(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114556032 A
(43)申请公布日 2022.05.27

(21)申请号 202080071873.5
(22)申请日 2020.08.13
(30)优先权数据
62/886,883 2019.08.14 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.04.11
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/046165 2020.08.13
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/030577 EN 2021.02.18
(71)申请人 博思特生物群落公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 维罗妮卡·加西亚
索菲亚·安德里科普洛斯
詹斯纳·佛罗兰德
凯利·特立尼达
克里斯蒂·皮亚蒙特
詹姆斯·皮尔斯 杰米·巴彻
纳撒尼尔·T·贝克尔
亚历山德拉·维拉格
阿姆鲁塔·J·彼得卡尔
伊丽莎白·A·马里尼奇
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 韦昌金 武晶晶
(51)Int.Cl.
F25B 7/00(2006.01)
F25D 21/00(2006.01)
F25B 47/02(2006.01)

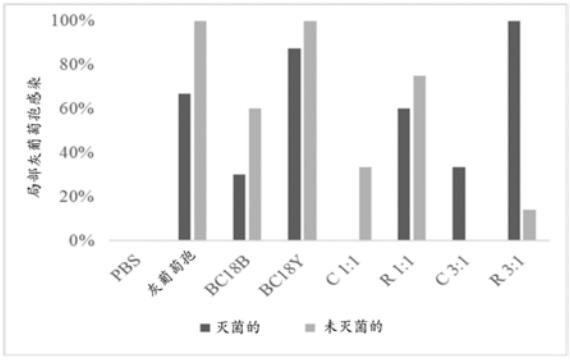
权利要求书3页 说明书25页 附图5页

(54)发明名称

用于预防或减少真菌病原体在植物上生长的微生物组合物

(57)摘要

本文公开了针对植物真菌病原体的生物防治组合物及其用于预防或减少作物损失或食物腐败的方法。



CN 114556032 A

1.一种生物防治组合物,其包含至少两种微生物,其中所述至少两种微生物包含:

(a)蜡状葡糖杆菌,和

(b)葡萄有孢汉逊酵母;

其中所述至少两种微生物被共同培养,其中所述至少两种微生物以一产物比被共同培养。

2.如权利要求1所述的生物防治组合物,其中所述蜡状葡糖杆菌和所述葡萄有孢汉逊酵母的产物比在约1:100和100:1之间。

3.如权利要求1所述的生物防治组合物,其中所述蜡状葡糖杆菌和所述葡萄有孢汉逊酵母的产物比在约1:10和10:1之间。

4.如权利要求1所述的生物防治组合物,其中所述蜡状葡糖杆菌和所述葡萄有孢汉逊酵母的产物比在约1:5和5:1之间。

5.如权利要求1所述的生物防治组合物,其中所述蜡状葡糖杆菌和所述葡萄有孢汉逊酵母的产物比在约1:3和3:1之间。

6.如权利要求1所述的生物防治组合物,其中所述蜡状葡糖杆菌和所述葡萄有孢汉逊酵母的产物比在约1:2和2:1之间。

7.如权利要求1-6中任一项所述的生物防治组合物,其中与包含选自以下的任何组合物的参考组合物相比,所述生物防治组合物能够将真菌疾病发病率抑制10%或更多:(i)所述至少两种微生物中的单独培养的一种或多种,或(ii)分开培养并以与所述生物防治组合物大致相同的活细胞计数和产物比组合的所述至少两种微生物。

8.如权利要求1-7所述的生物防治组合物,其中使用给定的发酵培养基、进料组合物和过程生长的共同培养的至少两种微生物在发酵结束时的活细胞计数是在等效发酵过程结束时所述至少两种微生物的活细胞计数总和的五倍以上。

9.如权利要求1-7所述的生物防治组合物,其中使用给定的发酵培养基、进料组合物和过程生长的共同培养的至少两种微生物在发酵结束时的活细胞计数是在等效发酵过程结束时所述至少两种微生物的活细胞计数总和的三倍以上。

10.如权利要求1-7所述的生物防治组合物,其中使用给定的发酵培养基、进料组合物和过程生长的共同培养的至少两种微生物在发酵结束时的活细胞计数是在等效发酵过程结束时所述至少两种微生物的活细胞计数总和的两倍以上。

11.如权利要求1-10所述的生物防治组合物,其中所述至少两种微生物在经历储存条件后的活细胞计数高于在等效发酵过程中和所述储存条件下单独生长的所述至少两种微生物的活细胞计数总和。

12.如权利要求11所述的生物防治组合物,其中所述储存条件包括在4℃和25℃之间的温度下储存。

13.如权利要求11或12中任一项所述的生物防治组合物,其中所述储存条件包括至少7天的储存时间。

14.一种产生如前述权利要求所述的生物防治组合物中的任一种的方法,其包括:

(a)将所述至少两种微生物中的第一微生物引入第一培养基;

(b)将所述至少两种微生物中的第二微生物引入第二培养基,其中所述第二培养基包含:所述第一培养基或其衍生物、所述第一微生物或其组合,其中所述第二微生物不同于所

述第一微生物;以及

(c)将所述第一微生物和第二微生物置于允许细胞增殖的条件下,从而产生所述生物防治组合物。

15.如权利要求14所述的方法,其中所述第二培养基是经所述第一微生物调节后的第一培养基。

16.如权利要求14或15中任一项所述的方法,其中所述第一微生物是蜡状葡糖杆菌,且所述第二微生物是葡萄有孢汉逊酵母。

17.如权利要求14或15中任一项所述的方法,其中所述第一微生物是葡萄有孢汉逊酵母,且所述第二微生物是蜡状葡糖杆菌。

18.一种减少或预防病原体在植物、种子、花或其农产品上生长的方法,其包括:向植物、种子、花或其农产品施用如权利要求1-13所述的生物防治组合物中的任一种。

19.如权利要求18所述的方法,其中所述植物、种子、花或其农产品选自苜蓿、杏仁、杏、苹果、朝鲜蓟、香蕉、大麦、甜菜、黑莓、蓝莓、西兰花、抱子甘蓝、卷心菜、大麻、卡诺拉、辣椒、胡萝卜、芹菜、菩茛菜、樱桃、柑橘、玉米、棉花、葫芦、枣、无花果、亚麻、大蒜、葡萄、药草、香料、羽衣甘蓝、莴苣、薄荷、油棕、橄榄、洋葱、豌豆、梨、桃、花生、木瓜、欧洲防风、山核桃、柿子、李子、石榴、马铃薯、榲桲、萝卜、覆盆子、玫瑰、稻、黑刺李、高粱、大豆、菠菜、草莓、甘薯、烟草、番茄、芜菁、核桃和小麦。

20.如权利要求19所述的方法,其中所述植物、种子、花或其农产品包括草莓。

21.一种减少或预防病原体在农产品上生长的方法,其包括:将如权利要求1-13所述的生物防治组合物中的任一种施用至用于运输或储存农产品的包装材料。

22.如权利要求21所述的方法,其中所述农产品选自苜蓿、杏仁、杏、苹果、朝鲜蓟、香蕉、大麦、甜菜、黑莓、蓝莓、西兰花、抱子甘蓝、卷心菜、大麻、卡诺拉、辣椒、胡萝卜、芹菜、菩茛菜、樱桃、柑橘、玉米、棉花、葫芦、枣、无花果、亚麻、大蒜、葡萄、药草、香料、羽衣甘蓝、莴苣、薄荷、油棕、橄榄、洋葱、豌豆、梨、桃、花生、木瓜、欧洲防风、山核桃、柿子、李子、石榴、马铃薯、榲桲、萝卜、覆盆子、玫瑰、稻、黑刺李、高粱、大豆、菠菜、草莓、甘薯、烟草、番茄、芜菁、核桃和小麦。

23.如权利要求21所述的方法,其中所述农产品是草莓。

24.一种减少或预防病原体在农产品上生长的方法,其包括:将如权利要求1-13所述的生物防治组合物中的任一种施用至草莓果实或其组分。

25.一种减少或预防病原体在草莓果实上生长的方法,其包括:将如权利要求1-13所述的生物防治组合物中的任一种施用至用于运输或储存所述草莓的包装材料。

26.如权利要求18-25中任一项所述的方法,其中所述病原体选自:白锈菌、西方白锈、互隔交链孢霉、瓜链格孢、胡萝卜链格孢、茄链格孢、细链格孢、细极链格孢、嗜番茄链格孢、根腐丝囊霉、萝卜丝囊霉、蜜环菌、黄曲霉、寄生曲霉、Botrydia theobromae、灰葡萄孢、富克葡萄孢盘菌、莴苣盘霜霉、甜菜生尾孢、黑莓小尾孢、多主枝孢、尖孢炭疽菌、胶孢炭疽菌、菜豆炭疽菌、香蕉炭疽菌、白蜡树炭疽菌、香蕉暗双孢、多主棒孢、葡萄根瘤蚜、泻根亚隔孢壳、痂囊腔菌、芒果痂囊腔菌、覆盆子痂囊腔菌、菊科白粉菌、葡萄白粉菌、葡萄藤猝倒病菌、禾谷镰刀菌、尖孢镰刀菌、茄病镰刀菌、大豆茎枯病菌、小麦全蚀病菌、狭长孢灵芝、白地霉、葡萄球座菌、悬钩子裸双孢锈菌、茄长蠕孢、盾壳霉小球腔菌、十字花科小球腔菌、鞑靼内丝

白粉菌、菜豆壳球孢、楛叉丝壳、果生链核盘菌、蓝莓干枯病菌、角球腔菌、芸苔生球腔菌、草莓球腔菌、斐济球腔菌、辣椒拟粉孢霉、黄褐钉孢、扩展青霉、稀疏霜霉、粉霜霉甜菜生理型、Pestalotiopsis clavispora、短小茎点霉、昏暗拟茎点霉、牛痘拟茎点霉、葡萄拟茎点霉、辣椒疫霉、红腐疫霉、致病疫霉、寄生疫霉、栎树猝死病菌、葡萄生轴霜霉、甘蓝根肿菌、斑点单囊壳、马铃薯皮斑病菌、葡萄假尾孢、葱柄锈菌、高粱柄锈菌、牛痘膨痂锈菌、瓜果腐霉、德巴利腐霉、具槽腐霉、终极腐霉、茄科雷尔氏菌、杜拉柱隔孢、立枯丝核菌、少根根霉、匍枝根霉、小核盘菌、银斑病病菌、白腐小核菌、齐整小核菌、小核盘菌、正核盘菌、芹菜生壳针孢、莴苣壳针孢、番茄壳针孢、欧芹壳针孢、鳄梨痂圆孢、斑点单囊壳、马铃薯粉痂菌、囊状匍柄霉、内生集壶菌、烟草根黑腐病菌、葡萄钩丝壳、疣顶单孢锈菌、甜菜单孢锈菌、黑白轮枝菌、大丽轮枝菌、可可轮枝菌及其任何组合。

27.如权利要求18-26中任一项所述的方法，其中所述病原体是灰葡萄孢。

用于预防或减少真菌病原体在植物上生长的微生物组合物

交叉引用

[0001] 本申请要求于2019年8月14日提交的美国临时申请号62/886,883的优先权,其通过引用以其整体并入本文。

背景技术

[0002] 真菌病原体造成重大的农业损失,导致作物损失、食物浪费和经济损失。具有抗真菌特性的微生物已经被开发作为生物防治剂,以减少由这些真菌病原体造成的作物损失和食物腐败。市售产品可能未显示出期望的植物或真菌特异性或有效性。此外,对于农产品,尤其是有机农产品的采后保护存在有限的选择。阻止真菌生长的生物防治组合物可以提供目前可用产品的替代品。

发明内容

[0003] 本文提供了用于预防或减少植物中真菌病原体生长或感染的生物防治组合物,及其制备和使用方法。

[0004] 在一个方面,本公开提供了一种生物防治组合物,其包含至少两种微生物,其中所述至少两种微生物包含蜡状葡糖杆菌(Gluconobacter cerinus);和葡萄有孢汉逊酵母(Hanseniaspora uvarum),其中所述至少两种微生物被共同培养,其中所述至少两种微生物以产物比被共同培养。在一些实施方案中,蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母的产物比在约1:100和100:1之间。在一些实施方案中,蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母的产物比在约1:10和10:1之间。在一些实施方案中,蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母的产物比在约1:5和5:1之间。在一些实施方案中,蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母的产物比在约1:3和3:1之间。

在一些实施方案中,蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母的产物比在约1:2和2:1之间。

[0005] 在一些实施方案中,与包含选自以下的任何组合物的参考组合物相比,所述生物防治组合物能够将真菌疾病发病率抑制10%或更多:(i)所述至少两种微生物中的单独培养的一种或多种,或(ii)分开培养并以与生物防治组合物大致相同的活细胞计数和产物比组合的所述至少两种微生物。在一些实施方案中,使用给定的发酵培养基、进料组合物和过程生长的共同培养的至少两种微生物在发酵结束时的活细胞计数是在等效发酵过程中单独生长的所述至少两种微生物的活细胞计数总和的五倍以上。在一些实施方案中,使用给定的发酵培养基、进料组合物和过程生长的共同培养的至少两种微生物在发酵结束时的活细胞计数是在等效发酵过程结束时所述至少两种微生物的活细胞计数总和的三倍以上。在一些实施方案中,使用给定的发酵培养基、进料组合物和过程生长的共同培养的至少两种微生物在发酵结束时的活细胞计数是在等效发酵过程结束时所述至少两种微生物的活细胞计数总和的两倍以上。在一些实施方案中,所述至少两种微生物在经历储存条件后的活细胞计数高于在等效发酵过程中和储存条件下单独生长的所述至少两种微生物的活细胞

计数总和。在一些实施方案中，其中储存条件包括在4℃和25℃之间的温度下储存。在一些实施方案中，储存条件包括至少7天的储存时间。

[0006] 在另一方面，本公开提供了一种用于产生生物防治组合物的方法，其中所述方法包括：(a)将所述至少两种微生物中的第一微生物引入第一培养基；(b)将所述至少两种微生物中的第二微生物引入第二培养基，其中所述第二培养基包含：所述第一培养基或其衍生物、所述第一微生物或其组合，其中所述第二微生物不同于所述第一微生物；以及(c)将所述第一微生物和所述第二微生物置于允许细胞增殖的条件下，从而产生所述生物防治组合物。在一些实施方案中，所述第二培养基是经所述第一微生物调节后的所述第一培养基。在一些实施方案中，所述第一微生物是蜡状葡糖杆菌，且所述第二微生物是葡萄有孢汉逊酵母。在一些实施方案中，所述第一微生物是葡萄有孢汉逊酵母，且所述第二微生物是蜡状葡糖杆菌。

[0007] 在另一方面，本公开提供了一种减少或预防病原体在植物、种子、花或其农产品上生长的方法，其包括：向植物、种子、花或其农产品施用所述生物防治组合物中的任一种。在一些实施方案中，所述植物、种子、花或其农产品选自苜蓿、杏仁、杏、苹果、朝鲜蓟、香蕉、大麦、甜菜、黑莓、蓝莓、西兰花、抱子甘蓝、卷心菜、大麻、卡诺拉(canola)、辣椒、胡萝卜、芹菜、菩茎菜、樱桃、柑橘、玉米、棉花、葫芦、枣、无花果、亚麻、大蒜、葡萄、药草、香料、羽衣甘蓝、莴苣、薄荷、油棕、橄榄、洋葱、豌豆、梨、桃、花生、木瓜、欧洲防风、山核桃、柿子、李子、石榴、马铃薯、榲桲、萝卜、覆盆子、玫瑰、稻、黑刺李、高粱、大豆、菠菜、草莓、甘薯、烟草、番茄、芜菁、核桃和小麦。在一些实施方案中，所述植物、种子、花或其农产品包括草莓。

[0008] 在另一方面，本公开提供了一种减少或预防病原体在农产品上生长的方法，其包括：将生物防治组合物施用至用于运输或储存农产品的包装材料。在一些实施方案中，所述农产品选自苜蓿、杏仁、杏、苹果、朝鲜蓟、香蕉、大麦、甜菜、黑莓、蓝莓、西兰花、抱子甘蓝、卷心菜、大麻、卡诺拉、辣椒、胡萝卜、芹菜、菩茎菜、樱桃、柑橘、玉米、棉花、葫芦、枣、无花果、亚麻、大蒜、葡萄、药草、香料、羽衣甘蓝、莴苣、薄荷、油棕、橄榄、洋葱、豌豆、梨、桃、花生、木瓜、欧洲防风、山核桃、柿子、李子、石榴、马铃薯、榲桲、萝卜、覆盆子、玫瑰、稻、黑刺李、高粱、大豆、菠菜、草莓、甘薯、烟草、番茄、芜菁、核桃和小麦。在一些实施方案中，所述产品是草莓。

[0009] 在另一方面，本公开提供了一种减少或预防病原体在草莓果实上生长的方法，其包括将生物防治组合物施用至用于运输或储存草莓果实的包装材料。

[0010] 在各个方面，所述病原体选自：白锈菌(Albugo candida)、西方白锈(Albugo occidentalis)、互隔交链孢霉(Alternaria alternata)、瓜链格孢(Alternaria cucumerina)、胡萝卜链格孢(Alternaria dauci)、茄链格孢(Alternaria solani)、细链格孢(Alternaria tenuis)、细极链格孢(Alternaria tenuissima)、嗜番茄链格孢(Alternaria tomatophila)、根腐丝囊霉(Aphanomyces euteiches)、萝卜丝囊霉(Aphanomyces raphani)、蜜环菌(Armillaria mellea)、黄曲霉(Aspergillus flavus)、寄生曲霉(Aspergillus parasiticus)、Botrydia theobromae、灰葡萄孢(Botrytis cinerea)、富克葡萄孢盘菌(Botrytinia fuckeliana)、莴苣盘霜霉(Bremia lactuca)、甜菜生尾孢(Cercospora beticola)、黑莓小尾孢(Cercosporella rubi)、多主枝孢(Cladosporium herbarum)、尖孢炭疽菌(Colletotrichum acutatum)、胶孢炭疽菌

(Colletotrichum gloeosporioides)、菜豆炭疽菌(Colletotrichum lindemuthianum)、香蕉炭疽菌(Colletotrichum musae)、白蜡树炭疽菌(Colletotrichum spaethanium)、香蕉暗双孢(Cordana musae)、多主棒孢(Corynespora cassiicola)、葡萄根瘤蚜(Daktulosphaira vitifoliae)、泻根亚隔孢壳(Didymella bryoniae)、痂囊腔菌(Elsinoe ampelina)、芒果痂囊腔菌(Elsinoe mangiferae)、覆盆子痂囊腔菌(Elsinoe veneta)、菊科白粉菌(Erysiphe cichoracearum)、葡萄白粉菌(Erysiphe necator)、葡萄藤猝倒病菌(Eutypa lata)、禾谷镰刀菌(Fusarium germinareum)、尖孢镰刀菌(Fusarium oxysporum)、茄病镰刀菌(Fusarium solani)、大豆茎枯病菌(Fusarium virguliforme)、小麦全蚀病菌(Gaeumannomyces graminis)、狭长孢灵芝(Ganoderma boninense)、白地霉(Geotrichum candidum)、葡萄球座菌(Guignardia bidwellii)、悬钩子裸双孢锈菌(Gymnoconia peckiana)、茄长蠕孢(Helminthosporium solani)、盾壳霉小球腔菌(Leptosphaeria coniothyrium)、十字花科小球腔菌(Leptosphaeria maculans)、鞑靼内丝白粉菌(Leveillula taurica)、菜豆壳球孢(Macrophomina phaseolina)、桤叉丝壳(Microsphaera alni)、果生链核盘菌(Monilinia fructicola)、蓝莓干枯病菌(Monilinia vaccinii-corymbosi)、角球腔菌(Mycosphaerella angulate)、芸苔生球腔菌(Mycosphaerella brassicicola)、草莓球腔菌(Mycosphaerella fragariae)、斐济球腔菌(Mycosphaerella fijiensis)、辣椒拟粉孢霉(Oidopsis taurica)、黄褐钉孢(Passalora fulva)、稀疏霜霉(Peronospora sparse)、粉霜霉甜菜生理型(Peronospora farinosa)、Pestalotiopsis clavispora、短小茎点霉(Phoma exigua)、昏暗拟茎点霉(Phomopsis obscurans)、牛痘拟茎点霉(Phomopsis vaccinia)、葡萄拟茎点霉(Phomopsis viticola)、辣椒疫霉(Phytophthora capsica)、红腐疫霉(Phytophthora erythroseptica)、致病疫霉(Phytophthora infestans)、寄生疫霉(Phytophthora parasitica)、栎树猝死病菌(Phytophthora ramorum)、葡萄生轴霜霉(Plasmopara viticola)、甘蓝根肿菌(Plasmodiophora brassicae)、斑点单囊壳(Podosphaera macularis)、马铃薯皮斑病菌(Polyscytalum pustulans)、葡萄假尾孢(Pseudocercospora vitis)、葱柄锈菌(Puccinia allii)、高粱柄锈菌(Puccinia sorghi)、牛痘膨痂锈菌(Pucciniastrum vaccinia)、瓜果腐霉(Pythium aphanidermatum)、德巴利腐霉(Pythium debaryanum)、具槽腐霉(Pythium sulcatum)、终极腐霉(Pythium ultimum)、茄科雷尔氏菌(Ralstonia solanacearum)、杜拉柱隔孢(Ramularia tulasneii)、立枯丝核菌(Rhizoctonia solani)、少根根霉(Rhizopus arrhizus)、匍枝根霉(Rhizopus stoloniferz)、小核盘菌(Sclerotinia minor)、银斑病病菌(Sclerotinia homeocarpa)、白腐小核菌(Sclerotium cepivorum)、齐整小核菌(Sclerotium rolfsii)、小核盘菌(Sclerotinia minor)、正核盘菌(Sclerotinia sclerotiorum)、芹菜生壳针孢(Septoria apiicola)、莴苣壳针孢(Septoria lactucae)、番茄壳针孢(Septoria lycopersici)、欧芹壳针孢(Septoria petroelini)、鳄梨痂圆孢(Sphaceloma perseae)、斑点单囊壳(Sphaerotheca macularis)、马铃薯粉痂菌(Spongospora subterrannea)、囊状匍柄霉(Stemphylium vesicarium)、内生集壶菌(Synchytrium endobioticum)、烟草根黑腐病菌(Thielaviopsis basicola)、葡萄钩丝壳(Uncinula necator)、疣顶单孢锈菌(Uromyces appendiculatus)、甜菜单孢锈菌(Uromyces betae)、黑白轮枝菌(Verticillium albo-atrum)、大丽轮枝菌(Verticillium

dahliae)、可可轮枝菌(Verticillium theobromae)及其任何组合。在一些实施方案中,所述病原体是灰葡萄孢。

[0011] 本公开的另一方面提供了一种包括机器可执行代码的非暂时性计算机可读介质,所述机器可执行代码在被一个或多个计算机处理器执行后,实现了上述或本文其他地方的任何方法。

[0012] 本公开的另一方面提供了一种系统,其包括一个或多个计算机处理器和耦合到其上的计算机存储器。计算机存储器包括机器可执行代码,所述机器可执行代码在被一个或多个计算机处理器执行后,实现了上述或本文其他地方的任何方法。

[0013] 根据以下具体实施方式,本公开的另外的方面和优点对于本领域技术人员将容易地变得清楚,在以下具体实施方式中仅示出和描述了本公开的说明性实施方案。如将会理解的,本公开能够具有其他的和不同的实施方案,并且其若干细节能够在各个明显的方面进行修改,所有这些都不背离本公开。相应地,附图和说明书应当被看作是说明性质的,而不是限制性的。

援引并入

[0014] 本说明书中所提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文,其程度如同具体地且单独地指出每个单独的出版物、专利或专利申请均通过引用而并入。就通过援引并入的出版物和专利或专利申请与本说明书中包含的公开内容相矛盾而言,本说明书旨在取代和/或优先于任何这种矛盾的材料。

附图说明

[0015] 在所附权利要求书中具体阐述了本发明的新颖特征。本专利或申请文件含有至少一幅以彩色绘制的附图。在请求并支付必要的费用后,官方将会提供带有彩色附图的本专利或专利申请公开案的副本。通过参考以下对利用本发明原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述和附图,将会获得对本发明的特征和优点的更好的理解,在这些附图中:

[0016] 图1示出了BC18对葡萄孢属的抑制作用,如通过草莓果实上的“LBDI”(局部葡萄孢疾病发病率)所测量。较低的LBDI代表处理抑制了葡萄孢属。BC18B和BC18Y分别是指BC18的经分离的细菌和酵母组分。在实验前处理灭菌的草莓,而未灭菌的草莓包括葡萄孢属的基线感染。“C”和“R”分别示出了共同发酵和重组,并且1:1和3:1是BC18的细菌:酵母组分的比率。

[0017] 图2A-图2F示出了草莓上的BC18 LBDI。图2A示出了3:1共同培养的BC18的功效。图2B示出了组合的3:1BC18的功效。图2C示出了1:1共同培养的BC18的功效。图2D示出了组合的1:1BC18的功效。图2E示出了单独培养的酵母的功效。图2F示出了未接受BC18接种的草莓的LBDI的参考图像。

[0018] 图3A-图3F示出了用于量化真菌疾病发病率(FDI)的健康评分量表的视觉表示。高FDI表明所述处理的保护作用。图3A示出了4分草莓果实,其没有明显真菌疾病。图3B示出了3分草莓果实。图3C示出了2分草莓。图3D示出了1分草莓。图3E示出了另一1分草莓。图3F示出了0分草莓。

[0019] 图4示出了BC18对草莓的真菌疾病发病率(FDI)的功效。

[0020] 图5示出了微生物细胞群体的流式细胞仪分布分析。

具体实施方式

[0021] 尽管本文已经示出和描述了本发明的各个实施方案，但对于本领域技术人员容易理解的是，这样的实施方案只是以示例的方式提供的。本领域技术人员可以在不偏离本发明的情况下想到许多更改、改变和替代。应当理解，可以采用针对本文所描述的本发明实施方案的各种可替代方案。

[0022] 许多真菌病原体可以感染农业上重要的植物，导致当植物在田间或收获后食物腐烂和食物腐败。例如，在田间和杂货店的水果(诸如草莓和覆盆子)上经常可以发现由真菌病原体灰葡萄孢引起的灰霉病。涉及食品生产和消费的任何人都非常期望找到减少由真菌病原体造成的损失的方法，并且先前已经开发了基于化学和生物学的控制策略。然而，在粮食作物上使用基于化学和生物学的杀真菌剂虽然有效，但这从消费者的角度来看是不期望的，除此之外还可能提供意想不到的副作用(例如，毒性)。

[0023] 特别地，需要具有优异抗真菌功效以及在培养结束时和在环境或冷藏条件下长期储存后的液体或干燥制剂中具有高活细胞计数的生物防治组合物。

[0024] 本文公开了组合物及其使用方法，所述组合物包含至少一种微生物(即微生物菌株)和载体。在许多情况下，可能没有单一微生物菌株其本身在田间栽培过程中或在收获后保护农产品时，对作物、植物、水果或其他植物部分上的真菌病原体提供足够有效的防治。在许多情况下，在实验室培养物中，诸如在对抗生长在琼脂板(诸如马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板)上的真菌病原体的培养物时，单一微生物菌株可能表现出对真菌病原体的强力防治的证据，但却不能在田间或收获后对生长在植物、果实或其他植物部分上的相同病原体提供足够有效的防治。类似地，即使在单一微生物菌株表现出有效生物防治的情况下，所述单一微生物菌株也可能不适合实际或商业应用，因为它不能在发酵过程中培养成活细胞经济上有吸引力的高浓度，例如至少1×10^{9}、1×10^{10}或1×10^{11}CFU/mL。

[0025] 因为单一微生物菌株可能不足以完成任何或所有前面提及的目的，所以本文公开了包含多于单一微生物菌株的生物防治组合物。本文公开了涉及将细菌菌株蜡状葡糖杆菌(16S SEQ ID NO:1)与酵母菌株葡萄有孢汉逊酵母(ITS SEQ ID NO:2)一起共同培养的方法和由其产生的组合物，相对于分开培养的每种菌株，或分开培养并随后以不同比率组合的两种菌株的共混物的性能提供了几个显著有利的技术效果。这些令人惊讶的优势可能没有基于任何先前的知识或随后对每种分开培养的菌株的实验证明而被预测到。

[0026] 可替代地或另外地，单一微生物菌株可能不适合实际或商业应用，因为在环境或冷藏条件下储存至少7天、至少28天或至少90天期间，以液体悬浮液或干燥、粒化、胶囊化或其他固体形式配制，所述单一微生物菌株在发酵过程中不保持活细胞经济上有吸引力的高绝对浓度，例如至少1×10^{9}CFU/mL或更高、至少1×10^{10}CFU/mL或更高、至少1×10^{11}CFU/mL或更高，或至少1×10^{12}CFU/mL更高，或者因为在以液体悬浮液或干燥、粒化、胶囊化或其他固体形式配制后，所述单一微生物菌株不保持活细胞如刚好在配制前测量的初始浓度的至少50％。

[0027] 本文所述的生物防治组合物可以对农业上重要的真菌具有抗真菌活性，并且可以配制成在生产过程的各个阶段使用。例如，这些生物防治组合物可以配制成在收获前使用，例如像将所述组合物掺入灌溉管线、叶面喷洒系统、根浸或与肥料结合施用，以及在收获后的农产品加工、包装、运输、储存和商业展示期间使用，例如像用所述组合物喷洒收获的农

产品或将所述组合物施用至用于储存或运输农产品的包装材料。此外，当与商业生物防治组合物相比时，这些生物防治组合物可以显示出改进的功效。

[0028] 如本文所用，术语“共同培养(co-culture/co-cultured/co-culturing)”通常是指使两种微生物在培养基中一起生长，或使一种微生物在经另一种微生物调节的培养基中生长。经调节的培养基可以包含或不包含细胞。

[0029] 如本文所用，“活细胞计数”是指如通过标准稀释平板法所测量的每单位体积微生物的菌落形成单位(“CFU”)，例如CFU/mL。

[0030] 如本文所用，“总细胞计数”是指不考虑生存能力的细胞数量，如例如通过血细胞计数器所计数。

[0031] 如本文所用，“培养”或“发酵”是指使微生物在生长培养基中生长，并且这些术语在本文中可互换使用。

[0032] 如本文所用，术语“微生物(microbes)”和“微生物(microorganisms)”可互换使用。

[0033] 如本文所用，“发酵比”是指在发酵结束时，共同培养的组合物中两种微生物的总细胞计数之比。

[0034] 如本文所用，“产物比”是指在储存预选的一段时间后，共同培养的组合物中两种微生物的总细胞计数之比。当预选时间为发酵结束时，发酵比与产物比相同。

[0035] 如本文所用，术语“组合”通常是指将两种或更多种微生物混合在一起，所述微生物分开生长，然后在生长后混合。这些微生物可以在相同类型或不同类型的培养装置、生长培养基或发酵过程中生长。在组合微生物之前，可以将微生物留在培养基中或重新悬浮在新鲜或不同的培养基中。

[0036] 如本文所用，术语“草莓果实”是指草莓的整个果实，包括浆果和收获后剩余的任何附着的叶或茎。

[0037] 如本文所用，术语“真菌疾病发病率”，本文缩写为FDI，是指果实上出现真菌生长。

[0038] 如本文所用，术语“局部灰葡萄孢发病率”，本文缩写为LBDI，是指在接种了灰葡萄孢的果实上或附近出现灰葡萄孢。

[0039] 如本文所用，术语“培养装置”通常是指可以用于使微生物生长的容器。例如，培养装置可以是但不限于：摇瓶、平板、发酵罐、发酵桶或生物反应器。

用于预防或减少作物损失和食物腐败的组合物

[0040] 本文公开了能够预防或减少真菌病原体在植物、种子或其农产品上生长的生物防治组合物。术语“农产品”在本文中可以用于指植物的可食用部分，例如叶、茎、种子、根、花或果实。术语“植物”在本文中可以用于指植物的任何部分，例如叶、茎、种子、根或果实。预防或减少真菌病原体在植物、种子或其农产品上生长可以减少在从植物收获农产品之前、期间或之后的作物损失和食物腐败。生物防治组合物可以包含至少一种微生物。表1示出了微生物菌株标识符、推定的微生物属或种，以及表2中列出的相应的SEQ ID NO。至少一种微生物可以是表1中列出的微生物。

表1.具有抗真菌活性的微生物菌株

微生物菌株标识符	推定的微生物属或种	SEQ ID NO.	16S 或 ITS
BC18	蜡状葡糖杆菌	SEQ ID NO: 1	16S
BC18	葡萄有孢汉逊酵母	SEQ ID NO: 2	ITS

表2.序列

SEQ ID NO	序列
SEQ ID NO: 1	CGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGGG CGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTTATGCAGTCAG ATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGC ATTTGAGACGCATAGACTAGAGGTCGAGAGAGG GTTGTGGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGT AGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGG CAACCTGGCTCGATACTGACGCTGAGGCGCGAA AGCGTGGGGAGCAAACAG
SEQ ID NO: 2	AGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCG GAAGGATCATTAGATTGAATTATCATTGTTGCTC GAGTTCTTGTTTAGATCTTTTACAATAATGTGTA TCTTTATTGAAGATGTGCGCTTAATTGCGCTGCT TCTTTAAAGTGTCGCAGTGAAAGTAGTCTTGCTT GAATCTCAGTCAACGCTACACACATTGGAGTTTT TTTACTTTAATTTAATTCTTTCTGCTTTGAATCGA AAGGTTCAAGGCAAAAAACAAACACAAACAATT TTATTTTATTATAATTTTTTAAACTAAACCAAAA TTCCTAACGGAAATTTTAAAATAATTTAAAACTT TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCT

[0041] 所述至少一种微生物可以是至少两种微生物。所述至少两种微生物可以包括为葡糖杆菌属物种的第一微生物和作为汉逊酵母属物种的第二微生物。所述至少两种微生物可以包括为蜡状葡糖杆菌的第一微生物和为葡萄有孢汉逊酵母的第二微生物。

[0042] 所述至少两种微生物可以包括具有与SEQ ID NO:1大于90％相同的16S序列的第一微生物和具有与SEQ ID NO:2大于90％相同的ITS序列的第二微生物。所述至少两种微生物可以包括具有与SEQ ID NO:1大于95％相同的16S序列的第一微生物和具有与SEQ ID NO:1大于95％相同的ITS序列的第二微生物。所述至少两种微生物可以包括具有与SEQ ID NO:1大于98％相同的16S序列的第一微生物和具有与SEQ ID NO:2大于98％相同的ITS序列的第二微生物。

[0043] 在一个实施方案中,所述至少一种微生物包含至少一种与来自葡糖杆菌属物种的rRNA序列具有至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的微生物。葡糖杆菌属物种可以是蜡状葡糖杆菌。rRNA序列可以是16S序列。在一个实施方案中,所述至少一种微生物包含至少一种与SEQ ID NO:1具有至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的微生物。

[0044] 在一个实施方案中,所述至少一种微生物包含至少一种与来自汉逊酵母属物种的rRNA序列具有至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的微生物。汉逊酵母属物种可以是葡萄有孢汉逊酵母。rRNA序列可以ITS序列。

在一个实施方案中，所述至少一种微生物包含至少一种与SEQ ID NO:2具有至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的微生物。在一个实施方案中，所述至少一种微生物包含至少一种与SEQ ID NO:2具有至少90％序列同一性的微生物。在一个实施方案中，所述至少一种微生物包含至少一种与SEQ ID NO:2具有至少95％序列同一性的微生物。在一个实施方案中，所述至少一种微生物包含至少一种与SEQ ID NO:2具有至少99％序列同一性的微生物。

[0045] 所述至少一种微生物可以在培养物中生长。所述至少一种微生物可以从培养物中分离和纯化。从培养物中纯化的至少一种微生物可以包括至少一种微生物的营养细胞或孢子。培养物可以是固体或半固体培养基。培养物可以是液体培养基。

[0046] 培养物可以在培养装置中生长。培养装置可以是生物反应器。可以使用任何合适的生物反应器。生物反应器的实例包括但不限于烧瓶、连续搅拌釜式生物反应器(CSTR)、无泡生物反应器、气升式反应器和膜生物反应器。培养装置可以是特定的大小或体积，以便于在任何规模范围内发酵。例如，培养装置可以是3升的培养装置。在另一个实例中，培养装置可以是14升的装置。培养装置的体积可以大于0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.7、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、20000、30000、40000、50000、60000、70000、80000、90000、100000、500000或1000000升或更多升。培养装置的体积可以不大于0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.7、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、20000、30000、40000、50000、60000、70000、80000、90000、100000、500000或1000000升。

[0047] 培养物可以在特定大小或体积的培养装置中生长至高细胞浓度。例如，在特定大小或体积的培养装置中，活细胞的浓度可以是至少1×10^{9}、1×10^{10}或1×10^{11}。

[0048] 在一些情况下，培养物的上清液包含至少一种微生物的次级代谢产物。可以从上清液中分离和纯化至少一种微生物的次级代谢产物。在一些情况下，上清液可以作为生物防治组合物施用，如本文其他地方所述。

[0049] 生物防治组合物可以包含至少一种微生物的一种或多种次级代谢产物。一种或多种次级代谢产物其自身可以具有除至少一种微生物之外的抗真菌特性。一种或多种次级代谢产物可以与生物防治组合物中的其他微生物一起具有抗真菌特性。一种或多种次级代谢产物可以从至少一种微生物的培养物的上清液中分离出来。一种或多种次级代谢产物可以包括脂肽、二肽、氨基多元醇、多肽、蛋白质、铁载体、吩嗪化合物、聚酮或其组合。

[0050] 一种或多种次级代谢产物可以包含脂肽。脂肽可以是线性脂肽或环脂肽(CLP)。脂肽的示例包括但不限于表面活性素、丰原素、伊枯草菌素、马塞托内酯(massetolide)、两性霉素(amphisin)、节活性素、托拉辛(tolassin)、丁香肽(syringopeptide)、丁香霉素、恶臭溶菌素、杆菌霉素、bacillopeptin、杆菌肽、多粘菌素、达托霉素、抗霉枯草菌素、库尔斯塔克素、张力蛋白、制磷脂菌素、黏液菌素和棘白菌素。棘白菌素可以是棘白菌素B(ECB)。在一些情况下，次级代谢产物是表面活性素、丰原素、伊枯草菌素或其组合。

[0051] 一种或多种次级代谢产物可以包含二肽。二肽可以是杆菌溶素或chlorotetain。

聚酮可以是脱脂素(defficidin)、大环内酰亚胺(macrolactin)、bacillaene、丁内醇(butyrolactol)A、索拉芬(soraphen)A、海马体素(hippolachnin)A或forazoline A。次级代谢产物可以是氨基多元醇。氨基多元醇可以是双效菌素(zwittermicin)A。次级代谢产物可以是蛋白质。蛋白质可以是抗菌蛋白质(bacisubin)、枯草菌素或真菌素(fungicin)。

[0052] 一种或多种次级代谢产物可以包含铁载体。铁载体可以是铜绿假单胞菌铁载体、硫代喹诺菌素(thioquinolobactin)或绿脓杆菌螯铁蛋白。

[0053] 一种或多种次级代谢产物可以包含吩嗪。吩嗪化合物可以是吩嗪-1-甲酸、1-羟基吩嗪或吩嗪-1-甲酰胺。

[0054] 次级代谢产物可以是几丁质酶、纤维素酶、淀粉酶或葡聚糖酶。次级代谢产物可以是挥发性抗真菌化合物。次级代谢产物可以是有机挥发性抗真菌化合物。

[0055] 如本文所公开,本公开的生物防治组合物可以被配制成液体制剂或干燥制剂。液体制剂可以是可流动的或水性的悬浮液。液体制剂可以包含悬浮在水、油或其组合(乳液)中的至少一种微生物或其次级代谢产物。可以配制生物防治组合物,使得液体制剂不包含沉淀或相分离。干燥制剂可以是可湿性粉末、干片、粉尘或颗粒。可以将可湿性粉末作为悬浮液施用至植物、种子、花或其农产品。可以将粉尘干涂至植物、种子或其农产品,诸如干涂至种子或叶子。可以干涂颗粒,或者可以将颗粒与水混合以形成悬浮液或溶解以形成溶液。至少一种微生物或其次级代谢产物可以被配制为微胶囊,其中至少一种微生物或其次级代谢产物具有惰性保护层。惰性保护层可以包括任何合适的聚合物。

[0056] 生物防治组合物还可以包括另外的化合物。所述另外的化合物可以是载体、表面活性剂、润湿剂、渗透剂、乳化剂、铺展剂、粘着剂、稳定剂、营养剂、粘合剂、干燥剂、增稠剂、分散剂、UV保护剂或其组合。载体可以是液体载体、矿物载体或有机载体。液体载体的示例包括但不限于植物油和水。矿物载体的示例包括但不限于高岭土或硅藻土。有机载体的示例包括但不限于谷物粉。表面活性剂可以是阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性表面活性剂或非离子表面活性剂。表面活性剂可以是吐温20或吐温80。润湿剂可以包括聚氧乙烯酯、乙氧基硫酸盐,或其衍生物。在一些情况下,将润湿剂与非离子表面活性剂混合。渗透剂可以包括碳氢化合物。铺展剂可以包括脂肪酸、胶乳、脂肪醇、作物油(例如,棉籽油)或无机油。粘着剂可以包括乳化聚乙烯、聚合树脂、脂肪酸、石油馏分或预糊化玉米粉。油可以是椰子油、棕榈油、蓖麻油或羊毛脂。稳定剂可以是乳糖或苯甲酸钠。营养剂可以是糖蜜或蛋白胨。粘合剂可以是阿拉伯树胶或羧甲基纤维素。干燥剂可以是硅胶或无水盐。增稠剂可以包括聚丙烯酰胺、聚乙烯聚合物、多糖、黄原胶或植物油。分散剂可以是微晶纤维素。UV保护剂可以是氧苯酮、荧光增白剂(Blankophor)BBH或木质素。

[0057] 生物防治组合物还可以包括吡啶二羧酸。

[0058] 至少一种微生物可以包括有效量的从液体培养物中分离和纯化的经分离和纯化的微生物。来自液体培养物的至少一种微生物可以经风干、冷冻干燥、喷雾干燥或流化床干燥以产生干燥制剂。干燥制剂可以在液体中重构以产生液体制剂。

[0059] 生物防治组合物可以被配制使得至少一种微生物在被施用/或递送至目标生境(例如土壤、植物、种子和/或农产品)后可以自我繁殖。

[0060] 生物防治组合物可以具有至少一周、一个月、六个月、至少一年、至少两年、至少三年、至少四年或至少五年的贮存期限。贮存期限可以指示生物防治组合物维持其抗真菌特

性的至少50％、至少55％、至少60％、至少65％,至少70％、至少75％,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少99％或100％的时间长度。生物防治组合物可以在室温、等于或低于10℃、等于或低于4℃、等于或低于0℃,或等于或低于-20℃下储存。可以配制生物防治组合物以保持至少一种微生物的生存能力。可以配制生物防治组合物,使得在储存一段时间后cfu/ml(每毫升菌落形成单位)不会显著降低。这可以是相对于未配制的生物防治组合物,或者相对于未如本文所公开的那样共同培养(例如,单独培养,然后单独组合)的生物防治组合物。例如,在25℃下储存4周后,配制的生物防治组合物的cfu/ml可以减少不超过10倍(例如,1个对数)。例如,在25℃下储存4周后,配制的生物防治组合物的cfu/ml可以减少不超过2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、100或1000倍。

[0061] 当在各种温度下储存时,生物防治组合物可以保持至少一种微生物的生存能力。例如,在0℃下储存4周后,生物防治组合物的cfu/ml可以减少不超过10倍(例如,1个对数)。例如,在4℃下储存4周后,生物防治组合物的cfu/ml可以减少不超过10倍。例如,在10℃下储存4周后,生物防治组合物的cfu/ml可以减少不超过10倍。例如,在-20℃下储存4周后,生物防治组合物的cfu/ml可以减少不超过10倍。例如,在-80℃下储存4周后,生物防治组合物的cfu/ml可以减少不超过10倍。

[0062] 生物防治组合物可以在储存一段给定的时间后保持生存能力。例如,在给定温度下储存1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100或更多周后,生物防治组合物的cfu/ml可以减少不超过10倍。

[0063] 可以配制生物防治组合物以在储存一段时间后保持抗病原体活性。经储存的制剂的这种致病活性可以基本上等同于新鲜的生物防治组合物。未老化或新鲜的生物防治组合物可以包含从发酵装置中获得的共同培养物,而无需经受储存条件。

[0064] 可以配制生物防治组合物,使得在储存一段时间后抗病原体活性不会显著降低。例如,可以配制生物防治组合物,使得经储存的生物防治组合物的施用剂量不超过新鲜(未老化)生物防治组合物剂量的10倍。例如,可以配制生物防治组合物,使得储存后施用的经储存的生物防治组合物的剂量不超过新鲜(未老化)生物防治组合物剂量的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20倍。

[0065] 在施用或使用之前,可以将本公开的经储存的生物防治组合物与生物刺激组合物组合。生物刺激组合物可以使植物以比不含生物刺激组合物的可比植物更快的速率生长。生物刺激组合物可以例如增加养分吸收、养分利用效率、改善对非生物胁迫的恢复或复原力,或其组合。生物刺激剂的示例包括固氮螺菌属(Azospirillum),诸如TAZO®-B微生物生物刺激剂,其可以增加固氮作用或增加根量,或者基于解淀粉芽孢杆菌(Bacillus amyloliquefaciens)和绿色木霉(Trichoderma virens)的生物刺激剂,诸如Novozymes QuickRoots®,其可以增加氮、磷或钾的可用性或吸收。储存后,生物防治组合物可以具有保持的生存能力,使得存活微生物的数量(cfu/mL)提供足够程度的抗真菌活性(例如,针对灰葡萄孢)。

[0066] 如本文其他地方所述,生物防治组合物可以在各种不同的温度和时间段下储存,并且可以仍维持至少一种微生物的生存能力。类似地,储存后可以维持抗病原体或抗真菌活性(或降低一个小的因子)。例如,在25℃下储存4周后,用于抑制真菌生长的剂量可以不

超过新鲜(未老化)生物防治组合物剂量的10倍。例如,在25℃下储存长达4周后,用于抑制真菌生长的剂量可以不超过新鲜(未老化)生物防治组合物剂量的2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、100或1000倍。当在各种温度下储存时,生物防治组合物可以保持抗病原体或抗真菌活性。例如,在0℃下储存长达4周后,用于抑制真菌生长的剂量可以不超过新鲜(未老化)生物防治组合物剂量的10倍。在另一个实例中,在4℃下4周后,用于抑制真菌生长的剂量可以不超过新鲜(未老化)生物防治组合物剂量的10倍。在10℃下4周后,用于抑制真菌生长的剂量可以不超过新鲜(未老化)生物防治组合物剂量的10倍。在-20℃下4周后,用于抑制真菌生长的剂量可以不超过新鲜(未老化)生物防治组合物剂量的10倍。例如,在-80℃下4周后,用于抑制真菌生长的剂量可以不超过新鲜(未老化)生物防治组合物剂量的10倍。

[0067] 生物防治组合物可以在储存一段给定的时间后保持抗病原体或抗真菌活性。例如,在给定温度下储存1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50或更多周后,用于抑制真菌生长的剂量可以不超过新鲜(未老化)生物防治组合物剂量的10倍。

[0068] 生物防治组合物可以包含孢子。含有孢子的组合物可以通过本文所述的方法施用。含有孢子的组合物可以延长生物防治组合物的贮存期限。含有孢子的组合物可以在目标生境的低pH或低温下存活。例如,含孢子的组合物可以在较冷的温度(例如,低于10℃)下施用至土壤,并且可以对于在较高温度(例如,20℃)下种植的种子具有抗真菌特性。孢子可以变成营养细胞,使它们具有营养细胞的任何优点。

[0069] 生物防治组合物可以包含营养细胞。含有营养细胞的组合物可以通过本文所述的方法施用。营养细胞可以增殖并提高组合物的功效。例如,生物防治组合物中的营养细胞可以在施用后增殖,从而增加暴露于生物防治组合物的植物的表面积。在另一实例中,生物防治组合物中的营养细胞可以在施用后增殖,从而增加生物防治组合物存活的时间量,并因此延长生物防治组合物具有功效的时间。营养细胞可以增殖并与真菌病原体竞争营养。营养细胞可以主动地产生一种或多种具有抗真菌特性的次级代谢产物。营养细胞可以变成孢子,使它们具有孢子的任何优点。

[0070] 生物防治组合物可以具有抗真菌活性,诸如预防真菌病原体的生长或者减少真菌病原体在植物、种子或其农产品上生长。生物防治组合物可以预防真菌病原体在植物、种子或其农产品上生长至少1天、至少2天、至少3天、至少4天或至少5天。生物防治组合物可以预防真菌病原体在植物、种子或其农产品上生长至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天或至少10天。生物防治组合物可以预防真菌病原体在植物、种子或其农产品上生长超过10天。

[0071] 相对于真菌病原体在未暴露于生物防治组合物的植物、种子、花或其农产品的对照上的生长,生物防治组合物可以减少真菌病原体在植物、种子或其农产品上的生长。对照可以是未向其施用抗真菌剂的植物、种子或其农产品,或者可以是已经向其施用市售抗真菌剂的植物、种子、花或其农产品。市售抗真菌剂的示例包括但不限于枯草芽孢杆菌菌株QST713(Serenade®)、枯草芽孢杆菌菌株GB02(Kodiak®)、枯草芽孢杆菌菌株MBI 600(Subtilex®)、短小芽孢杆菌(Bacillus pumilus)菌株GB34(YieldShield)、地衣芽孢杆菌(Bacillus licheniformis)菌株SB3086(EcoGuard®)。生物防治组合物可以减少真

菌病原体在植物、种子或其农产品上生长至少1天、至少2天、至少3天、至少4天或至少5天。生物防治组合物可以减少真菌病原体在植物、种子或其农产品上生长至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天或至少10天。生物防治组合物可以减少真菌病原体在植物、种子或其农产品上生长超过10天。相对于真菌病原体在对照上的生长，生物防治组合物可以将真菌病原体的生长减少至少25％。相对于真菌病原体在对照上的生长，生物防治组合物可以将真菌病原体的生长减少至少60％。相对于真菌病原体在对照上的生长，生物防治组合物可以将真菌病原体的生长减少至少25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、99％或更多。

[0072] 真菌病原体可以是属于以下属的真菌病原体：白锈属(Albugo)、链格孢属(Alternaria)、丝囊霉属(Aphanomyces)、蜜环菌属(Armillaria)、曲霉菌属(Aspergillus)、葡萄孢属(Botrytis)、球二孢属(Botrydiplodia)、葡萄孢盘菌属(Botrytinia)、盘霜霉属(Bremia)、尾孢属(Cercospora)、小尾孢属(Cercosporella)、枝孢属(Cladosporium)、炭疽菌属(Colletotrichum)、暗双孢属(Cordana)、棒孢属(Corynespora)、柱孢属(Cylindrocarpon)、Daktulosphaira、亚隔孢壳属(Didymella)、痂囊腔菌属(Elsinoe)、白粉菌属(Erysiphe)、弯孢壳属(Eutypa)、镰刀菌属(Fusarium)、顶囊壳属(Gaeumannomyce)、灵芝属(Ganoderma)、地丝菌属(Geotrichum)、球座菌属(Guignardia)、裸双胞锈菌属(Gymnoconia)、长蠕孢属(Helminthosporium)、小球腔菌属(Leptosphaeria)、内丝白粉菌属(Leveillula)、壳球孢属(Macrophomina)、叉丝壳属(Microsphaera)、链核盘菌属(Monolinia)、球腔菌属(Mycosphaerella)、拟粉孢霉属(Oidopsis)、钉孢属(Passalora)、青霉属(Penicillium)、霜霉属(Peronospora)、拟茎点霉属(Phomopsis)、疫霉属(Phytophthora)、霜霉属(Peronospora)、拟盘多毛孢属(Pestalotiopsis)、茎点霉属(Phoma)、根肿菌属(Plasmodiophora)、轴霜霉属(Plasmopara)、叉丝单囊壳属(Podosphaera)、蛇孢霉属(Polyscytalum)、假尾孢属(Pseudocercospora)、柄锈菌属(Puccinia)、膨痂锈菌属(Pucciniastrum)、腐霉菌属(Pythium)、青枯菌属(Ralstonia)、柱隔孢属(Ramularia)、丝核菌属(Rhizoctonia)、根霉菌属(Rhizopus)、壳针孢属(Septoria)、核盘菌属(Sclerotinia)、小核菌属(Sclerotium)、单囊壳属(Sphaerotheca)、痂圆孢属(Sphaceloma)、粉痂菌属(Spongospora)、匍柄霉属(Stemphylium)、瓶菌属(Synchytrium)、根串珠霉属(Thielaviopsis)、钩丝壳属(Uncinula)、单孢锈菌属(Uromyces)或轮枝菌属(Verticillium)。真菌病原体可以是白锈菌(Albugo candida)、西方白锈(Albugo occidentalis)、互隔交链孢霉(Alternaria alternata)、瓜链格孢(Alternaria cucumerina)、胡萝卜链格孢(Alternaria dauci)、茄链格孢(Alternaria solani)、细链格孢(Alternaria tenuis)、细极链格孢(Alternaria tenuissima)、嗜番茄链格孢(Alternaria tomatophila)、根腐丝囊霉(Aphanomyces euteiches)、萝卜丝囊霉(Aphanomyces raphani)、蜜环菌(Armillaria mellea)、黄曲霉(Aspergillus flavus)、寄生曲霉(Aspergillus parasiticus)、Botrydia theobromae、灰葡萄孢(Botrytis cinerea)、富克葡萄孢盘菌(Botrytinia fuckeliana)、莴苣盘霜霉(Bremia lactuca)、甜菜生尾孢(Cercospora beticola)、黑莓小尾孢(Cercosporella rubi)、多主枝孢(Cladosporium herbarum)、尖孢炭疽菌(Colletotrichum acutatum)、胶孢炭疽菌(Colletotrichum gloeosporioides)、菜豆炭疽菌(Colletotrichum

lindemuthianum)、香蕉炭疽菌(Colletotrichum musae)、白蜡树炭疽菌(Colletotrichum spaethanium)、香蕉暗双孢(Cordana musae)、多主棒孢(Corynespora cassiicola)、葡萄根瘤蚜(Daktulosphaira vitifoliae)、泻根亚隔孢壳(Didymella bryoniae)、痂囊腔菌(Elsinoe ampelina)、芒果痂囊腔菌(Elsinoe mangiferae)、覆盆子痂囊腔菌(Elsinoe veneta)、菊科白粉菌(Erysiphe cichoracearum)、葡萄白粉菌(Erysiphe necator)、葡萄藤猝倒病菌(Eutypa lata)、禾谷镰刀菌(Fusarium germinareum)、尖孢镰刀菌(Fusarium oxysporum)、茄病镰刀菌(Fusarium solani)、大豆茎枯病菌(Fusarium virguliforme)、小麦全蚀病菌(Gaeumannomyces graminis)、狭长孢灵芝(Ganoderma boninense)、白地霉(Geotrichum candidum)、葡萄球座菌(Guignardia bidwellii)、悬钩子裸双孢锈菌(Gymnoconia peckiana)、茄长蠕孢(Helminthosporium solani)、盾壳霉小球腔菌(Leptosphaeria coniothyrium)、十字花科小球腔菌(Leptosphaeria maculans)、鞑靼内丝白粉菌(Leveillula taurica)、菜豆壳球孢(Macrophomina phaseolina)、槭叉丝壳(Microsphaera alni)、果生链核盘菌(Monilinia fructicola)、蓝莓干枯病菌(Monilinia vaccinii-corymbosi)、角球腔菌(Mycosphaerella angulate)、芸苔生球腔菌(Mycosphaerella brassicicola)、草莓球腔菌(Mycosphaerella fragariae)、斐济球腔菌(Mycosphaerella fijiensis)、辣椒拟粉孢霉(Oidopsis taurica)、黄褐钉孢(Passalora fulva)、扩展青霉(Penicillium expansum)、稀疏霜霉(Peronospora sparse)、粉霜霉甜菜生理型(Peronospora farinosa)、Pestalotiopsis clavispora、短小茎点霉(Phoma exigua)、昏暗拟茎点霉(Phomopsis obscurans)、牛痘拟茎点霉(Phomopsis vaccinia)、葡萄拟茎点霉(Phomopsis viticola)、辣椒疫霉(Phytophthora capsica)、红腐疫霉(Phytophthora erythroseptica)、致病疫霉(Phytophthora infestans)、寄生疫霉(Phytophthora parasitica)、栎树猝死病菌(Phytophthora ramorum)、葡萄生轴霜霉(Plasmopara viticola)、甘蓝根肿菌(Plasmodiophora brassicae)、斑点单囊壳(Podosphaera macularis)、马铃薯皮斑病菌(Polyscytalum pustulans)、葡萄假尾孢(Pseudocercospora vitis)、葱柄锈菌(Puccinia allii)、高粱柄锈菌(Puccinia sorghi)、牛痘膨痂锈菌(Pucciniastrum vaccinia)、瓜果腐霉(Pythium aphanidermatum)、德巴利腐霉(Pythium debaryanum)、具槽腐霉(Pythium sulcatum)、终极腐霉(Pythium ultimum)、茄科雷尔氏菌(Ralstonia solanacearum)、杜拉柱隔孢(Ramularia tulasneii)、立枯丝核菌(Rhizoctonia solani)、少根根霉(Rhizopus arrhizus)、匍枝根霉(Rhizopus stoloniferz)、小核盘菌(Sclerotinia minor)、银斑病病菌(Sclerotinia homeocarpa)、白腐小核菌(Sclerotium cepivorum)、齐整小核菌(Sclerotium rolfsii)、小核盘菌(Sclerotinia minor)、正核盘菌(Sclerotinia sclerotiorum)、芹菜生壳针孢(Septoria apiicola)、莴苣壳针孢(Septoria lactucae)、番茄壳针孢(Septoria lycopersici)、欧芹壳针孢(Septoria petroelini)、鳄梨痂圆孢(Sphaceloma perseae)、斑点单囊壳(Sphaerotheca macularis)、马铃薯粉痂菌(Spongospora subterrannea)、囊状匍柄霉(Stemphylium vesicarium)、内生集壶菌(Synchytrium endobioticum)、烟草根黑腐病菌(Thielaviopsis basicola)、葡萄钩丝壳(Uncinula necator)、疣顶单孢锈菌(Uromyces appendiculatus)、甜菜单孢锈菌(Uromyces betae)、黑白轮枝菌(Verticillium albo-atrum)、大丽轮枝菌(Verticillium

dahliae)、可可轮枝菌(Verticillium theobromae)或其组合。真菌病原体可以是尖孢镰刀菌或大丽轮枝菌。真菌病原体可以是灰葡萄孢。真菌病原体可以是白蜡树炭疽菌。真菌病原体可以是葡萄白粉菌。真菌病原体可以是粉霜霉甜菜生理型。真菌病原体可以是斑点单囊壳。真菌病原体可以是蓝莓干枯病菌。真菌病原体可以是高粱柄锈菌。真菌病原体可以是扩展青霉。真菌病原体可以是引起白粉病的真菌病原体。真菌病原体可以是引起霜霉病的真菌病原体。真菌病原体可以是引起干瘪浆果的真菌病原体。真菌病原体可以是引起玉米锈病的真菌病原体。

[0073] 植物、花、种子或其农产品可以是杏仁、杏、苹果、朝鲜蓟、香蕉、大麦、甜菜、黑莓、蓝莓、西兰花、抱子甘蓝、卷心菜、大麻、卡诺拉、辣椒、胡萝卜、芹菜、碧芰菜、樱桃、柑橘、玉米、棉花、葫芦、枣、无花果、亚麻、大蒜、葡萄、药草、香料、羽衣甘蓝、莴苣、薄荷、油棕、橄榄、洋葱、豌豆、梨、桃、花生、木瓜、欧洲防风、山核桃、柿子、李子、石榴、马铃薯、榲桲、萝卜、覆盆子、玫瑰、稻、黑刺李、高粱、大豆、菠菜、草莓、甘薯、烟草、番茄、芜菁、核桃或小麦的植物、花、种子或其农产品。植物、种子、花或其农产品可以是来自蔷薇科的植物或其农产品。来自蔷薇科的植物、花、种子或其农产品可以来自悬钩子属(诸如覆盆子或黑莓)、草莓属(诸如草莓)、梨属(诸如梨)、榲桲属(诸如榲桲)、李属(诸如杏仁、桃、李子、杏、樱桃或黑刺李)、蔷薇属(诸如玫瑰)或苹果属(诸如苹果)。植物、种子、花或其农产品可以是来自杜鹃花科的植物或其农产品。来自杜鹃花科的植物、种子、花或其农产品可以来自越橘属,诸如蓝莓。植物、种子、花或其农产品可以是来自杜鹃花科的植物或其农产品。来自杜鹃花科的植物、种子、花或其农产品可以来自越橘属,诸如蓝莓。植物、种子、花或其农产品可以是来自葡萄科的植物或其农产品。来自葡萄科的植物、种子、花或其农产品可以来自葡萄属,诸如葡萄。

生物防治组合物的鉴别和分离方法

[0074] 鉴别和/或选择生物防治组合物的方法可以包括分离地培养至少一种微生物或者与多种其他微生物和/或真菌病原体一起培养至少一种微生物。例如,至少一种微生物可以与真菌病原体一起培养,以鉴别至少一种微生物抑制真菌病原体生长的功效。至少一种微生物抑制真菌病原体生长的功效可以通过观察真菌病原体的生长参数来确定。例如,在半固体或固体生长培养基上靠近至少一种微生物处缺乏活真菌病原体可以用于确定高抑制功效。含有至少一种微生物和真菌病原体的液体培养基的光密度可以用于鉴别至少一种微生物的功效。

[0075] 至少一种微生物可以通过多种方法鉴别。可以对至少一种微生物进行测序反应。测序反应可以鉴别以下序列:16S rRNA、12S rRNA、18S rRNA、28S rRNA、13S rRNA和23S rRNA、内转录间隔区(ITS)、ITS1、ITS2、细胞色素氧化酶I(COI)、细胞色素b或其任何组合。测序反应可以鉴别16S rRNA序列、ITS序列或其组合。测序反应和由此产生的测序读段可以用于鉴别至少一种微生物的物种或菌株。由一个或多个测序反应产生的测序读段可以对照一个或多个参考序列进行处理,以便于至少一种微生物的鉴别。

[0076] 至少一种微生物可能会受到其他微生物的影响。当一起培养时,微生物可能协同表现,使得与分开培养时相比,当一起培养时,抗真菌特性得到改善。例如,当与另一种微生物一起培养时,至少一种微生物可能具有增加的生存能力。当与另一种微生物一起培养时,至少一种微生物可能具有增加的增殖。至少一种微生物可以利用另一种微生物产生的化学物质或代谢产物。至少一种微生物可以直接与另一种微生物相互作用。例如,至少一种微生

物与另一种微生物可以形成生物膜或多细胞结构。当与另一种微生物一起培养时，至少一种微生物可以产生和/或分泌增加量的次级代谢产物。例如，至少一种微生物可以产生中间代谢产物，其又被另一种微生物加工，产生次级代谢产物。本文其他地方公开的方法可用于鉴别可受益于与另一种微生物一起培养的微生物，以及鉴别包含第一微生物和第二微生物的生物防治组合物，其中第二微生物与第一微生物不相同。

[0077] 共同培养微生物可以以允许多种微生物相互作用或一起生长的多种方式进行。例如，可以培养第一微生物，然后可以将第二微生物与第一微生物培养物组合，反之亦然。蜡状葡糖杆菌可以是第一微生物，且葡萄有孢汉逊酵母可以是第二微生物。可替代地，葡萄有孢汉逊酵母可以是第一微生物，且蜡状葡糖杆菌可以是第二微生物。在另一个非限制性实例中，在将第一微生物和第二微生物组合之前，可以在第一培养装置中培养第一微生物，并且可以在第二培养装置中培养第二微生物。然后，可以将第一微生物从第一培养装置移出至第二培养装置，从而在单个培养装置中组合第一和第二微生物。在一些情况下，可以通过离心和重悬浮来促进第一微生物向第二培养装置的移动。例如，可以使用离心机沉淀第一微生物，重悬浮在新的液体中，然后加入到第二装置中。在一些情况下，可以将含有第一微生物的培养基直接倒入第二培养装置中。可以对第二微生物进行离心，并且可以将含有第一微生物的培养基加入到第二培养装置中。第一和第二微生物可以直接接种在单个培养装置中。可以将第一微生物直接接种在已经含有第二微生物的培养物中。可以以任何顺序将这两种微生物引入共同培养物中。例如，可以将第一微生物引入培养物，随后引入第二微生物，或者可以将第二微生物引入培养物，随后引入第一微生物。可以同时或基本上同时将第一和第二微生物引入培养物中。共同培养可以包括使一种微生物在经另一种微生物调节的培养基中生长。经调节的培养基可以包含或不包含细胞。例如，可以使第一微生物在第一培养基中生长，然后可以从第一培养基中除去。然后可以将第二微生物引入第一培养基中并允许其增殖。

[0078] 如上所述，共同培养可以在培养装置中进行。除了培养装置之外，还可以在植物、花、种子或其农产品上直接产生共同培养物。可以在其中包装或以其他方式储存植物、花、种子或其农产品的包装上直接产生共同培养物。如本文其他地方所公开，可以以各种顺序和量将共同培养物中的每种微生物施用至植物、花、种子或其农产品，或包装以产生共同培养物。

[0079] 生物防治组合物可以以每种微生物的量的特定产物比包含至少两种微生物。例如，第一和第二微生物可以具有1:1的产物比。第一和第二微生物可以具有1:3的产物比。第一和第二微生物可以具有3:1的产物比。第一和第二微生物可以具有一定产物比，其中第一微生物与第二微生物相比的量至少为1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:50、1:60、1:70、1:80、1:90或1:100或更多。第一和第二微生物可以具有一定产物比，其中第一微生物与第二微生物相比的量为至少1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、或100:1或更多。第一和第二微生物可以以1:1至1:100或1:1至1:10的产物比范围存在。第一和第二微生物可以以1:1至100:1或1:1至10:1的产物比范围存在。第一和第二微生物可以以100:1至1:100或10:1至1:10的产物比范围存在。第一和第二微生物可

以具有一定产物比，其中第一微生物与第二微生物相比的量不超过1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:50、1:60、1:70、1:80、1:90或1:100或更少。第一和第二微生物可以具有一定产物比，其中第一微生物与第二微生物相比的量不超过1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1或100:1或更少。在非限制性实例中，第一微生物可以是蜡状葡糖杆菌，且第二微生物可以是葡萄有孢汉逊酵母，并且蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母的产物比可以在约1:100和100:1之间。在另一个非限制性实例中，第一微生物可以是蜡状葡糖杆菌，且第二微生物可以是葡萄有孢汉逊酵母，并且蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母的产物比可以在约1:10和10:1之间。例如，第一微生物可以是蜡状葡糖杆菌，且第二微生物可以是葡萄有孢汉逊酵母，并且蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母的产物比可以是约100:1、50:1、20:1、10:1、5:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:5、1:10、1:20、1:50或1:100。

[0080] 在包含共同培养的蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母的组合物中，与单独培养的个体微生物、单独培养后的个体或组合相比，共同培养的微生物可以具有改善的减少或预防病原体生长的活性。例如，相对于包含单独培养的蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母中任一种的参考组合物，或者相对于以与共同培养组合物大致相同的细胞密度和细胞比组合的两种微生物，共同培养的蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母的组合物能够将真菌微生物的生长抑制10％或更多。相对于包含单独培养的至少两种微生物中任一种的组合物，或者相对于以与所述组合物大致相同的细胞密度和细胞比组合的两种微生物，共同培养的蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母的组合物能够将真菌微生物的生长抑制至少5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或甚至100％。例如，相对于包含单独培养的两种微生物中任一种的参考组合物，或者相对于以与所述组合物大致相同的细胞密度和细胞比组合的两种微生物，共同培养的蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母的组合物能够将真菌微生物的真菌疾病发病率抑制10％或更多。相对于包含单独培养的两种微生物中任一种的组合物，或者相对于以与所述组合物大致相同的细胞密度和细胞比组合的两种微生物，共同培养的蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母的组合物能够将真菌疾病发病率(FDI)改善至少5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、100％或更多。

[0081] 例如，相对于包含单独培养的至少两种微生物中任一种的参考组合物，或者相对于以与所述组合物相同的细胞密度和细胞比组合的两种微生物，至少两种微生物的组合物能够将真菌病原体的真菌疾病严重性降低10％或更多。相对于包含单独培养的至少两种微生物中任一种的组合物，或者相对于以与所述组合物相同的细胞密度和细胞比组合的两种微生物，至少两种微生物的组合物能够将真菌疾病严重程度抑制至少5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、100％或更多。

[0082] 在包含共同培养的蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母的组合物中，与单独培养的个体微生物，或者与以与共同培养组合物大致相同的细胞密度和细胞比组合的两种微生物相比，微生物的组合可以具有改善的生存能力。微生物的组合或共同培养物在使用给定的

发酵培养基、进料组合物和发酵过程生长的共同培养微生物发酵结束时可以具有活细胞计数，其是使用等效发酵培养基、进料组合物和发酵过程单独生长的个体微生物的活细胞计数总和的五倍以上。共同培养的蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母在使用给定的发酵培养基、进料组合物和过程生长的发酵结束时可以具有活细胞计数，其是在等效发酵培养基、进料组合物和发酵过程中单独生长的个体微生物的活细胞计数总和的1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11,12、13、14,15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90或100或更多倍以上。在发酵后，共同培养的蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母可以具有比在相同发酵过程中单独生长的个体微生物的细胞密度高10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％或更多的细胞密度。例如，共同培养的微生物的活细胞计数或细胞密度可以高达10^{9}、10^{10}、10^{11}、10^{12}或更高CFU/mL。

[0083] 在包含共同培养的蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母的组合物中，与单独的个体微生物相比，微生物的组合可以具有增加的生存能力，甚至在微生物储存后具有增加的生存能力。例如，在4℃和25℃之间的恒温下储存至少7天后，共同培养的蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母的活细胞计数高于在等效发酵过程中单独生长并经历等效储存条件的微生物的活细胞计数的总和。例如，在4℃和25℃之间的恒温下储存至少7天后，所述组合物的活细胞计数比在等效发酵过程中单独生长并经历等效储存条件的微生物的活细胞计数的总和高至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％或更多。在4℃和25℃之间的恒温下储存至少7天后，包含共同培养的蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母的组合物可以具有比在相同发酵过程中单独生长并经历相同储存条件的相应微生物的细胞密度高10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％或更多的细胞密度。例如，细胞密度可以高达10^{9}、10^{10}或10^{11}、10^{12}或更高CFU/mL。

[0084] 在一些情况下，共同培养的蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母可能受到环境条件的影响。共同培养的蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母可以在特定pH下生长或产生次级代谢产物。例如，共同培养的蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母生长的pH可以是3.0、4.0、5.0、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、9.0、10.0或更高的pH。例如，共同培养的蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母生长的pH可以是3.0、4.0、5.0、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、9.0、10.0或更低的pH。共同培养的蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母可以在盐的存在下生长或产生次级代谢产物。所述盐可以是缓冲盐。共同培养的蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母可以在糖或碳水化合物的存在下生长或产生次级代谢产物。所述糖或碳水化合物可以是葡萄糖或甘油。

[0085] 可以使用各种培养基或基质来培养生物防治组合物。共同培养的蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母可以在琼脂皿上培养。共同培养的蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母可以在半固体琼脂皿上培养。共同培养的蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母可以在液体培养基中培养。

用于预防或减少食物腐烂和食物腐败的方法

在收获前使用生物防治组合物处理植物、种子、花或其农产品

[0086] 预防或减少真菌病原体在植物、种子或其农产品上生长的方法可以包括在收获前向植物、种子、花或农产品施用包含本文所述的至少一种微生物或其一种或多种次级代谢产物以及载体的生物防治组合物。收获农产品可以指从植物的剩余部分除去植物的可食用

部分，或者可以指除去整个植物，随后除去可食用部分。

[0087] 在收获前施用生物防治组合物可以包括使用生物防治组合物撒粉、注入、喷涂或刷涂植物、种子或其农产品。施用生物防治组合物可以包括将生物防治组合物添加至滴线、灌溉系统、化学灌溉系统、喷雾剂(例如叶喷雾剂)或浸剂(例如根浸剂)。在一些情况下，将生物防治组合物施用至植物的根、植物的种子、植物的叶子、植物周围的土壤或者植物的可食用部分(其在本文中也称为植物的农产品)。

[0088] 所述方法还可以包括向植物施用肥料、除草剂、农药、其他生物防治剂或其组合。在一些情况下，肥料、除草剂、农药、其他生物防治剂或其组合在生物防治组合物之前施用、在生物防治组合物之后施用或者与生物防治组合物同时施用。

[0089] 预防或减少真菌病原体生长的方法可以包括向种子施用包含如本文所述的至少一种微生物或其次级代谢产物以及载体的生物防治组合物。可以在种植前、种植期间或种植后发芽前向植物的种子施用生物防治组合物。例如，可以在种植前将生物防治组合物施用至种子的表面。在一些情况下，在种植前进行的种子处理可以包括向生物防治组合物添加着色剂或染料、载体、粘合剂、粘着剂、消泡剂、润滑剂、营养剂或其组合。

[0090] 预防或减少真菌病原体生长的方法可以包括向土壤施用包含本文所述的至少一种微生物或其次级代谢产物以及载体的生物防治组合物。可以在将种子播种到土壤之前、之后或期间，或者在将植物转移到新的地点之前，将生物防治组合物施用至土壤。在一个实例中，在种植之前向土壤添加土壤改良剂，其中土壤改良剂使得植物的生长得到改善，并且其中土壤改良剂包含生物防治组合物。在一些情况下，土壤改良剂还包含肥料。

[0091] 预防或减少真菌病原体生长的方法可以包括向根施用包含本文所述的至少一种微生物或其次级代谢产物以及载体的生物防治组合物。可以将生物防治组合物直接施用至根。直接向植物的根施用的一个示例可以包括将根浸入包含生物防治组合物的溶液中。可以将生物防治组合物间接施用至根。间接向植物的根施用的一个示例可以包括将生物防治组合物喷涂在植物基部附近，其中生物防治组合物渗透土壤到达根部。在收获后使用生物防治组合物处理其农产品

[0092] 预防或减少真菌病原体在农产品上生长的方法可以包括在收获农产品之前或之后向农产品施用包含本文所述的至少一种微生物或其次级代谢产物以及载体的生物防治组合物。

[0093] 在收获之前或之后施用生物防治组合物可以包括使用生物防治组合物撒粉、浸渍、滚动、注入、擦抹、喷涂或刷涂植物的农产品。可以在收获前立即或收获后立即或者在收获的1天、2天、3天、4天、5天、6天或1周内将生物防治组合物施用至农产品。在一些情况下，通过进行收获的实体在收获之前或收获后立即处理农产品的过程中、通过包装农产品的实体、通过运输农产品的实体或者通过商业展示待售农产品的实体或消费者来施用生物防治组合物。

[0094] 在收获后施用生物防治组合物还可以包括将生物防治组合物结合到收获后处理农产品的过程中。可以在收获后立即处理农产品，例如在一次或多次清洗中。一次或多次清洗可包括使用其中已加入漂白剂(氯)和/或碳酸氢钠的水，或者臭氧化水。还可以使用油、树脂或者结构基质或化学基质处理农产品。可以将生物防治组合物与油、树脂或者结构基质或化学基质混合用于施用。可以在干燥农产品之前或之后处理农产品。例如，可将生物防

治组合物添加到用于涂覆农产品的蜡、阿拉伯树胶或其他涂料中。可以在该过程的任何时候添加生物防治组合物，包括在多次清洗的其中一次中，作为新清洗的一部分，或者与蜡、阿拉伯树胶或农产品的其他涂料混合。

使用生物防治组合物处理包装材料

[0095] 预防或减少真菌病原体在农产品上生长的方法可以包括向用于运输或储存农产品的包装材料施用包含本文所述的至少一种微生物或其次级代谢产物以及载体的生物防治组合物。

[0096] 包装材料可以包括：聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、模塑纤维、定向聚苯乙烯(OPS)、聚苯乙烯(PS)泡沫、聚丙烯(PP)或其组合。包装材料可以包括纸板、实心板、聚苯乙烯泡沫或模制纸浆。包装材料可以包括基底，诸如纤维素。包装材料可以是水平流(HFFS)包装、垂直流(VFFS)包装、热成型包装、密封托盘或拉伸膜。热成型包装可以是蛤壳包装。包装材料可以是薄木片制扁篮、托盘、篮子或蛤壳。

[0097] 用生物防治组合物处理的包装材料可以是插入物。插入物可以是垫、片材或毯子。插入物可以放置在薄木片制扁篮、托盘、篮子或蛤壳之中或之上。插入物可以包含纤维素或纤维素衍生物。插入物可以包含至少一层微孔聚合物(诸如聚乙烯或聚丙烯)和至少一层超吸收性聚合物。在一些情况下，插入物包括外层和内层。内层可以是吸水层。内层可以包括羧甲基纤维素、纤维素醚、聚乙烯吡咯烷酮、淀粉、葡萄糖、明胶、果胶或其组合。外层可以是透水层。

[0098] 向包装材料施用生物防治组合物可以包括用生物防治组合物清洗、喷涂或浸渍包装材料。

[0099] 本文所用的术语仅出于描述特定情况的目的，并不旨在进行限制。除了本领域技术人员理解这些术语之外，讨论以下术语以说明如在本说明书中使用的术语的含义。如本文和所附权利要求书中所用的，除非上下文另外明确指出，否则单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数对象。还应注意，权利要求书可以被修改成排除任何可选要素。因此，该陈述旨在用作使用与权利要求要素的叙述有关的诸如“单独地”、“仅”等排他性术语或使用“否定”限制的先行基础。

[0100] 本文以在数值之前加上术语“约”提供某些范围。术语“约”在本文中用于为其之后的确切数字以及与该术语之后的数字接近或近似的数字提供文字支持。在确定数字是否接近或近似于具体列举的数字时，接近或近似的未列举的数字可以是上下文中提供的与具体列举的数字大致相等的数字。在提供数值范围的情况下，应当理解，除非上下文另外明确指出，否则在该范围的上限和下限之间的每个中间值至下限单位的十分之一，以及在所述范围内的任何其他陈述值或中间值，都涵盖在本文所述的方法和组合物内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括在较小的范围内，并且也涵盖在本文所述的方法和组合物内，受所述范围中的任何具体排除的限值限制。当所述范围包括一个或两个限值时，排除那些包括的限值中的一个或两个的范围也包括在本文所述的方法和组合物中。

[0101] 除非另有定义，否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本文所述的方法和组合物所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本文所述的那些类似或等同的任何方法和材料也可用于实施或测试本文所述的方法和组合物，但现在描述代表性的示例性方法和材料。

[0102] 给出以下实施例是出于说明本发明的各种实施方案的目的，并不意味着以任何方式限制本发明。本发明实施例连同本文所述的方法目前代表优选的实施方案，是示例性的，并且不意图作为对本发明范围的限制。本领域技术人员将会想到包含在如权利要求的范围所限定的本发明精神内的其中的变化和其他用途。

实施例

实施例1.当重组为聚生体时，共同培养的BC18比BC18对灰葡萄孢更有效。

[0103] 测试了微生物聚生体BC18(由蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母组成)预防收获后草莓果实上灰葡萄孢生长的能力。将BC18的微生物组分分离培养、一起共同培养或在分离培养后重组。与作为分离物培养或重组为聚生体的BC18微生物组分相比，共同培养的BC18导致整个草莓果实上的真菌疾病发病率降低(图1和图2A-图2F)。

实验装置

微生物生长条件

[0104] 在150rpm的摇动下，使BC18微生物组分在250ml培养瓶中与50ml马铃薯葡萄糖发酵液一起在28℃下生长72小时。在72小时后，将30ml这样的摇瓶发酵液在22℃下以3500rpm离心10分钟。将细胞重新悬浮在磷酸盐缓冲盐水(PBS;100mM磷酸盐缓冲液pH 7.0)中至浓度为$1x10^8$个细胞/ml，如用Olympus Bx显微镜在血细胞计数器上所计数。本实验中使用的BC18微生物组分由以下组成:单独培养的蜡状葡糖杆菌、单独培养的葡萄有孢汉逊酵母，以及蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母的两种共同培养物。在发酵结束时，每个共同培养物中蜡状葡糖杆菌和葡萄有孢汉逊酵母的产物比分别为约1:1和3:1，如通过血细胞计数器所计数。在PBS中重新悬浮至$1x10^8$个细胞/mL后，以3:1和1:1比率(蜡状葡糖杆菌:葡萄有孢汉逊酵母)组合单独培养的蜡状葡糖杆菌和单独培养的葡萄有孢汉逊酵母。

[0105] 将灰葡萄孢在100mm x 15mm陪替氏培养皿中的草莓琼脂(包含500g共混的草莓果实、500g水和20g琼脂)上于25℃下培养8天。通过向两个这样的平板中加入15mL PBS并用无菌的一次性L形涂布器刮擦平板来收集孢子。通过40μm细胞过滤器将所得孢子悬浮液倾析到50ml离心管中。将孢子悬浮液在3500rpm和22℃下离心10分钟，并重新悬浮在无菌PBS中，以实现$1x10^6$个孢子/mL的最终孢子浓度，如在血细胞计数器上所计数。

草莓果实接种和孵育

[0106] Bella Vista有机草莓果实在Sprouts农贸市场(加利福尼亚州山景城圣安东尼奥路30号，邮编94040(30San Antonio Rd,Mountain View,CA 94040))商业购买。草莓果实未灭菌(在这种情况下，购买后不对草莓果实进行修饰)或灭菌(在这种情况下，用消毒擦布(Good and Clean Inc.)擦拭草莓果实的整个表面20-30秒)。未灭菌和灭菌的草莓果实各自接种以下处理之一(N＝10):无菌PBS，阴性对照;无菌PBS，阳性对照;蜡状葡糖杆菌，称为BC18B;葡萄有孢汉逊酵母，称为BC18Y;以1:1比率共同培养的蜡状葡糖杆菌:葡萄有孢汉逊酵母，称为C1:1;以3:1比率共同培养的蜡状葡糖杆菌:葡萄有孢汉逊酵母，称为C3:1;以3:1比率组合的蜡状葡糖杆菌:葡萄有孢汉逊酵母，称为R3:1;以1:1比率组合的蜡状葡糖杆菌:葡萄有孢汉逊酵母，称为R1:1比率。

[0107] 接种通过用sharpie记号笔在草莓果实长度的三分之二处创建接种标记来完成。使用10μl移液器将10μl微生物候选悬浮液或无菌PBS插入接种标记右侧5mm内，其中移液器尖端插入草莓果实不超过其长度的一半。这允许接种草莓果实的内部和草莓果实的外部，

接种后残留的微生物悬浮液或无菌PBS停留在那里。

[0108] 将草莓果实包含在无菌100mm x 15mm陪替氏培养皿的一侧，所述培养皿用重型锡纸包裹以防止草莓果实之间的污染。将接种的草莓果实在黑暗中于25℃下孵育24小时，以允许微生物在草莓果实中定殖。在24小时后，在与先前接种微生物悬浮液或无菌PBS相同的位置，如上所述将灰葡萄孢孢子悬浮液接种到草莓果实中。PBS阴性对照没有接受灰葡萄孢接种。

实验分析

[0109] 在接种灰葡萄孢后3天和6天(分别为T3和T6)，用iPhone 7拍摄草莓果实的图像。在T3时，没有阳性对照(仅接受无菌PBS和灰葡萄孢接种)显示出灰葡萄孢生长的迹象。然而，许多草莓果实被其他天然存在的真菌病原体覆盖，使得接种部位在灰葡萄孢有机会生长之前被覆盖。将这些草莓从分析中剔除(表3)。在T6时，评估草莓果实在接种部位处是否存在灰葡萄孢生长。如果不能确定灰葡萄孢的存在或不存在，即由于遮蔽的接种部位，则所述草莓果实被排除在分析之外(表3)。将每个处理中具有灰葡萄孢生长证据的草莓果实的数量除以每个处理中剩余的草莓果实的总数，以计算局部灰葡萄孢真菌疾病发病率(LBDI)的百分比。

表3.感染灰葡萄孢前不同处理后草莓果实中的LBDI发展

处理	SF[a]条件	在T3时排除的SF[b]	在T6时排除的SF[c]	灰葡萄孢发病率[d]
PBS防治	灭菌的	8	2	N/A
灰葡萄孢防治	灭菌的	7	0	2
BC18B	灭菌的	0	0	3
BC18Y	灭菌的	2	0	7
C 1:1	灭菌的	2	4	0
R 1:1	灭菌的	2	3	3
C 3:1	灭菌的	0	1	3
R 3:1	灭菌的	4	2	4
PBS防治	未灭菌的	6	4	N/A
灰葡萄孢防治	未灭菌的	2	1	7
BC18B	未灭菌的	3	2	3
BC18Y	未灭菌的	3	3	4
C 1:1	未灭菌的	0	4	2
R 1:1	未灭菌的	1	1	6
C 3:1	未灭菌的	0	3	0
R 3:1	未灭菌的	2	1	1

[a]草莓果实

[b]此栏示出了在T3时由于天然存在的真菌疾病的过度生长而从每个处理中剔除的

草莓果实数量，所述真菌疾病遮蔽了灰葡萄孢接种部位。

[c]此栏示出了在T6时无法确定LBDI的草莓果实数量。这些草莓果实没有用于LBDI计算％。

[d]在接种部位处显示灰葡萄孢生长证据的草莓果实数量。

[0110] 对于灭菌和未灭菌的草莓果实两者，共同培养的BC18优于作为单独培养的分离物的两种个体BC18微生物组分(BC18B和BC18Y)中的每一种，以及两种单独培养的分离物的组合。虽然BC18B与阳性对照相比显示出LBDI的少量减少，但BC18Y在灭菌或未灭菌的草莓果实上没有显示出LBDI的减少。对于未灭菌的草莓果实，C3:1的LBDI为0％，且其对应者R3:1的LBDI为14％。C1:1的LBDI为33％，而R1:1处理的LBDI为75％。同样，在灭菌的草莓果实上，C3:1的LBDI比R3:1低67％，并且C1:1的LBDI比R1:1低60％(图1和图2A-F)。图2A-2F示出了与重组BC18对应者相比，接种了共同培养BC18的草莓果实接种灰葡萄孢后6天的代表性图像。具体地说，图2A示出C3:1，图2B示出C1:1，图2C示出R3:1，图2D示出R1:1，图2E示出BC18Y，图2F示出仅灰葡萄孢对照。

[0111] 应当指出的是，虽然每种BC18共同培养物都比组合的对应者具有更高的功效，但C3:1对非无菌草莓果实具有更高的功效，且C1:1对无菌草莓果实具有最好的功效。不受理论的限制，这可能与灭菌过程中天然草莓果实表面微生物群的破坏有关，并表明BC18共同培养物的比率影响其在草莓果实表面上的活性。天然存在的真菌病原体的存在提供了观察BC18聚生体的局部接种如何保护好整个草莓果实免受其他真菌疾病(最显著的是根霉)侵害的机会。通过基于真菌疾病发病率(FDI)和对接种部位的FDI接近程度给每个草莓分配健康得分来量化这些观察结果(图3A-图3F)。图3A示出了4分草莓果实，其没有明显真菌疾病。图3B示出了3分草莓果实，其患有存在于草莓果实上但不在接种部位附近的真菌疾病。图3C示出了2分草莓，其在接种部位的大概5mm内患有真菌疾病。图3D示出了1分草莓，其在接种部位的边缘处患有真菌疾病。图3E示出了1分草莓，其患有在接种部位的边缘处不存在的真菌疾病，但接种部位是不健康的。图3F示出了0分草莓，其患有覆盖草莓果实而与接种部位无关的真菌疾病。图4示出了每个草莓果实每次处理的健康得分的总和。假设在T3时从分析中剔除的草莓果实的健康得分为0。用C3:1接种的草莓果实具有最高的健康得分(图4)，远远优于用R3:1接种的草莓果实。从结果来看，共同培养条件和共同培养物中蜡状葡糖杆菌与葡萄有孢汉逊酵母的最终比率两者都可能影响BC18在草莓果实上对FDI的功效。

实施例2：葡萄有孢汉逊酵母和蜡状葡糖杆菌的共同培养物的发酵比任一微生物单独发酵产生更高的活生物量

[0112] 在2升(2-L)台式DASGIP发酵桶中进行了三个共同培养发酵实验(条件：共同培养防治、停止进料的共同培养、停止进料和具有温度峰值的共同培养)和单独的葡萄有孢汉逊酵母的一个发酵实验(条件：单独的葡萄有孢汉逊酵母)。将由酵母提取物(5-10g/kg)、硫酸镁七水合物(1-3g/kg)、磷酸二氢钾(0.5-2g/kg)、硫酸铵(0.5-1.5g/kg)、类似于来自Teknova的改良微量金属溶液的微量元素溶液和维生素溶液(各2mL/kg)以及消泡剂(1g/kg)组成的培养基用于所有发酵。制备由泛酸(2-4g/L)、盐酸硫胺素(1-6g/L)、核黄素(0.25-2.25g/L)、盐酸吡哆醇(0.25-2.25g/L)和生物素(0.25-2.25g/L)组成的维生素溶液，并且用箔纸包裹并储存在4℃下的冰箱中。在无菌后添加氯化钙二水合物(2-4g/L)和葡萄糖(50g/L)。酵母发酵桶的pH和温度分别是4.8和29℃；而共同培养发酵在pH 5.2和温度

30℃下运行。使用氨水进行pH控制。将由50％w/w葡萄糖溶液组成的进料以7.4mL/hr速率从20小时开始进料，直到68小时运行结束。三次共同培养发酵在整个运行中以相同的方式运行，除了对三次发酵中的两次给予不同的发酵处理结束。对于一个发酵(条件：停止进料的共同培养)，在67小时，切断进料。最后一个共同培养发酵(条件：停止进料和具有温度峰值的共同培养)切断进料，并且温度在67小时升至32℃。

[0113] 在15L SIP/CIP发酵桶中进行了单独的蜡状葡糖杆菌的一个发酵实验(条件：单独的蜡状葡糖杆菌)。发酵培养基由酵母提取物(5-10g/kg)、豆粕(5-10g/kg)、硫酸镁七水合物(1-3g/kg)、磷酸二氢钾(0.5-2g/kg)、硫酸铵(0.5-1.5g/kg)、类似于来自Teknova的改良微量金属溶液的微量元素溶液(2mL/kg)以及消泡剂(1g/kg)组成。在无菌后添加氯化钙二水合物(2-4g/L)和葡萄糖(50g/L)。将pH控制在5.5，温度为30℃。使用氨水进行pH控制。将由60％w/w葡萄糖溶液组成的进料以0.95g/min速率从30小时开始进料，直到运行结束(72小时)。

[0114] 单独的蜡状葡糖杆菌发酵经历了大量的起泡，在发酵过程中需要添加大量的消泡剂；而共同培养发酵未经历任何起泡，从而使其成为更可扩展的过程。

[0115] 通过在马铃薯葡萄糖琼脂上进行系列稀释铺板来测量发酵样品每一结束时的生存能力。通过使用马铃薯葡萄糖发酵液在96孔板中连续稀释每个样品的子样品，并在马铃薯葡萄糖琼脂上铺板20μl可能在某些时间点产生可计数菌落的稀释范围来进行CFU(菌落形成单位)铺板。将平板在室温下孵育2天。人工计数菌落并乘以稀释因子50以确定CFU/mL(菌落形成单位/毫升)。仅最高可计数稀释度用于CFU/mL的最终计算。

[0116] 共同培养两种微生物导致在发酵过程结束时活生物量增加两个对数。表5示出了各种条件和微生物的发酵结束时的CFU/mL(菌落形成单位/毫升)。如表5所示，与从单独的葡萄有孢汉逊酵母和蜡状葡糖杆菌获得的总活细胞计数相比，共同培养导致至少对数增加。

表5：发酵结束时的活细胞计数

条件	单独的葡萄有孢汉逊酵母	单独的蜡状葡糖杆菌	共同培养防治	停止进料的共同培养	停止进料和具有温度峰值的共同培养
发酵结束时的CFU/mL	8.50×10^{9}	1.80×10^{9}	2.13×10^{11}	1.90×10^{11}	1.25×10^{11}

实施例3.与任一单独的微生物相比，葡萄有孢汉逊酵母和蜡状葡糖杆菌的共同培养证明了稳定性的提高

[0117] 将来自实施例2的发酵结束样品储存在4℃下的冰箱中。使用与实施例2中所述相同的连续稀释平板法，对仅含有细菌的样品在33天和50天，对酵母和共同培养物在31天和46天测量生存能力。在第31天时，将稀释度10^{-6}、10^{-7}和10^{-8}铺板。在第33天时，将稀释度10^{-4}、10^{-5}和10^{-6}铺板。在第46天时，针对单独的酵母样品将稀释度10^{-4}、10^{-5}和10^{-6}铺板，并且针对共同培养将稀释度10^{-7}和10^{-8}铺板。在第50天时，将稀释度10^{-7}和10^{-8}铺板。

[0118] 在4℃下储存超过一个月的单独的葡萄有孢汉逊酵母发酵样品在稀释平板上没有显示任何生长，而当单独发酵时，葡萄有孢汉逊酵母和蜡状葡糖杆菌两者在样品储存50天

后在稀释平板上都没有显示任何生长。在4℃条件下延长储存长达50天期间，共同培养显示生存能力计数下降不超过1.5个对数。

[0119] 与个体微生物的发酵样品相比，所有共同培养样品，无论发酵处理结束时的差异如何，都具有优异的稳定性。下表6示出了每种情况在每个时间点的活细胞计数。

表6.一段时间内微生物的活细胞计数

条件	在以下天时的 CFU/mL		
	0	31-33	46-50
单独的葡萄有孢汉逊酵母	8.50×10^{9}	$<10^{3}$	$<10^{3}$
单独的蜡状葡糖杆菌	1.80×10^{9}	4.73×10^{9}	$<10^{6}$
共同培养防治	2.13×10^{11}	1.09×10^{12}	4.05×10^{10}
停止进料的共同培养	1.90×10^{11}	1.02×10^{10}	2.15×10^{10}
停止进料和具有温度峰值的共同培养	1.25×10^{11}	7.90×10^{9}	6.50×10^{9}

[0120] 在发酵结束时以及在4℃下的废发酵液中储存46天后，测量了所有共同培养发酵样品的葡萄有孢汉逊酵母与蜡状葡糖杆菌比率。使用Stratedigm S100，通过流式细胞术来计算发酵结束比率。将样品在22℃下以3500rpm离心10分钟。然后将沉淀的固体重新悬浮在等体积的无菌PBS中。使悬浮液在重力作用下通过20μm筛网过滤器，并将100μl滤液加入1mL PBS中。由于葡萄有孢汉逊酵母比蜡状葡糖杆菌更大且内部更复杂，使用前向和侧向散射参数观察到每个细胞群体的清晰分离(图5)。在储存46天后，通过显微镜结合人工计数来计算葡萄有孢汉逊酵母与蜡状葡糖杆菌比率。在Leica DM5500 B光学显微镜上，以40倍放大倍数对湿载片进行相位对比成像。手动计数每个样品的三个此类图像中葡萄有孢汉逊酵母和蜡状葡糖杆菌的数量，以确定每个样品中微生物组分的比率。表7示出了在4℃下储存后，共同培养物中的微生物比率。值得注意的是，在所有情况下，蜡状葡糖杆菌以远高于葡萄有孢汉逊酵母的浓度存在。然而，尽管共同培养物由蜡状葡糖杆菌占优势，但共同培养物的生存能力优于单独培养的任一生物的生存能力。

表7.在4℃下储存后，共同培养样品中的微生物比率

条件	发酵后数天，蜡状葡糖杆菌与葡萄有孢汉逊酵母比率	
	0 天	46 天
共同培养防治	49:1	49:1
停止进料的共同培养	3:1	99:1
停止进料和具有温度峰值的共同培养	99:1	33:1

实施例4.在田间和收获后的草莓上的共同培养的BC18。

[0121] 评估共同培养的BC18对草莓田中灰葡萄孢的功效。将共同培养的BC18以少于10^{8}cfu/英亩的剂量施用至地块，每月施用少于4次。另外，为了测试共同培养的BC18在储存后的功效，将一组共同培养的BC18在施用前在25℃下储存四周，同时以不同的剂量测试由于储存引起的活性损失。将新鲜的(未老化的)共同培养的BC18和储存了四周的BC18两者施

用至草莓地块。对每个实验条件进行多次重复。使对照地块未处理或用另一种化合物处理(作为生物学基准)。另外,在单独的地块中,将共同培养的BC18与综合害虫管理中常用的肥料、杀真菌剂和/或杀虫剂的标准时间表一起施用,以确定相容性并观察对草莓上使用的任何组合物的任何不良影响。可以施用的其他杀真菌剂的示例包括但不限于氟吡菌酰胺、三(O-乙基膦酸酯)铝、嘧菌酯、啶酰菌胺、克菌丹、环酰菌胺、氢氧化铜、氯氧化铜、硫酸铜、氧化亚铜、嘧菌环胺、咯菌腈、环酰菌胺、氟嘧菌酯、异菌脲、精甲霜灵、甲霜灵、腈菌唑、亚磷酸酯(亚磷酸盐)、丙环唑、唑菌胺酯、嘧霉胺、喹氧灵、硫磺、甲基硫菌灵、肟菌酯或氟菌唑。杀虫剂的示例包括但不限于啶虫脒、联苯菊酯(benifenthrin)、甲氰菊酯、硫丹、氟酰脲或西维因。

[0122] 在田间和收获后观察草莓,以确定对灰葡萄孢的抑制作用。对田间和收获后的草莓进行拍照和评分,以确定草莓的健康状况。将所述抑制与竞争性基准进行比较,以确定共同培养的BC18相对于基准的功效提高。

[0123] 尽管已经在本文中示出和描述了本发明的优选实施方案,但是对于本领域技术人员而言显而易见的是,这些实施方案仅以示例的方式提供。在不脱离本发明的情况下,本领域技术人员现在将想到许多变化、改变和替换。应该理解,本文描述的本发明的实施方案的各种替代方案可以用于实施本发明。旨在由以下权利要求限定本发明的范围,并且由此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物。

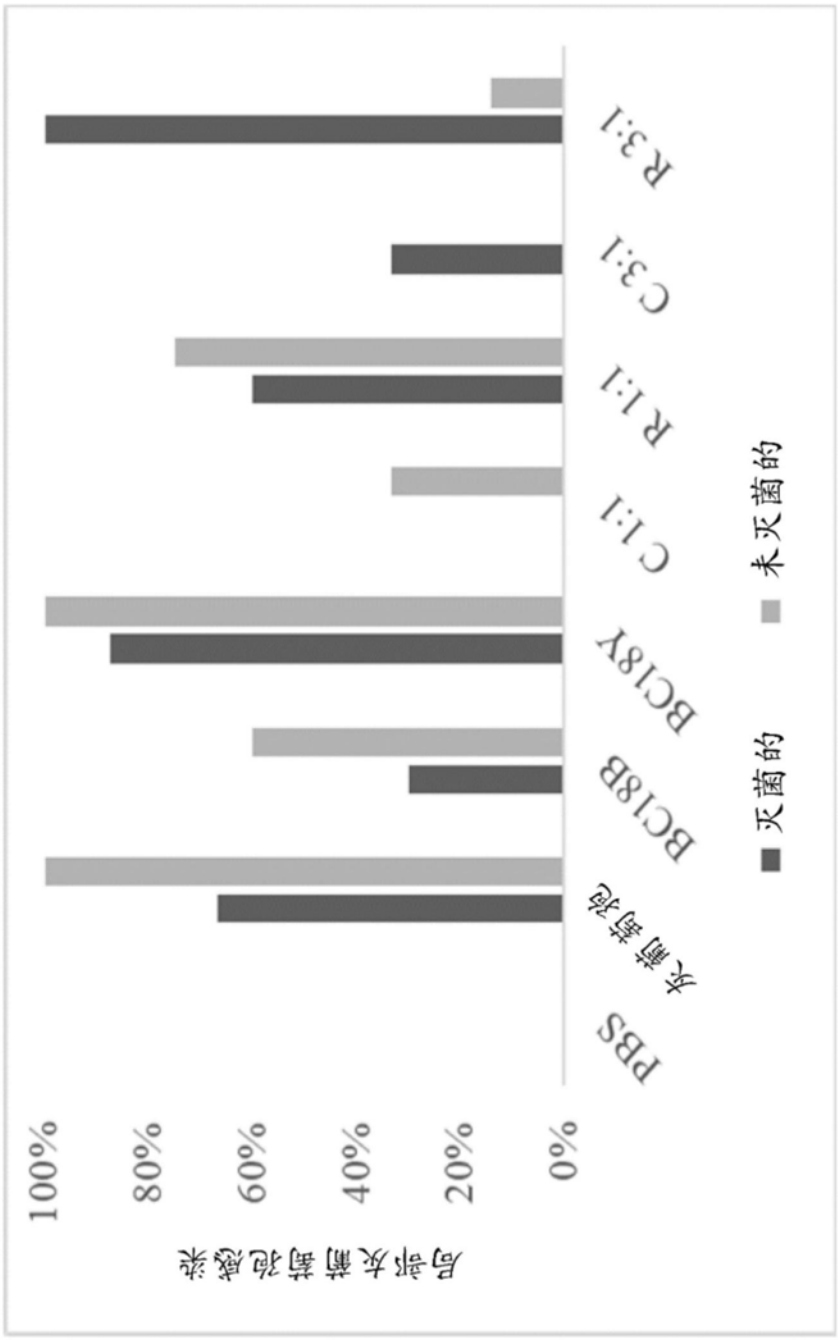

局部灰葡萄孢感染
100%
80%
60%
40%
20%
0%
PBS
水黄芩苷
BC18B
BC18Y
C1:1
R1:1
C3:1
R3:1
灭菌的
未灭菌的

图1

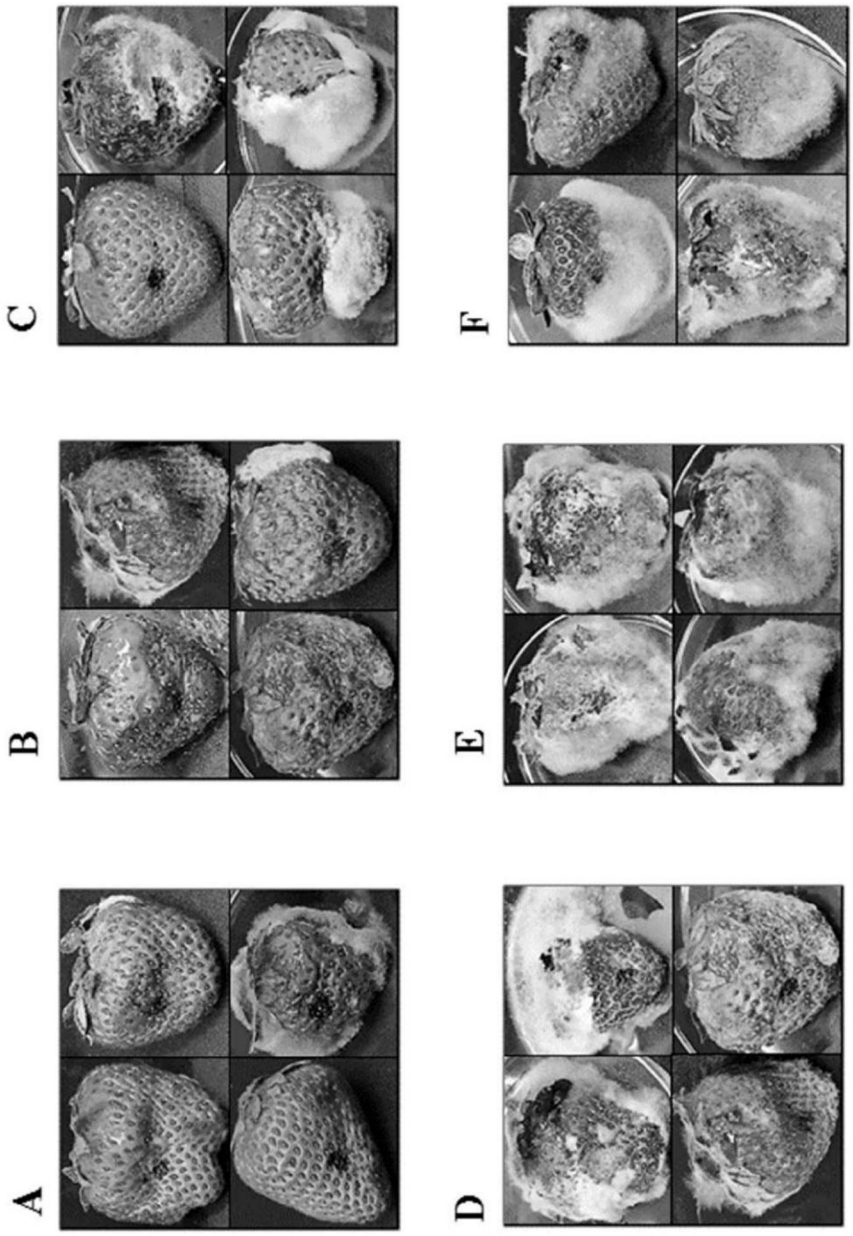


图2

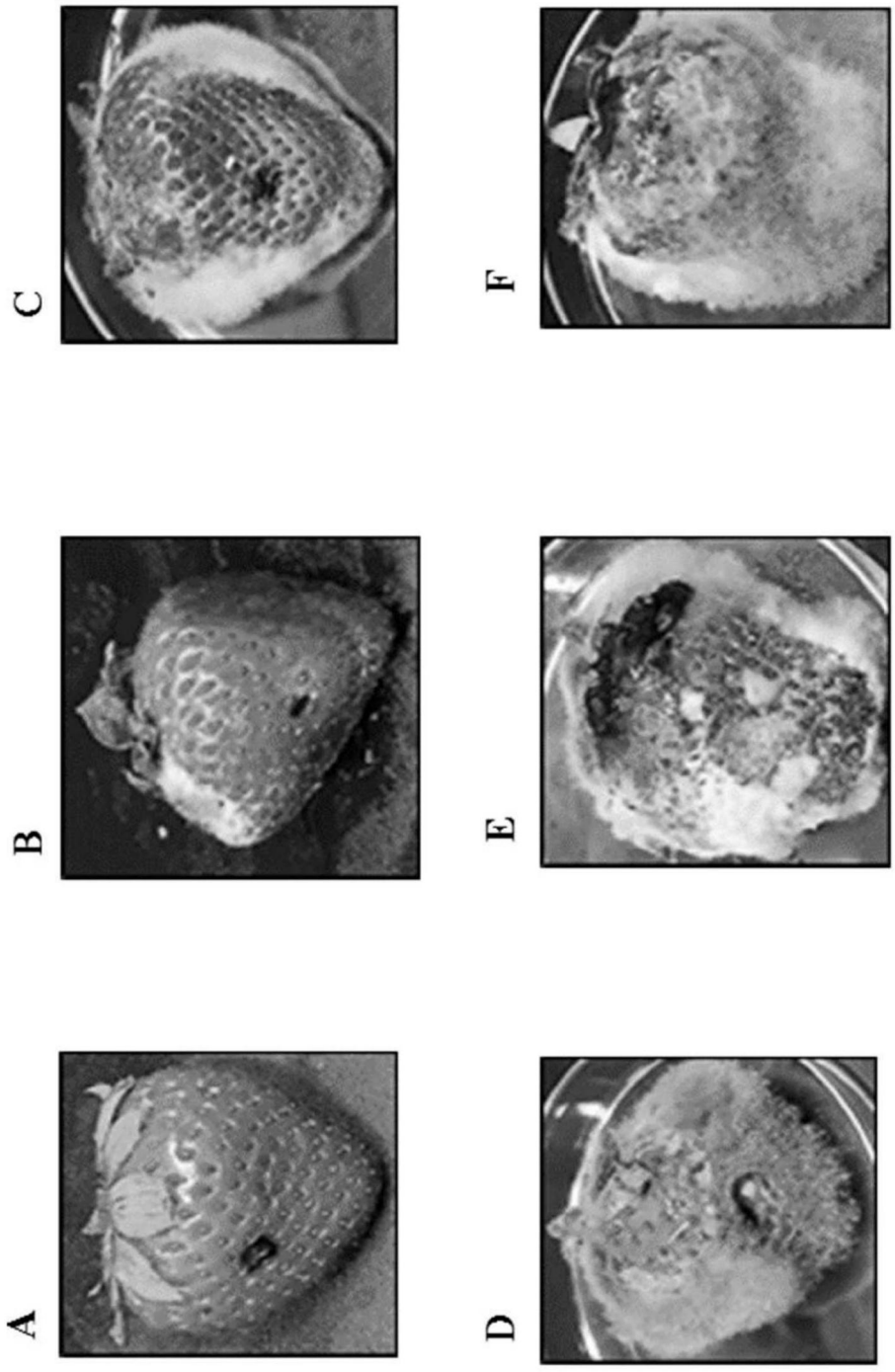


图3

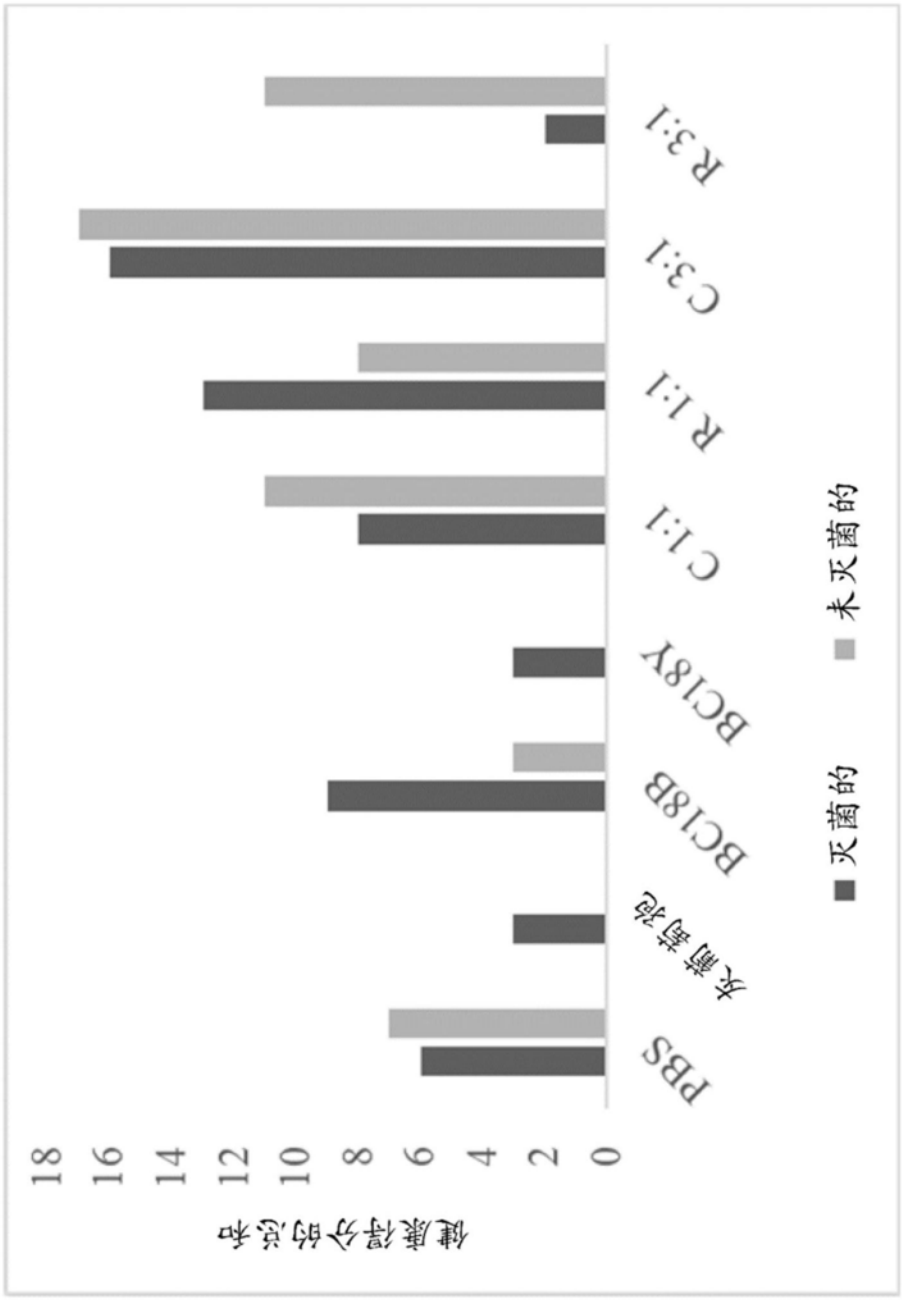

健康得分的总和
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
PBS
灰葡萄孢
BC18B
BC18Y
C1:1
R1:1
C3:1
R3:1
灭菌的
未灭菌的

图4

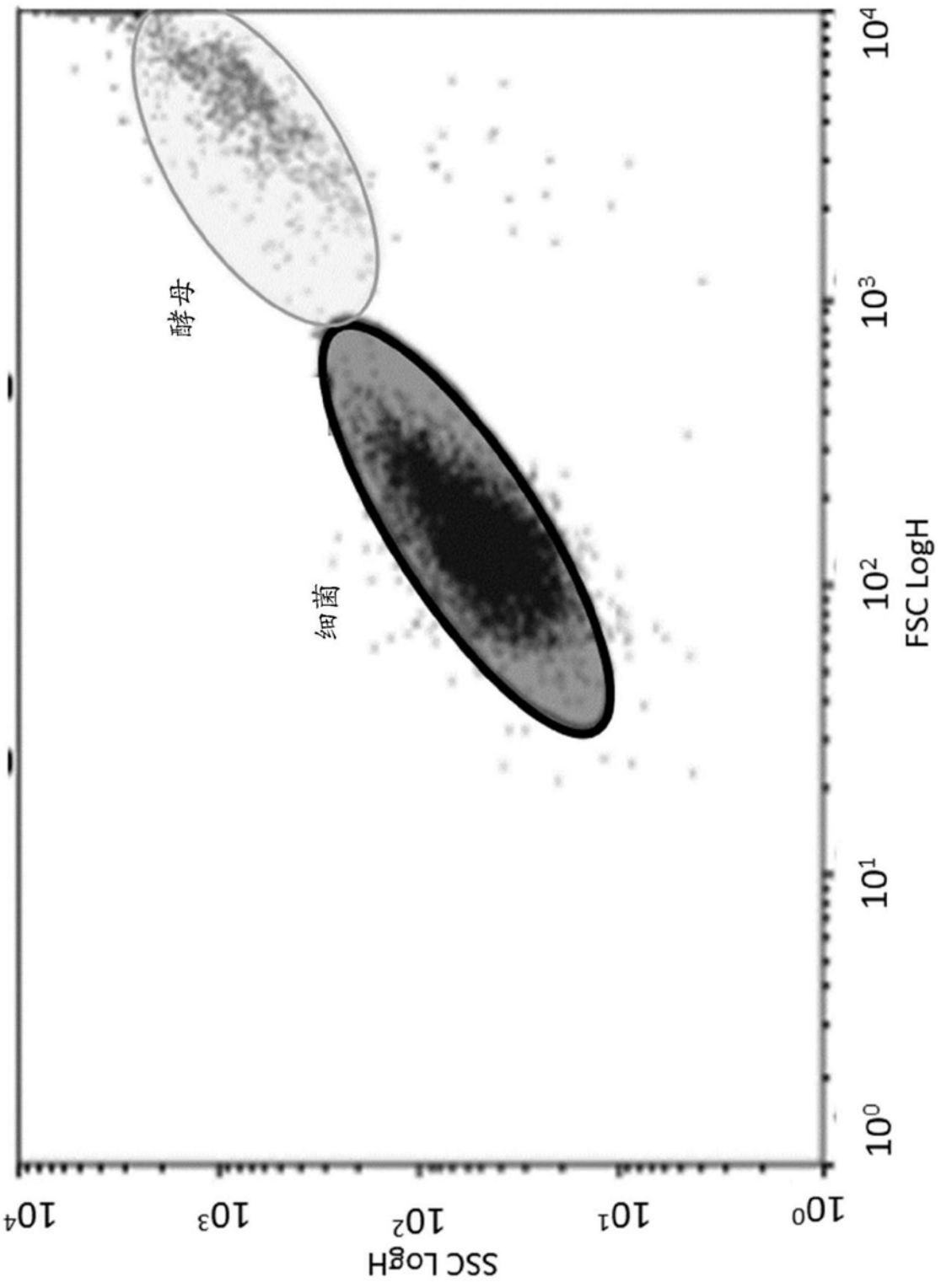


图5