domésticos y de jardinería. Además, la presente invención puede usarse en la gestión de pastizales, así como en la gestión profesional de la vegetación y el paisaje.

En algunas formas de realización, la composición para el tratamiento del suelo también puede aplicarse de modo que promueva la colonización de las raíces y/o rizósfera, así como del sistema vascular de la planta, a fin de mejorar su fitosanidad y vitalidad. Por ende, el crecimiento de microbios fijadores de nutrientes, tales como *Rhizobium* y/o *Mycorrhizae*, puede promoverse, así como otros microbios beneficiosos endógenos y exógenos, y/o sus subproductos que promueven el crecimiento, la salud y el rendimiento del cultivo. El producto basado en microbios soporta el sistema vascular de la planta, por ejemplo, al entrar en y colonizar dicho sistema vascular y contribuir con metabolitos, y nutrientes importantes para la fitosanidad y productividad.

En otra forma de realización, el método se puede usar para combatir y/o desalentar la colonización de la rizósfera por microorganismos del suelo que son perjudiciales o que pueden competir con microorganismos del suelo beneficiosos.

En una forma de realización, el método puede usarse para mejorar la penetración de moléculas beneficiosas a través de las capas externas de las células de la raíz, por ejemplo, en la interfase raíz-suelo de la rizósfera.

La presente invención puede usarse para mejorar diversas cualidades de cualquier tipo de suelo, por ejemplo, suelo arcilloso, arenoso, fangoso, turboso, gredoso, margoso, y/o combinaciones de estos. Además, los métodos y composiciones pueden usarse para mejorar la calidad de los suelos secos, con saturación hídrica, porosos, agotados, compactados y/o combinaciones de estos. El suelo puede incluir el suelo presente en la rizósfera o suelo que se encuentra fuera de la rizósfera.

En una forma de realización, el método puede usarse para mejorar el drenaje

y/o la dispersión del agua en suelos con saturación hídrica. En una forma de realización, el método puede usarse para mejorar la retención de agua en suelo seco.

En una forma de realización, el método puede usarse para mejorar la retención de nutrientes en suelos porosos y/o agotados. Asimismo, en una forma de realización, el método se puede usar para proporcionar un nutriente a una planta, y/o para tratar y/o prevenir una deficiencia de nutrientes en una planta. Por ejemplo, en una forma de realización, cuando la levadura de la composición para el tratamiento del suelo muere, sus células proporcionan una abundancia de nutrientes, proteínas, vitaminas, y minerales que son utilizadas por las plantas y/u otra microbiota del suelo.

En otra forma de realización, en donde la levadura de la composición para el tratamiento del suelo produce fitasa, el método se puede usar para proporcionarle a la planta fósforo en forma de fosfatos. La fitasa es capaz de convertir ácido fítico presente en el suelo en fosfatos biodisponibles a las plantas (por ejemplo, absorbibles por las raíces). En consecuencia, el método se puede usar para tratar y/o prevenir una deficiencia de fósforo en una planta.

En una forma de realización, el método controla las bacterias patógenas. En una forma de realización, el método funciona para mejorar de manera indirecta las respuestas inmunitarias de la planta al mejorar la salud inmunitaria de las plantas y aumentar su capacidad para combatir infecciones.

En otra forma de realización, el método controla plagas que pueden actuar como vectores o portadores de bacterias patógenas. En la mayoría de las enfermedades de plantas causadas por bacterias patógenas de las plantas (en especial las que causan manchas, cancros, tizones, agallas o podredumbre blanda), la bacteria puede escapar hacia la superficie de la planta huésped como gotas o masas de exudados pegajosos. Los exudados bacterianos se liberan a través de grietas o lesiones en el área infectada, o a través de aberturas naturales en el área infectada de la planta. Por ende, es probable que dichas bacterias se adhieran a las patas y cuerpos de insectos, tales como moscas, áfidos, hormigas, escarabajos, moscas blancas, etc., que se posan sobre la planta y entran en contacto con la sustancia.

Muchos de estos insectos son atraídos por los azúcares contenidos en el exudado bacteriano, con los que se alimentan y frotan en su cuerpo y piezas bucales. Cuando los insectos se mueven a otras partes de la planta u otras plantas huésped susceptibles, pueden transportar numerosas bacterias en su cuerpo. Si los insectos se posan sobre una lesión reciente o una abertura natural en una planta, y hay suficiente humedad en la superficie de la planta, la bacteria puede multiplicarse, moverse a la

planta y comenzar una nueva infección. Por ende, los métodos de la presente pueden evitar la expansión de las bacterias patógenas de las plantas al controlar, por ejemplo, matar, estas plagas portadoras.

Los productos basados en microbios pueden usarse solos o en combinación con otros compuestos para la mejora eficaz de la salud, el crecimiento y/o el rendimiento de las plantas, así como otros compuestos para el tratamiento y la prevención eficaces de las plagas patógenas de las plantas. Por ejemplo, los métodos se pueden usar de manera simultánea con fuentes de nutrientes y/o micronutrientes para mejorar el crecimiento de las plantas y/o microbios, tales como magnesio, fosfato, nitrógeno, potasio, selenio, calcio, azufre, hierro, cobre, y zinc; y/o uno o más prebióticos, tales como extracto de alga, ácido fúlvico, quitina, humato y/o ácido húmico. Los materiales exactos y las cantidades de estos pueden ser determinados por un agricultor o un científico agrícola que tiene el beneficio de la presente divulgación.

Las composiciones también se pueden usar en combinación con otros compuestos agrícolas y/o sistemas de gestión de cultivos. En una forma de realización, la composición puede opcionalmente comprender, y/o aplicarse con, por ejemplo, plaguicidas naturales y/o químicos, repelentes, herbicidas, fertilizantes, tratamientos del agua, tensioactivos no iónicos y/o mejoradores del suelo.

En una forma de realización, las composiciones objeto pueden usarse con compuestos agrícolas caracterizados como inhibidores de incrustaciones, por ejemplo, ácido hidroxietiliden difosfónico;

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

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

fertilizantes, por ejemplo, fertilizantes N-P-K, nitrato de amonio y 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;

fungicidas, por ejemplo, clorotalonil, manicozeb hexametilentetramina, tris de aluminio, azoxistrobín, *Bacillus* spp. (por ejemplo, *B. licheniformis* cepa 3086, *B. subtilis*, *B. subtilis* cepa QST 713), benomilo, boscalid, piraclostrobín, captán, carboxín, cloroneb, clorotalonil, sulfato de cobre, ciazofamida, diclorán, dimetomorf, etridiazol, tiofanato-metilo, fenamidona, fenarimol, fludioxonil, fluopicolida, flutolanil, iprodiona, mancozeb, maneb, mefanoxam, fludioxonil, mefenoxam, metalaxil, miclobutanil,

oxatiapiprolín, pentacloronitrobenceno (quintoceno), ácido fosforoso, propamocarb, propanil, piraclostrobín, *Reynoutria sachalinensis*, *Streptomyces* spp. (por ejemplo, *S. griseoviridis* cepa K61, *S. lydicus* WYEC 108), azufre, urea, tiabendazol, tiofanato metilo, tiram, triadimefón, triadimenol y/o vinclozolín;

reguladores del crecimiento, por ejemplo, ancimidol, cloruro de cloromequat, diaminozida, paclobutrazol y/o uniconazol;

herbicidas, por ejemplo, glifosato, oxifluorfen y/o pendimetalín;

insecticidas, por ejemplo, acefato, azadiractín, *B. thuringiensis* (por ejemplo, subsp. *israelensis* cepa AM 65-52), *Beauveria bassiana* (por ejemplo, cepa GHA), carbaril, clorpirifós, ciantraniliprol, ciromazina, dicofol, diazinón, dinotefurán, imidacloprid, *Isaria fumosorosea* (por ejemplo, Apopka cepa 97), lindano y/o malatión;

tratamientos del agua, por ejemplo, peróxido de hidrógeno (30-35 %), ácido fosfónico (5-20 %) y/o clorito de sodio;

así como glucolípidos, lipopéptidos, DEET, tierra diatomácea, citronela, aceites esenciales, aceites minerales, extracto de ajo, extracto de ají, y/o cualquier plaguicida comercial y/o casero conocido que la persona del oficio de nivel medio que tiene el beneficio de la presente divulgación determine que es compatible.

En algunas formas de realización, los productos basados en microbios pueden usarse para mejorar la eficacia de los otros compuestos, por ejemplo, al mejorar la penetración de un compuesto farmacológico en una planta o plaga. Los productos basados en microbios también pueden usarse para complementar otros tratamientos, por ejemplo, tratamientos antibióticos. De manera ventajosa, la presente invención ayuda a reducir la cantidad de antibióticos que deben administrarse a un cultivo o planta a fin de que sea eficaz para el tratamiento y/o la prevención de una infección bacteriana.

En una forma de realización, los métodos y composiciones de acuerdo con la presente invención producen un aumento en uno o más de: índice de crecimiento, masa de raíz, altura de la planta, diámetro del tronco, crecimiento de los brotes, cantidad de brotes, densidad de la copa, valor brix, contenido de clorofila, cantidad de frutos, masa de fruto, masa de raíz, biomasa total de la planta, cantidad de flores y/o niveles de nitrógeno del tejido foliar de una planta, de alrededor de 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 150 %, 200 %, o más, en comparación con una planta que crece en un entorno sin tratar.

En algunas formas de realización, los métodos y composiciones de acuerdo con la presente invención producen un aumento en el rendimiento del cultivo de

alrededor de 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 150 %, 200 %, o más, en comparación con los cultivos sin tratar.

En una forma de realización, los métodos y composiciones de acuerdo con la presente invención producen una reducción en la cantidad de plagas en una planta o en un entorno circundante de la planta de alrededor de 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 150 %, 200 %, o más, en comparación con una planta que crece en un entorno sin tratar.

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

Plantas diana

Como se usa en la presente, el término “planta” incluye, entre otros, cualquier especie de planta leñosa, ornamental o decorativa, cultivo o cereal, planta de frutos o planta de hortalizas, flor o árbol, macroalga o microalga, fitoplancton y alga fotosintética (por ejemplo, alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*). “Planta” también incluye una planta unicelular (por ejemplo, microalga) y una pluralidad de células vegetales que se diferencian ampliamente en una colonia (por ejemplo, volvox) o una estructura que está presente en cualquier etapa del desarrollo de una planta. Dichas estructuras incluyen, entre otras, un fruto, una semilla, un brote, un tallo, una hoja, una raíz, un pétalo de flor, etc. La planta puede estar sola, por ejemplo, en un jardín, o puede ser una entre muchas plantas, por ejemplo, como parte de un huerto frutal, cultivo o pastizal.

Como se usa en la presente, “plantas de cultivo” se refiere a cualquier especie de planta o alga que los seres humanos pueden comer o usar como alimento para animales o peces o animales marinos, o que pueden consumir los seres humanos, o que los humanos pueden usar (por ejemplo, producción textil o cosmética), o que los humanos pueden observar (por ejemplo, flores o matas en paisajismo o jardines) o cualquier planta o alga, o una parte de estas, usada en la industria o el comercio o la educación.

Los tipos de plantas de cultivo que pueden beneficiarse a partir de la aplicación de los productos y métodos de la presente invención incluyen, entre otros: cultivos en hileras (por ejemplo, maíz, soja, sorgo, maní, papa, etc.), cultivos de campo (por ejemplo, alfalfa, trigo, granos, etc.), cultivos arbóreos (por ejemplo, nueces, almendras, pacanas, avellanas, pistachos, etc.), cultivos de cítricos (por ejemplo, naranja, limón,

pomelo, etc.), cultivos de frutos (por ejemplo, manzanas, peras, frutillas, arándanos, moras, etc.), cultivos de césped (por ejemplo, panes de césped), cultivos ornamentales (por ejemplo, flores, vides, etc.), hortalizas (por ejemplo, tomates, zanahorias, etc.), cultivos de viñedos (por ejemplo, uvas, etc.), forestales (por ejemplo, pino, píceas, eucalipto, álamo, etc.), pastizales gestionados (cualquier mezcla de plantas usada para soportar el pastoreo de animales).

Otros ejemplos de plantas para los que la presente invención es útil incluyen, entre otros, cereales y pastos (por ejemplo, trigo, cebada, centeno, avena, arroz, maíz, sorgo, maíz), remolacha (por ejemplo, remolacha azucarera o remolacha forrajera); frutos (por ejemplo, uvas, frutillas, frambuesas, moras, frutos pomáceos, frutos con carozo, frutos blandos, manzanas, peras, ciruelas, duraznos, almendras, cerezas o bayas); cultivos leguminosos (por ejemplo, porotos, lentejas, arvejas o soja); cultivos oleaginosos (por ejemplo, colza oleaginosa, mostaza, amapolas, olivas, girasol, coco, ricino, cacao o maní); cucurbitáceas (por ejemplo, zapallo, pepino, calabaza o melones); plantas fibrosas (por ejemplo, algodón, lino, cáñamo o yute); frutos cítricos (por ejemplo, naranjas, limones, pomelo o mandarinas); hortalizas (por ejemplo, espinaca, lechuga, espárragos, repollos, zanahorias, cebollas, tomates, papa o pimientos); Lauraceae (por ejemplo, palta, *Cinnamomum* o alcanfor); y también tabaco, nueces, hierbas, especias, plantas medicinales, café, berenjenas, caña de azúcar, té, pimienta, vides, lúpulo, la familia de los plátanos, plantas con látex, flores cortadas y ornamentales.

En algunas formas de realización, la planta de cultivo es una planta cítrica. Los ejemplos de plantas cítricas de acuerdo con la presente invención incluyen, entre otros, árboles de naranja, árboles de limón, árboles de lima y árboles de pomelo. Otros ejemplos incluyen *Citrus maxima* (pomelo chino), *Citrus medica* (cidra), *Citrus micrantha* (papeda), *Citrus reticulata* (mandarina), *Citrus paradisi* (pomelo), *Citrus japonica* (quinoto), *Citrus australasica* (caviar de limón), *Citrus australis* (lima redonda australiana), *Citrus glauca* (lima del desierto), *Citrus garrawayae* (lima del monte blanco), *Citrus gracilis* (lima Kakadu o lima Humpty Doo), *Citrus inodora* (lima del río Russel), *Citrus warburgiana* (lima silvestre de Nueva Guinea), *Citrus wintersii* (lima dedo del río Brown), *Citrus halimii* (limau kadangsa, limau kedut kera), *Citrus indica* (naranja silvestre india), *Citrus macroptera*, y *Citrus latipes*, *Citrus x aurantiifolia* (limero), *Citrus x aurantium* (naranjo amargo), *Citrus x latifolia* (lima persa), *Citrus x limon* (limonero), *Citrus x limonia* (lima Rangpur), *Citrus x sinensis* (naranja dulce), *Citrus x tangerina* (tangerina), limón Imperial, tangelo, chironja, tangor, kinnow, kiyomi,

tangelo Minneola, oroblanco, ugli, mano de Buda, cidra, bergamota, naranja sanguina, calamondina, clementina, limón Meyer y yuzu.

En algunas formas de realización, la planta de cultivo está relacionada con una planta cítrica, tal como jazmín naranja, limoncito y naranjo trifoliado (*Citrus trifolata*).

Otros ejemplos de plantas diana incluyen todas las plantas que pertenecen a la superfamilia Viridiplantae, en particular plantas monocotiledónea y dicotiledóneas, que incluyen forraje o legumbres forrajeras, plantas ornamentales, cultivos alimenticios, árboles o matas seleccionados de *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Abelmoschus* spp., *Agave sisalana*, *Agropyron* spp., *Agrostis stolonifera*, *Allium* spp., *Amaranthus* spp., *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, *Annona* spp., *Apium graveolens*, *Arachis* spp., *Artocarpus* spp., *Asparagus officinalis*, *Avena* spp. (por ejemplo, *A. sativa*, *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, colza oleaginosa, nabo]), *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis sativa*, *Capsicum* spp., *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, *Carya* spp., *Carthamus tinctorius*, *Castanea* spp., *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*, *Cinnamomum* spp., *Citrullus lanatus*, *Citrus* spp., *Cocos* spp., *Coffea* spp., *Colocasia esculenta*, *Cola* spp., *Corchorus* sp., *Coriandrum sativum*, *Corylus* spp., *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* spp., *Fragaria* spp., *Ginkgo biloba*, *Glycine* spp. (por ejemplo, *G. max*, Soja hispida o Soja max), *Gossypium hirsutum*, *Helianthus* spp. (por ejemplo, *H. 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*, *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 australis*, *Physalis* spp., *Pinus* spp., *Pistacia vera*, *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus* spp., *Prosopis* spp., *Prunus* spp., *Psidium* spp., *Punica granatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes* spp., *Ricinus communis*, *Rubus* spp., *Saccharum* spp., *Salix* sp., *Sambucus* spp., *Secale cereale*, *Sesamum* spp., *Sinapis* sp., *Solanum* spp. (por ejemplo, *S. tuberosum*, *S. integrifolium* o *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* o *T. vulgare*), *Tropaeolum minus*, *Tropaeolum majus*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vigna* spp., *Viola odorata*, *Vitis* spp., *Zea mays*, *Zizania palustris*, *Ziziphus* spp., entre otros.

Las plantas diana también pueden incluir, entre otras, maíz (*Zea mays*), *Brassica* sp. (por ejemplo, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), en particular las especies *Brassica* útiles como fuentes de aceite de semillas, alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), mijo (por ejemplo, mijo perla (*Pennisetum glaucum*), mijo común (*Panicum miliaceum*), panizo (*Setaria italica*), mijo dedo (*Eleusine coracana*)), girasol (*Helianthus annuus*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), papa (*Solanum tuberosum*), maní (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), batata (*Ipomoea batatas*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), ananá (*Ananas comosus*), árboles de cítricos (*Citrus* spp.), cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia sinensis*), banana (*Musa* spp.), palta (*Persea americana*), higo (*Ficus casica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifera indica*), oliva (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), cajú (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), caña de azúcar (*Saccharum* spp.), avena, cebada, hortalizas, ornamentales y coníferas.

Las plantas diana de hortalizas incluyen tomates (*Lycopersicon esculentum*), lechuga (por ejemplo, *Lactuca sativa*), porotos verdes (*Phaseolus vulgaris*), frijoles de lima (*Phaseolus limensis*), arvejas (*Lathyrus* spp.), y miembros del género *Cucumis*, tales como pepino (*C. sativus*), cantalupo (*C. cantalupensis*) y melón almizclero (*C. melo*). Las ornamentales incluyen azalea (*Rhododendron* spp.), hortensia (*Macrophylla hydrangea*), hibiscus (*Hibiscus rosasanensis*), rosas (*Rosa* spp.), tulipanes (*Tulipa* spp.), narcisos (*Narcissus* spp.), petunias (*Petunia hybrida*), clavel (*Dianthus*

caryophyllus), poinsetia (*Euphorbia pulcherrima*) y crisantemo. Las coníferas que pueden usarse al poner en práctica las formas de realización incluyen, por ejemplo, pinos, tales como pino taeda (*Pinus taeda*), pino ellioti (*Pinus elliotii*), pino ponderosa (*Pinus ponderosa*), pino contorta (*Pinus contorta*) y pino de Monterrey (*Pinus radiata*); abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*); abeto occidental (*Tsuga canadensis*); picea Sitka (*Picea glauca*); secuoya roja (*Sequoia sempervirens*); abetos reales, tales como abeto del Pacífico (*Abies amabilis*) y abeto balsámico (*Abies balsamea*); y cedros, tales como cedro rojo occidental (*Thuja plicata*) y falso ciprés de Nootka (*Chamaecyparis nootkatensis*). Las plantas de las formas de realización incluyen plantas de cultivo (por ejemplo, maíz, alfalfa, girasol, *Brassica*, soja, algodón, cártamo, maní, sorgo, trigo, mijo, tabaco, etc.), tales como plantas de maíz y de soja.

Los céspedes diana incluyen, entre otros:, pasto azul anual (*Poa annua*); centeno anual (*Lolium multiflorum*); pasto azul de Canadá (*Poa compressa*); festuca encarnada (*Festuca rubra*); hierba colonial (*Agrostis tenuis*); hierba rastrera (*Agrostis palustris*); *Agropyron desertorum*; agropiro crestado (*Agropyron cristatum*); festuca dura (*Festuca longifolia*); pasto azul de Kentucky (*Poa pratensis*); pasto ovillo (*Dactylis glomerata*); ballico perenne (*Lolium perenne*); festuca roja (*Festuca rubra*); punta roja (*Agrostis alba*); pasto azul áspero (*Poa trivialis*); cañuela de oveja (*Festuca ovine*); bromo inerme (*Bromus inermis*); festuca alta (*Festuca arundinacea*); hierba timotea (*Phleum pretense*); hierba de terciopelo (*Agrostis canine*); hierba europea alcalina (*Puccinellia distans*); agropiro del oeste (*Agropyron smithii*); grama común (*Cynodon* spp.); pasto San Agustín (*Stenotaphrum secundatum*); pasto zoysia (*Zoysia* spp.); hierba bahía (*Paspalum notatum*); pasto alfombra fino (*Axonopus affinis*); pasto cienpiés (*Eremochloa ophiuroides*); hierba kikuyu (*Pennisetum clandestinum*); gramilla blanca (*Paspalum vaginatum*); navajita azul (*Bouteloua gracilis*); pasto búfalo (*Buchloe dactyloids*); zacate banderita (*Bouteloua curtipendula*).

Otras plantas de interés incluyen plantas de granos que proporcionan semillas de interés, plantas oleaginosas y plantas leguminosas. Las semillas de interés incluyen semillas de granos, tales como maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, centeno, mijo, etc. Las plantas oleaginosas incluyen algodón, soja, cártamo, girasol, *Brassica*, maíz, alfalfa, palma, coco, lino, ricino, oliva etc. Las plantas leguminosas incluyen porotos y arvejas. Los porotos incluyen guar, garrofín, fenogreco, soja, poroto común, caupí, poroto mung, frijol de lima, haba, lentejas, garbanzo, etc.

Otras plantas de interés incluyen Cannabis (por ejemplo, sativa, indica y ruderalis) y cáñamo industrial.

Todas las plantas y partes de plantas pueden tratarse de acuerdo con la invención. En este contexto, plantas significan todas las plantas y poblaciones de plantas, tales como plantas silvestres deseadas o no deseadas o plantas de cultivo (que incluyen plantas de cultivo naturales). Las plantas de cultivo pueden ser plantas que se pueden obtener mediante métodos de reproducción y optimización tradicionales o mediante métodos biotecnológicos y recombinantes, o combinaciones de estos métodos, que incluyen las plantas transgénicas y las variedades de plantas.

Se entiende como parte de una planta a toda parte y órgano aéreos o subterráneos y de las plantas, tal como brote, hoja, flor y raíz, por ejemplo, hojas, acículas, tallos principales, tallos, flores, cuerpos frutales, frutos y semillas, y también raíces, tubérculos y rizomas. Las partes de la planta también incluyen material de cultivo y material de propagación vegetativo y generativo, por ejemplo, esquejes, tubérculos, rizomas, injertos y semillas.

En algunas formas de realización, la planta es una planta infectada por una plaga o enfermedad patógena. En formas de realización específicas, la planta está infectada con enfermedad de enverdecimiento de los cítricos y/o cancrrosis de los cítricos, y/o una plaga que porta dichas enfermedades.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos, presentados a modo de ilustración, ayudarán a comprender mejor la presente invención y sus ventajas. Los siguientes ejemplos son ilustrativos de algunos de los métodos, aplicaciones, formas de realización y variantes de la presente invención. No deben considerarse limitativos de la invención. Numerosos cambios y modificaciones pueden realizarse con respecto de la invención.

EJEMPLO 1 – FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DE *WICKERHAMOMYCES ANOMALUS*

Para la producción de biomasa de *Wickerhamomyces* sp. se usa un medio basado en arroz. Alrededor de 200 gramos de arroz se mezclan con 600 ml de medio GUY (glucosa, urea y extracto de levadura, pH 5,71) o 250 ml de medio GY concentrado (glucosa y extracto de levadura, pH 5,69) y agua. El medio se distribuye en recipientes de acero inoxidable en una capa de alrededor de 1 a 2 pulgadas de espesor, y se esteriliza.

Luego de la esterilización, los recipientes se inoculan con cultivo de semillas. De manera opcional, nutrientes agregados pueden incluirse para mejorar el crecimiento microbiano, que incluyen, por ejemplo, sales y/o fuentes de carbono, tales como melazas, almidones, glucosa y sacarosa.

Luego, el cultivo de semillas de *Wickerhamomyces* se distribuye o coloca con una pipeta en la superficie del sustrato, y las bandejas se incuban entre 28-30 °C en un reactor cerrado. Se bombea aire ambiente a través del reactor para estabilizar la temperatura. La incubación durante 48-72 horas puede producir 1×10^9 células/gramo o más de *Wickerhamomyces*.

EJEMPLO 2– PREPARACIÓN DE PRODUCTO BASADO EN MICROBIOS

Un envase flexible sellable puede usarse para almacenar y transportar un producto que comprende un producto que contiene al menos 1×10^8 CFU/ml de *Wickerhamomyces anomalus* mezclados con caldo de fermentación microbiano residual (por ejemplo, 10,0 % de inoculante microbiano y 90 % de caldo en volumen). Otros componentes puede agregarse al producto, por ejemplo, micronutrientes, macronutrientes, prebióticos y/u otros microbios producidos de manera similar.

Luego, el producto se diluye con agua en un tanque de mezcla hasta una concentración de 1×10^6 a 1×10^7 CFU/ml. Una bolsa puede usarse para tratar alrededor de 1-10 acres de cultivo o plantación de cítricos.

La composición puede mezclarse con y/o aplicarse en simultáneo con materiales “de inicio” adicionales para promover el crecimiento inicial de los microorganismos en la composición. Estos pueden incluir, por ejemplo, prebióticos y/o nanofertilizantes (por ejemplo, Aqua-Yield, NanoGro™).

Una formulación de ejemplo de una composición de inicio comprende:

- potasa soluble (K₂O) (1,0 % a 2,5 %, o alrededor de 2,0 %)
- magnesio (Mg) (0,25 % a 0,75 %, o alrededor de 0,5 %)
- azufre (S) (2,5 % a 3,0 %, o alrededor de 2,7 %)
- boro (B) (0,01 % a 0,05 %, o alrededor de 0,02 %)
- hierro (Fe) (0,25 % a 0,75 %, o alrededor de 0,5 %)
- manganeso (Mn) (0,25 % a 0,75 %, o alrededor de 0,5 %)
- zinc (Zn) (0,25 % a 0,75 %, o alrededor de 0,5 %)
- ácido húmico (8 % a 12 %, o alrededor de 10 %)
- extracto de alga (5 % a 10 %, o alrededor de 6 %)
- agua (70 % a 85 %, o alrededor de 77 % a 80 %).

El inoculante microbiano, y/o los materiales “de inicio” que promueven el crecimiento, se mezclan con agua en un tanque de un sistema de irrigación y se aplican al suelo.

EJEMPLO 3 – ESTUDIO DE CAMPO EN ÁRBOL JOVEN DE CÍTRICOS EN FLORIDA

La respuesta al crecimiento de árboles jóvenes de cítricos en Florida se evaluó después del tratamiento con una composición de acuerdo con formas de realización de la presente invención que comprende *W. anomalus* ("STR10"). El calibre del tronco (diámetro), la altura y el índice de crecimiento se midieron y se compararon con árboles de control cultivados mediante prácticas de agricultor estándar. Estos factores resultan importantes para los agricultores al evaluar el vigor de los árboles de cítricos recientemente plantados sin frutos. Un crecimiento más vigoroso significa que los árboles son más saludables y que comenzarán a producir frutos más rápido. Esto puede ser ventajoso, puesto que el proceso para que los árboles de cítricos alcancen la madurez puede tomar 5 años o más.

Los resultados del estudio, que se muestran en la **Figura 1**, mostraron que durante un período de 6 meses, los árboles jóvenes tratados con STR10 experimentaron 41 % de aumento en la altura promedio, 126 % de aumento en mediciones de calibre promedio, y 65 % de aumento en el índice de crecimiento. El control experimentó un 28 % de aumento en altura promedio, 57 % de aumento en calibre promedio del tronco, y 37 % de aumento en índice de crecimiento promedio.

EJEMPLO 4 – ESTUDIOS DE CAMPO EN ÁRBOL JOVEN DE CÍTRICOS EN FLORIDA

La respuesta al crecimiento de árboles jóvenes de cítricos en Florida se evaluó después del tratamiento con una composición de acuerdo con formas de realización de la presente invención que comprende *W. anomalus* ("STR10").

Altura

La composición se aplicó al suelo cada 2 meses durante 7 tratamientos completos a 1,5 l de composición por acre.

La altura de los árboles se midió y se comparó con árboles de control cultivados mediante prácticas conocidas por un agricultor estándar. Los resultados del estudio, que se muestran en la **Figura 2**, mostraron que, durante un período de 18 meses, los árboles jóvenes tratados con la composición objeto experimentaron un aumento total de la altura promedio que fue 15 % mayor que el aumento de la altura del control (76 % de aumento, tratado frente a 61 % de aumento, control).

Índice de crecimiento

La composición se aplicó al suelo cada 2 meses durante 7 tratamientos completos a 1,5 l de composición por acre.

El índice de crecimiento (GI) se midió y se comparó con árboles de control

cultivados usando prácticas de agricultor estándar. Los resultados del estudio, que se muestran en la **Figura 3**, mostraron que, durante un período de 18 meses, los árboles jóvenes tratados con la composición objeto experimentaron un aumento total de GI que fue 26 % mayor que el aumento de GI del control (205 % de aumento, tratado frente a 179 % de aumento, control).

Calibre

La composición se aplicó al suelo cada 2 meses durante 7 tratamientos completos a 1,5 l de composición por acre.

El calibre del tronco se midió y se comparó con árboles de control cultivados usando prácticas de agricultor estándar. Los resultados del estudio, que se muestran en la **Figura 4**, mostraron que, durante un período de 18 meses, los árboles jóvenes tratados con la composición objeto experimentaron un aumento total del calibre que fue 25 % mayor que el aumento del calibre del control (200 % de aumento, tratado frente a 175 % de aumento, control).

Crecimiento de los brotes

La composición se aplicó al suelo cada 2 meses durante 4 tratamientos completos a 1,5 l de composición por acre.

La cantidad de árboles con nuevo crecimiento de los brotes se midió y se comparó con árboles de control cultivados mediante prácticas conocidas por un agricultor estándar. Los resultados del estudio, que se muestran en la **Figura 5A**, mostraron que 100 % de los árboles tratados tenían nuevo crecimiento de los brotes, en comparación con solo 20 % de los árboles de control.

La cantidad promedio de brotes de árboles tratados en comparación con el árbol de control sin tratar también se midió. Los resultados del estudio, que se muestran en la **Figura 5B**, mostraron un promedio de 39 brotes nuevos en los árboles tratados frente a un promedio de 2 en los árboles de control.

Cantidad de frutos por árbol

La composición se aplicó al suelo cada 2 meses durante 6 tratamientos completos a 1,5 l de composición por acre.

La cantidad promedio de frutos se midió y se comparó con árboles de control cultivados usando prácticas de agricultor estándar. Los resultados del estudio, que se muestran en la **Figura 6**, mostraron una cantidad promedio de frutos de 82 frutos por árbol en los árboles tratados, frente a una cantidad promedio de frutos de 34 frutos por árbol de control.

EJEMPLO 5 – STR10 + MICROORGANISMOS ADICIONALES PARA LA LECHUGA

Ensayo 1

Una composición que comprendía *Wickerhamomyces anomalus* (“STR10”) se aplicó al suelo en donde había lechuga mantecosa plantada y el peso promedio de la cabeza de lechuga se comparó con lechuga de control sin tratar. La composición se aplicó cada 2 semanas durante un total de 3 aplicaciones, a 34 fl. oz./acre.

Como se ilustra en la **Figura 7A**, la lechuga tratada exhibía un peso promedio de la cabeza (g) 105 % mayor frente a la lechuga de control.

Ensayo 2

Las composiciones de acuerdo con formas de realización de la presente invención se aplicaron a un suelo en donde había plantada lechuga mantecosa, cada 2 semanas durante un total de 3 tratamientos, y se compararon con la lechuga de control sin tratar. Los primeros 2 tratamientos comprendían 34 fl. oz./acre de una composición que comprendía *Wickerhamomyces anomalus* (“STR10”). El tercer tratamiento comprendía 3 fl. oz./acre de una composición que comprendía *Trichoderma harzianum* y *Bacillus amyloliquefaciens* (“ThBa”).

Como se ilustra en la **Figura 7B**, la lechuga tratada exhibía un peso promedio de la cabeza (g) 95% mayor frente a la lechuga de control.

EJEMPLO 6 – STR10 + MATERIALES DE INICIO PARA MANÍ GEORGIA

5 fl. oz./acre de una composición que comprendía *Wickerhamomyces anomalus* (“STR10”) se aplicó una vez al plantar una parcela de plantas de maní, junto con 6,4 fl. oz./acre de una composición “de inicio” como se describió en el Ejemplo 2 anterior. Preferentemente, la composición de inicio comprende, al menos, ácido húmico y extracto de alga. Las plantas de maní tratadas se compararon con controles sin tratar en términos de cantidad promedio de flores cada 30 pies cuadrados y de tamaño promedio de copa (pulgadas).

Como se ilustra en la **Figura 8A**, las plantas de maní tratadas exhibían una cantidad de flores 65 % mayor que las plantas de control. De manera adicional, como se ilustra en la **Figura 8B**, las plantas de maní tratadas exhibían un tamaño de copa 20 % mayor que las plantas de control.

EJEMPLO 7 – ABSORCIÓN DE NUTRIENTES – ZUCCHINI

Se desarrollaron tres grupos de tratamiento de plantas de zucchini. Un primer tratamiento comprendía aplicar 5 fl. oz./acre de *Wickerhamomyces anomalus* (“STR10”) a las plantas inicialmente, y luego una vez más después de 3 semanas. El segundo tratamiento comprendía aplicar 5 fl. oz./acre de STR10 y 3 fl. oz./acre de una composición que comprendía *Trichoderma harzianum* y *Bacillus amyloliquefaciens*

("ThBa") a las plantas inicialmente, y luego una vez más después de 3 semanas. El tercer tratamiento era un grupo de control sin tratar de plantas de zucchini.

El contenido de nitrógeno de las hojas de cada uno de los tres grupos se midió para determinar el aumento general de la absorción de nitrógeno. Como se ilustra en la **Figura 9A**, el contenido de nitrógeno del grupo STR10 fue 0,19 % mayor que los grupos de control, y el contenido de nitrógeno del grupo STR10/ThBa fue 0,94 % mayor que el grupo de control.

El contenido de magnesio de las hojas de cada uno de los tres grupos también se midió para determinar el aumento general de la absorción de magnesio. Como se ilustra en la **Figura 9B**, el contenido de magnesio del grupo STR10 fue 0,06% mayor que los grupos de control, y el contenido de magnesio del grupo STR10/ThBa fue 0,03% mayor que el grupo de control.