

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-534671  
(P2017-534671A)

(43) 公表日 平成29年11月24日(2017.11.24)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
<b>AO1N 63/02</b> (2006.01)	AO1N 63/02	Z N A A	2 B O 2 2
<b>AO1N 43/50</b> (2006.01)	AO1N 43/50	Q	2 B O 3 0
<b>AO1P 21/00</b> (2006.01)	AO1N 63/02	B	2 B O 5 1
<b>AO1P 13/00</b> (2006.01)	AO1P 21/00		4 B O 6 5
<b>C05F 11/08</b> (2006.01)	AO1P 13/00		4 H O 1 1
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 77 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-532222 (P2017-532222)	(71) 出願人	517080658 イノキュコール テクノロジーズ インコ ーポレイテッド カナダ国 エイチ4エス 2エイ1 ケベ ック州 モントリオール フレデリックー バンティング 7220 スイート 10 O
(86) (22) 出願日	平成27年9月9日(2015.9.9)	(74) 代理人	100083806 弁理士 三好 秀和
(85) 翻訳文提出日	平成29年5月8日(2017.5.8)	(74) 代理人	100095500 弁理士 伊藤 正和
(86) 國際出願番号	PCT/IB2015/001950	(74) 代理人	100111235 弁理士 原 裕子
(87) 國際公開番号	W02016/038460		
(87) 國際公開日	平成28年3月17日(2016.3.17)		
(31) 優先権主張番号	62/048, 256		
(32) 優先日	平成26年9月9日(2014.9.9)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】微生物組成物及びその使用方法

## (57) 【要約】

本開示は、種子の発芽及び植物の成長などの生物刺激に対応した、組成物及びその使用方法を含む。例えば、本開示は、植物の成長に影響を与え、植物の成長を促し、調整し、刺激または助けるための、組成物及びその使用方法を含む。この要約は、特定の技術分野における研究目的に対応した、選別手段を意図しており、及び本開示を限定する意図はない。

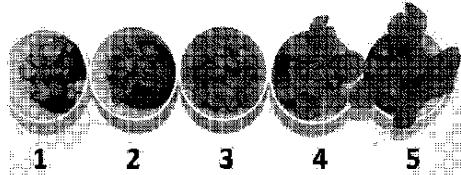


FIG. 12

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ATCC特許寄託指定番号PTA-12383であるIN-M1、またはATCC特許寄託指定番号PTA-121556であるIN-M2のいずれかの単離された微生物から成る、単離された混合微生物組成物で植菌された、微生物培養体の無細胞上清を含む組成物。

**【請求項 2】**

前記無細胞上清が、ろ過滅菌されている、請求項1に記載の前記組成物。

**【請求項 3】**

除草剤をさらに含む、請求項1に記載の前記組成物。

10

**【請求項 4】**

殺虫剤をさらに含む、請求項1に記載の前記組成物。

**【請求項 5】**

殺真菌剤をさらに含む、請求項1に記載の前記組成物。

**【請求項 6】**

栄養溶液をさらに含む、請求項1に記載の前記組成物。

**【請求項 7】**

少なくとも1つの単離された菌根菌をさらに含む、請求項1に記載の前記組成物。

**【請求項 8】**

農学的に許容されるキャリアー、及び請求項1～7のいずれか1項に記載の前記無細胞上清組成物の有効量を含む組成物。

20

**【請求項 9】**

請求項1～7のいずれか1項に記載の無細胞上清組成物、または請求項8に記載の前記組成物を、種子に、植物に、もしくは特定の成長段階における植物に、またはそれらを組み合わせに与え、その結果、植物の成長を増進させることを含む、植物成長の増進法。

**【請求項 10】**

前記無細胞上清組成物を与えることが、その無細胞上清を植物の種子に適用することを含む、請求項9に記載の前記方法。

**【請求項 11】**

前記無細胞上清組成物を与えることが、その無細胞上清を植物の根に適用することを含む、請求項9に記載の前記方法。

30

**【請求項 12】**

前記無細胞上清組成物を与えることが、その無細胞上清を植物の葉または茎に適用することを含む、請求項9に記載の前記方法。

**【請求項 13】**

前記植物が、温室で育つ、請求項9に記載の前記方法。

**【請求項 14】**

前記植物が、野外農地で育つ、請求項9に記載の前記方法。

**【請求項 15】**

植物成長の増進が、葉面積または乾燥バイオマスの増加である、請求項9に記載の前記方法。

40

**【請求項 16】**

無細胞上清組成物を調製する方法であって、

(a) 発酵培養液を、ATCC特許寄託指定番号PTA-12383であるIN-M1、またはATCC特許寄託指定番号PTA-121556であるIN-M2のいずれかの単離された微生物から成る、単離された混合微生物組成物で植菌すること、

(b) 前記植菌された発酵培養液をインキュベートすること、及び

(c) 前記植菌された発酵培養液から、実質的に全ての微生物を取り出し、その結果、前記無細胞上清を提供すること

のステップを含む、前記方法。

50

**【請求項 17】**

前記取り出しのステップが、ステップ( b )の後で、少なくとも 10 分間、少なくとも  $14,000 \times g$  の遠心力で、前記培養体を遠心分離することを含む、請求項 16 に記載の前記方法。

**【請求項 18】**

前記無細胞上清を滅菌するステップ( d )をさらに含む、請求項 16 に記載の前記方法。

**【請求項 19】**

滅菌が、ろ過滅菌である、請求項 18 に記載の前記方法。

**【請求項 20】**

請求項 16 に記載の前記方法によって調製される、無細胞上清組成物。

10

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

関連特許の相互参照

本出願は、2014年9月9日に出願された、米国仮特許出願番号 62/048,256 の優先利益を主張し、その全体を参照として、本明細書に組み入れる。

**【0002】**

EFS-WEB 経由でテキストファイルとして提出された配列リストの参照

2015年、9月9日作成の、テキストファイル名「26148\_0002P1\_Se\_q\_ST25.txt」で、2015年9月9日に提出され、及び 1,348 バイトのサイズを有する配列リストを、37 C.F.R. § 1.52(e)(5) に従って、参照として本明細書に組み入れる。

20

**【0003】**

本発明は、開示した組成物の適用による、例えば、発芽率、早期の植物成長、植物収穫量、及びバイオマスを含む、植物の成長反応を効果的に改善する組成物及びその使用方法の開示である。

**【背景技術】****【0004】**

植物用生物刺激剤は、葉面散布及び／または土壌への添加により、植物の成長及び／または代謝に影響を及ぼす、肥料以外の成分である。植物用生物刺激剤には、非限定的に、ホルモン含有産物、アミノ酸含有産物、フミン酸含有産物を含む。例示的な植物用生物刺激剤には、海藻抽出物、フミン酸、アミノ酸、サリチル酸、生物固体、加水分解したタンパク質、ケイ酸塩、及び／または合成化合物に基づいた組成物を含む。植物用生物刺激剤は、成長率を増加させ、有害植物の成長を抑え、ストレス耐性を増加させ、光合成速度を速め、及び耐病性を高めるために、商業的環境で、部分的に作物を処理するために使用されている。植物用生物刺激剤が、植物にそれらの影響を及ぼす詳細な機構は明らかではないが、1つの仮説は、それら製剤が、植物ホルモンを上方調製または下方調製する、というものである。

30

**【0005】**

農業用組成物及びその使用方法における進歩はあるものの、植物用生物刺激に効力を発する、すなわち、化学物質の使用を減らしながら、植物の成長反応及び発達を改善する組成物及びその使用方法の必要性が残されている。本明細書に開示の方法及び組成物は、これらの及びその他の要求に取り組むものである。

40

**【発明の概要】****【0006】**

本明細書の開示に従って、具体的に及び幅広く記述される、1つの態様における開示は、植物用生物刺激剤に対応した組成物及びその使用方法に関する。多様な態様において、本明細書の開示は、微生物の混合体を含む、微生物培養体の無細胞上清を含有する組成物であり、1つ以上の細菌類、真菌類、藻類、及び／または微生物を含んで良い。本開示の

50

方法には、植物の成長を促すための、本明細書に開示の組成物の使用を含む。

**【0007】**

本開示は、単離された微生物で植菌された、微生物培養体の無細胞上清を含む組成物であり、ここでその微生物が、*Aspergillus spp.*, *Bacillus spp.*, *Rhodopseudomonas spp.*, *Candida spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Saccharomyces spp.*, または*Streptococcus spp.*もしくはそれらの組み合わせの1つ以上を含む。

**【0008】**

本開示はまた、本開示の無細胞上清の組成物を、種子に、植物に、または特定の成長段階で植物に、もしくはそれらの組み合わせで与え、その結果、植物の成長を促すことを含んで、植物の成長を促す方法である。成長は、本明細書に開示の組成物で処理された植物が、その組成物で処理されてない同様の条件下で成長した植物と比べて、改善したなどの異なった成長特徴を有する場合に、増進されている。

10

**【0009】**

本開示はまた、物品の表面に、本開示の無細胞上清を与えること含んで、無細胞上清を含む物品を製造する方法である。

**【0010】**

本開示はまた、(a)発酵培養液を、単離された微生物の1つ以上で植菌すること、ここで、その微生物は、*Aspergillus spp.*, *Bacillus spp.*, *Rhodopseudomonas spp.*, *Candida spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Saccharomyces spp.*、または*Streptococcus spp.*もしくはそれらの組み合わせを含み、(b)その植菌された発酵培養液を、少なくとも5時間培養すること、及び(c)ステップ(b)の後で、10,000×gの遠心力で、少なくとも10分間の遠心分離を行い、その結果、当該無細胞上清を与えることのステップを含む、無細胞上清組成物の調合のための方法である。

20

**【0011】**

本開示はまた、開示された方法によって調合された、無細胞上清組成物である。

30

**【0012】**

本開示の態様は、体系的な法定分類などの、特定の法定分類において記述され及び請求され得る一方で、これは利便性だけの目的であり、及び本開示の各態様は、任意の法定分類において記述され及び請求され得ることは、当業者には理解されよう。特に明示しない限り、本明細書に示される任意の方法または態様は、そのステップが、特定の順序で実施されるべきとの要請により構築されねばならないと、一切意図するものではない。したがって、方法の請求が、その請求項で、またはそのステップが、特定の順序に限定されているとの記述で、特に明示しない場合、任意の態様において、1つの順序が推奨されるべきと、一切意図するものではない。この点は、ステップまたは運用順序の配置に関するロジックについての事柄、文法構成または句読点から派生した単純な意味、本明細書に記載の態様の番号または種類を含む、可能ないかなる不明瞭な解釈に対しても保持される。

40

**【0013】**

本明細書に組み込まれ及びその一部を構成する添付図面は、本開示の原理を説明するのに役立つ記述を伴って、複数の態様を解説する。

**【図面の簡単な説明】**

**【0014】**

【図1】図1A及び図1Bは、発芽における、開示された組成物の影響に関する代表的なデータを示す。図1Aは、蒸留水で処理した対照種子と比べた、発芽刺激におけるパーセント差で、無細胞上清(CFS)IN-M1のバッチEA100510の濃度の影響を示す。図1Bは、長期の効果対時間で当該CFSの希釈を表す、図1Aの再プロットデータを示す。

50

【図2】図2A及び図2Bは、発芽における、開示された組成物の影響に関する代表的なデータを示す。図2Aは、蒸留水で処理した対照種子と比べた、発芽刺激におけるパーセント差で、IN-M1のバッチEA110310培養液の濃度の影響を示す。図2Bは、長期の効果対時間で当該CFSの希釈を表す、図2Aの再プロットデータを示す。

【図3】図3A及び3Bは、非生物的ストレス条件下で実施された、発芽における開示された組成物の影響に関する代表的なデータを示す。種子は、非生物的ストレス条件下で、100mMのNaClに曝露されている。図3Aは、蒸留水で処理した対照種子と比べた、発芽刺激におけるパーセント差で、IN-M1のバッチEA110310培養液の濃度の影響を示す。各グループの棒グラフ表示下部の数字は、発芽が決定された時間を示す。図3Bは、長期の効果対時間で当該CFSの希釈を表す、図3Aの再プロットデータを示す。

【図4】図4は、経過時間ゼロでの、IN-M1(A)及びIN-M2(B)に存在する細菌群集の主成分分析に関する代表的なデータを示す。

【図5】図5は、経過時間ゼロでの、IN-M1(A)及びIN-M2(B)に存在する細菌群集の最大強度プロファイルに関する代表的なデータを示す。

【図6】図6は、経過時間ゼロでの、IN-M1(A)及びIN-M2(B)に存在する真菌群集の最大強度プロファイルに関する代表的なデータを示す。

【図7】図7は、増殖1か月後での、IN-M1(A)及びIN-M2(B)に存在する細菌群集の主成分分析に関する代表的なデータを示す。各バッチを、4、25、-80(対照)、及び室温で保管した。

【図8】図8は、4、25、-80(対照)、及び室温で増殖1か月後での、IN-M1(A)に存在する細菌群集の最大強度プロファイルに関する代表的なデータを示す。

【図9】図9は、4、25、-80(対照)、及び室温で増殖1か月後での、IN-M2(B)に存在する細菌群集の最大強度プロファイルに関する代表的なデータを示す。

【図10】図10は、4、25、-80(対照)、及び室温で増殖1か月後での、IN-M1(A)に存在する真菌群集の最大強度プロファイルに関する代表的なデータを示す。

【図11】図11は、4、25、-80(対照)、及び室温で増殖1か月後での、IN-M2(B)に存在する真菌群集の最大強度プロファイルに関する代表的なデータを示す。

【図12】図12は、植物成長及び葉量の視覚的な測定法として使用した、ルッコラの成長力尺度に関する代表的なデータを示す。

【図13】図13は、試験1で、IN-M1(A)及びIN-M2(B)で処理されたルッコラの成長力(13A)、植物数(13B)、クロロフィル含有量(13C)、新芽の乾燥重量(13D)、根の乾物重量(13E)、及び植物の高さ(16F)に関する代表的なデータを示す。

【図14】図14は、試験2で、IN-M1(A)及びIN-M2(B)で処理されたルッコラの成長力(14A)、植物数(14B)、クロロフィル含有量(14C)、新芽の乾燥重量(14D)、根の乾物重量(14E)、及び植物の高さ(14F)に関する代表的なデータを示す。

【図15】図15は、2時点で採取したサンプルの、経過時間ゼロでのIN-M1(A)及びIN-M2(B)に存在する細菌群集の主成分分析に関する代表的なデータを示す。

【図16】図16は、2時点で採取したサンプルの、経過時間ゼロでのIN-M1(A)及びIN-M2(B)に存在する細菌群集の最大強度プロファイルに関する代表的なデータを示す。

【図17】図17は、経過時間ゼロでの、IN-M1(A)及びIN-M2(B)に存在する真菌群集の主成分分析に関する代表的なデータを示す。

【図18】図18は、ITS1-Fを使用した、IN-M1(A)及びIN-M2(B)

10

20

30

40

50

に存在する真菌群集の最大強度プロファイルに関する代表的なデータを示す。

【図19】図19は、最適条件下での大豆種子の発芽における、多様に希釈した微生物を含まない液体産物の影響に関する代表的なデータを示す。

【図20】図20は、塩分を含むストレス条件下での大豆種子の発芽における、多様に希釈した微生物を含まない液体産物の影響に関する代表的なデータを示す。

【図21】図21は、最適条件下での大豆種子の発芽における、多様に希釈したIN-M1の影響に関する代表的なデータを示す。

【図22】図22は、塩分を含むストレス条件下での大豆種子の発芽における、多様に希釈したIN-M1の影響に関する代表的なデータを示す。

【図23】図23は、標準的な庭園土壤で育ったAgrostide(ベントグラス)における、IN-M1の影響に関する代表的なデータを示す。 10

【図24】図24は、その土壤に混ぜた有機物の追加施肥を伴った、標準的な庭園土壤で育ったAgrostide(ベントグラス)における、IN-M1の影響に関する代表的なデータを示す。

【図25】図25は、標準的な庭園土壤で育ったPoa parturinにおける、IN-M1の影響に関する代表的なデータを示す。

【図26】図26は、播種後40日目のSwiss Chard(不斷草)における、IN-M1の影響に関する代表的な写真を示す。

【図27】図27は、イチゴ植物の代表的なクロロフィル含有量を示す。棒グラフ及び誤差バーは、クロロフィルの、平均及び標準偏差の各々を示す。 20

【図27】図27は、イチゴ植物の代表的なクロロフィル含有量を示す。このデータは、実施例で記述されるように、対照植物と比較した、IN-M1無細胞上清で処理したイチゴ植物から得た。棒グラフ及び誤差バーは、クロロフィルの、平均及び標準偏差の各々を示す。

【図28】図28A及び28Bは、実施例で記述されるように、対照植物と比較した、IN-M1無細胞上清で処理したイチゴ植物に対する、葉の高さ及び葉の幅を代表的に示す。棒グラフ及び誤差バーは、その葉の高さ及び幅の、平均及び標準偏差の各々を示す。<sup>\*</sup>  
<sup>\*\*\* = 99.99%</sup>の信頼性で統計的に有意( $P < 0.0001$ )。

【図29】図29は、植栽後11週から19週での、イチゴ植物の果実収穫量に対する代表的なデータである。このデータは、実施例で記述されるように、対照植物と比較した、IN-M1無細胞上清で処理したイチゴ植物に対して示されている。この収穫量データは、11週の間に開始して2日毎に収穫された果実の、1日当たり収穫量を示している。 30

【図30】図30は、実施例で記述されるように、対照植物と比較した、IN-M1無細胞上清で処理したイチゴ植物における、総果実収穫量に対する代表的なデータを示す。

【図31】図31は、対照植物と比較した、IN-M1無細胞上清で処理したトウモロコシ植物における、葉の成長発達に対応した野外試験からの代表的なデータを示す。

【図32】図32A～32Eは、発芽における、開示された組成物の影響に関する代表的なデータを示す。その種子の種類は、各グラフの上部に記述されている。「A」は、IN-M1無細胞上清を示し、及び「B」は、IN-M2無細胞上清を示す。当該無細胞上清の希釈は、各棒グラフの下に記述されている。 40

【図33】図33A～33Dは、発芽における、開示された組成物の影響に関する代表的なデータを示す。その種子の種類は、各グラフの上部に記述されている。「A」は、IN-M1無細胞上清を示し、及び「B」は、IN-M2無細胞上清を示す。当該無細胞上清の希釈は、各棒グラフの下に記述されている。

#### 【0015】

本開示のさらなる利点は、以下の記述の一部に説明され、及びその部分において、その記述から明白になるであろうし、または本開示の実践によって習得が可能である。本開示の利点は、付帯の請求項において特に指摘される要素及びその組み合わせの手段によって、実現され及び達成されるであろう。前述の一般的な記述及び以降の詳細な記述は、例示及び説明だけを目的としており、及び請求されるとして、本開示を制約しない、こと 50

は理解されよう。

**【発明を実施するための形態】**

**【0016】**

本開示は、この開示の以下の詳細記述及びそこに含まれる実施例を参照することによって、より容易に理解され得る。ここに開示するものと類似のまたは同等の任意の方法及び物質が、本開示の実践または試験に使用できるが、例示的な方法及び物質をここに記述する。

**【0017】**

本明細書に使用する用語は、特定の態様を記述する目的だけのためであり、及び限定することを意図してはいない。本明細書において及び以下の請求項において、以下の意味を有すると定められるべき多数の用語に対して、参照が用いられよう。

10

**【0018】**

本明細書及び付帯の請求項に使用される、単数形「a」、「an」、及び「the」には、その文脈が明確に指示しない限り、複数参照を含む。したがって、例えば、「農学的に許容されるキャリアー」の参照は、2つ以上のそのようなキャリアーなどの混合物を含む。

**【0019】**

本明細書で使用する用語「or（または）」は、特定の一覧の任意の1構成要素を意味し、及びまたその一覧の構成要素の組み合わせを含む。

20

**【0020】**

範囲は、「about（約）」な1つの特定値から、及び／または「about（約）」な他の特定値までとして表すことができる。そのような範囲が表明される場合、他の態様には、その1つの特定値から及び／またはその他の特定値までを含む。同様に、値が、おおまかに表明される場合、先行詞「about（約）」の使用によって、その特定の値が、他の態様を形成すると理解されよう。当該範囲の各終点が、その他の終点との関係において両者とも、及びその他の終点が独立しても重要であることを、さらに理解されよう。本明細書に開示される多数の値があり、及び各値はまた、それ自身の値に加えて、「about（約）」のその特定値として、ここに開示されることも理解されよう。例えば、仮にある値「10」が開示される場合、次いで「about（約）10」もまた開示される。当業者には適切に理解されることだが、1つの値が、その値に対して「less than or equal to（下回るかまたは等しい）」として開示される場合、「greater than or equal to the value（その値に対して上回るかまたは等しい）」及び値の間に存在可能な範囲もまた開示される、ことは理解されよう。例えば、仮にある値「10」が開示される場合、「less than or equal to 10（10を下回るかまたは等しい）」と共に、「greater than or equal to 10（10を上回るかまたは等しい）」も開示される。本出願の全体を通して、データが、多数の異なる形式で提供され、及びそのデータが終点ならびに開始点を表し、及びそのデータ点の任意の組み合わせに対応した範囲を有する、ことは理解されよう。例えば、特定のデータ点「10」及び特定のデータ点15が開示される場合、10及び15に対して、上回った、上回るかまたは等しい、下回った、下回るかまたは等しい、及び等しい値が、10から15の間に同様に開示されると考えられる、ことは理解されよう。2つの特定単位の間の各単位もまた開示される、ことは理解されよう。例えば、10及び15が開示される場合、次いで11、12、13、及び14もまた開示される。

30

**【0021】**

「Optional（選択的な）」または「optionally（選択的に）」は、その後に記述される事象または環境が、起きても起きなくても良いことを意味し、及びその記述には、その事象または環境が起きる事例及び起きない事例を含む、ことを意味する。

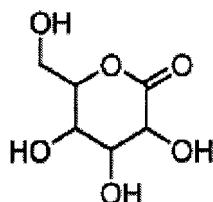
40

**【0022】**

50

本明細書で使用する用語「gluconolactone(s)」(グルコノラクトン(複数可))は、以下のグルコノラクトン構造のすべての異性体、溶媒和物、水和物、多形性形態、結晶性形態、非結晶形態、及び塩変異体を含むことを意図している。

【化1】



10

【0023】

本明細書で使用する用語「isomer(s)」(異性体(複数可))には、特に明示しない限り、すべての配座異性体、回転異性体、及び互変異性体と共に、光学異性体、ジアステレオマーを含む、本明細書で参照する化合物及び/または分子のすべての立体異性体(例えば、グルコノラクトン、LCOs、COs、キチン質化合物、フラボノイド、ジャスモン酸またはその誘導体、リノール酸またはその誘導体、リノレン酸またはその誘導体、ケリキン(kerrikins)など)を含むことを意図している。本明細書に開示の化合物及び/または分子には、実質的に純粹に左旋性または右旋性形態における、またはラセミ混合物における、もしくは光学異性体の任意の割合でのいずれかにおける光学異性体を含む。態様が(D)-光学異性体を開示する際は、その態様は、(L)-光学異性体をも開示し、態様が(L)-光学異性体を開示する際は、その態様は、(D)-光学異性体をも開示し、態様が(+)-光学異性体を開示する際は、その態様は、(-)-光学異性体をも開示し、態様が(-)-光学異性体を開示する際は、その態様は、(+)-光学異性体をも開示し、態様が(S)-光学異性体を開示する際は、その態様は、(R)-光学異性体をも開示し、態様が(R)-光学異性体を開示する際は、その態様は、(S)-光学異性体をも開示する。態様は、ジアステレオマー的に純粹な形態で、及び全ての割合での混合物の形態で、本明細書で参照する化合物及び/または分子の任意の光学異性体を含むことを意図している。立体化学が、化学構造または化学名に明確に示されない限り、その化学構造または化学名は、示された化合物及び/または分子の、可能な全ての立体異性体、配座異性体、回転異性体、及び互変異性体を包含することを意図している。

20

30

【0024】

本明細書で使用する用語「effective amount(効果的な量)」、「effective concentration(効果的な濃度)」、または「effective dosage(効果的な用量)」は、増進された植物成長を引き起こす、生物刺激組成物の量、濃度、または用量を意味することを意図している。絶対値としての実際に効果的な用量は、非限定的に、その生物刺激組成物を伴って適用される、土地のサイズ(例えば、その場所、その総面積など)を含む要因に依存している。生物刺激組成物の「effective amount(効果的な量)」、「effective concentration(効果的な濃度)」、または「effective dosage(効果的な用量)」は、例えば、所定の用量応答実験によって決定されて良い。

40

【0025】

本明細書で使用する用語「carrier(キャリアー)」は、「agronomically acceptable carrier(農学的に許容されるキャリアー)」を含むことを意図している。「agronomically acceptable carrier(農学的に許容されるキャリアー)」は、単独でまたは植物、植物の一部分(例えば、種子)、もしくは土壤に対して、1つ以上の農学的に有益な成分(複数可)、及び/または生物学的に活性な成分(複数可)などの組み合わせで、本明細書に記述の生物刺激組成物を送達するために使用でき、及び望ましくはキャリアーが、植物の成長、土壤構造、土壤の排水などに悪影響を与えることがなく(植物、植物の一部分(例えば、

50

種子)、もしくは土壤に)追加できる、任意の物質を指すことを意図している。

【0026】

本明細書で使用する用語「seed-compatible carrier(種子と相性の良いキャリアー)」は、その種子、その種子から成長する植物、種子の発芽などに悪影響を引き起こす/与えることがなく、種子に添加または適用できる、単独でまたは1つ以上の農学的に有益な成分(複数可)、及び/または生物学的に活性な成分(複数可)などとの組み合わせで、本明細書に記述の生物刺激組成物を送達するために使用できる任意の物質を指すことを意図している。

【0027】

本明細書で使用する用語「soil-compatible carrier(土壤と相性の良いキャリアー)」は、植物の成長、土壤構造、土壤の排水などに悪影響を与えることがなく、土壤に添加または適用できる、単独でまたは1つ以上の農学的に有益な成分(複数可)、及び/または生物学的に活性な成分(複数可)などとの組み合わせで、本明細書に記述の生物刺激組成物を送達するために使用できる任意の物質を指すことを意図している。

10

【0028】

本明細書で使用する用語「foliar-compatible carrier(葉面と相性の良いキャリアー)」は、その植物、植物の一部、植物の成長、植物の健康などに悪影響を引き起こす/与えることがなく、植物または植物の一部に添加できる、単独でまたは1つ以上の農学的に有益な成分(複数可)、及び/または生物学的に活性な成分(複数可)などとの組み合わせで、本明細書に記述の生物刺激組成物を送達するために使用できる任意の物質を指すことを意図している。

20

【0029】

本明細書で使用する用語「micronutrient(s)(微量栄養素(複数可))」は、植物の成長、植物の健康、及び/または植物の発達に有益な栄養素を指すことを意図している。

【0030】

本明細書で使用する用語「herbicide(s)(除草剤(複数可))」は、雑草及び/または雑草の成長を阻害する(特定の条件下では逆阻害的になる)などの、植物を枯らすことができる任意の薬剤または薬剤の組み合わせを指すことを意図している。

30

【0031】

本明細書で使用する用語「fungicide(s)(殺真菌剤(複数可))」は、殺真菌及び/または真菌類の増殖を阻害することができる任意の薬剤または薬剤の組み合わせを指すことを意図している。

【0032】

本明細書で使用する用語「insecticide(s)(殺虫剤(複数可))」は、1匹以上の虫を殺し及び/または1匹以上の虫の増殖を阻害することができる任意の薬剤または薬剤の組み合わせを指すことを意図している。

【0033】

本明細書で使用する用語「agriculturally beneficial ingredient(s)(農学的に有益な成分(複数可))」は、植物の成長、生産、土壤、水、及び一般の農業に有益な及び/または有用な効果を引き起こすもしくは与えることができる、任意の薬剤または薬剤の組み合わせを意味することを意図している。

40

【0034】

本明細書で使用する用語「biologically active ingredient(生物学的に活性な成分)」は、本明細書に記述の1つ以上の細菌単離株以外の、生物学的に活性な成分(例えば、シグナル分子、その他の微生物など)を意味することを意図している。

【0035】

本明細書で使用する用語「determining(決定すること)」は、活性の数量

50

または量もしくは変化を測定した時は把握することを指すことができる。例えば、本明細書で使用する微生物または増殖させた培養体の特徴を決定することは、当業者が、サンプルにおけるある定量値を測定または把握する行為を取るステップを指すことができる。当業者は、サンプルにおける特徴を測定する方法に精通している。用語のサンプルは、多量の溶液から、部位から、培養体からの一部分、または、一部分としてのサンプルを、取り出せる及び選択的に作用させ得るものからのその他の大部分、の一般的な意味として使用する。

#### 【0036】

本明細書で使用する用語「*biosimulation*（生物刺激）」は、植物及び／または土壤内での代謝及び／または生理学的なプロセスの増進を指す。特定の文脈において、生物刺激は、植物、例えば、生物刺激剤が適用された植物の成長を刺激するプロセスを指す。10

#### 【0037】

本明細書で使用する用語「*biosimulant(s)*（生物刺激剤（複数可））」は、植物及び／または土壤内で、代謝または生理学的なプロセスを増進できる任意の組成物を指す。特に明示しない限り、生物刺激剤には、単一成分または複数の異なる成分の組み合わせを含んで良く、及びその増進された代謝及び／または生理学的なプロセスは、1つ以上の成分の、独立したまたは組み合わせた作用のいずれかでの結果であって良い。

#### 【0038】

本明細書で使用する用語「*environment*（環境）」は、その刺激によって定義される場所であり、及び生物的ならびに非生物的要素、及びその定義された場所に見出せる、生物的要素の間の、ならびに生物的及び非生物的要素の間の相互関係のパターンを含む。3つの物理状態である土壤、液体及び気体のすべては、その環境を構成する要素に含まれる。20

#### 【0039】

本明細書で使用する用語「*microorganism*（微生物）」には、非限定的に、細菌、ウイルス、真菌、藻、酵母、原生動物、ワーム、スピロヘータ、原核生物、真核生物、古細菌、または細菌として分類スキーマに含まれる単細胞及び多細胞生物、ならびに当業者に公知のものを含む。

#### 【0040】

本明細書で使用する用語「*enhanced plant growth*（増進された植物成長）」は、増加した植物収穫量（例えば、1エーカー当たりのブッシュルなど、通常使用される農業計測によって測られる、増加したバイオマス、増加した果実数量、またはそれらの組み合わせ）、増加した根の数、増加した根の量、増加した根の容積、増加した葉面積、増加した植物群生、増加した植物の成長力、またはそれらの組み合わせを指すことを意図している。30

#### 【0041】

本明細書で使用する用語「*plant(s)*（植物（複数可））」及び「*plant part(s)*（植物の一部（複数可））」は、望ましい及び望ましくない野生植物または作物（自然発生する作物を含む）などの、すべての植物及び植物群を指すことを意図している。作物は、従来からの植物育種及び最適な方法によって、またはバイオテクノロジー及び遺伝子工学的な方法、もしくはそれら方法の組み合わせによって取得される植物であり得て、遺伝子組換え植物を含み、及び植物育種者の権利によって保護または保護されない植物品種を含む。植物の一部は、種子、新芽、葉、花及び根や、葉、針、茎、葉柄、花、子実体、果物、種子、根、塊茎及び地下茎の可能性があると記載される例示などの、地面の上下にある植物の全ての部分及び器官を意味すると理解される。植物の一部にはまた、収穫物及び発育性ならびに生殖性の繁殖植物（例えば、挿し木、塊茎、根茎、横枝及び種子など）を含む。40

#### 【0042】

本明細書で使用する用語「*microorganism*（微生物）」または「*micr*

10

20

30

40

50

**o b i a l (微生物の)**」には、実験室で繁殖させ及び操作できる、任意の一般的な单細胞生物を含める。本開示において、当該用語は、好ましくは細菌及び／または酵母及び／または真菌類に関する。本開示において、用語の微生物は、一般的に、生きている微生物、すなわち、繁殖力がある及び／または代謝活性を持つ微生物を意味する。

#### 【0043】

本明細書で使用する用語「**s t r a i n (株)**」は、一般にそのサンプル種の有機物の閉鎖集団を指す。したがって、用語「**s t r a i n o f l a c t i c a c i d b a c t e r i a (乳酸菌の株)**」は、一般に乳酸菌の種菌を指す。より特定には、用語「**s t r a i n (株)**」は、微生物種の構成体を指し、ここで、そのような構成体、すなわち株は、異なる遺伝子型及び／または表現型を有する。ここで、用語「**g e n o t y p e (遺伝子型)**」には、微生物のゲノム及び組換えの両DNA内容物を包含する。ここで、用語「**p h e n o t y p e (表現型)**」は、微生物の遺伝子組成に依存する、観察可能な物理的特徴を指す。当業者が認識するように、したがって、微生物株は、普通の遺伝子型及び／または表現型を有する個々の微生物細胞から構成されている。さらに、個々の微生物細胞は、特定の株に属するとして、それらを特定する、特異的な特徴（例えば、特異的な**r e p - P C R**パターン）を有して良い。微生物株は、1つ以上の微生物の単離株を含むことができる。

10

#### 【0044】

本明細書で使用する用語「**i n o c u l u m (植菌)**」は、培養培地で繁殖が可能な、微生物細胞、または胞子の任意の形態を意味することを意図している。

20

#### 【0045】

用語「**m i c r o b i a l c o m p o s i t i o n o r c u l t u r e (微生物組成物または培養体)**」は、本明細書に開示され、及び開示された方法で使用される、微生物の組成物を指すことを意図している。微生物培養体または微生物組成物は、培養培地に本明細書で開示される微生物を植菌し、及び例えれば、決められた期間で、その微生物の成長、繁殖を可能にすることによって作られる。本明細書で開示され及び請求される無細胞上清は、微生物培養体または微生物組成物から、その微生物を除去することにより、その結果作られる。

#### 【0046】

本明細書で使用する用語「**i s o l a t e (単離体)**」は、初期単離プレートから取得した單一コロニーを、培養で増殖させた微生物を指す。単離体は、单一微生物から誘導されると推測される。

30

#### 【0047】

本明細書で使用する、微生物に適用される用語「**i s o l a t e d (単離された)**」は、それが自然発生する環境から取り出され及び／または精製された微生物を指す。そのような、本明細書で使用する微生物の「**i s o l a t e d s t r a i n (単離株)**」は、その自然環境から取り出され及び／または精製された株を指す。したがって、「**i s o l a t e d m i c r o o r g a n i s m (単離された微生物)**」には、その自然発生した環境に残っている物を含まない。さらに、用語「**i s o l a t e d (単離された)**」は、その微生物が精錐された程度を反映する必要はない。通常自然には見出されない、他の株、または化合物もしくは物質と関連する株はさらに、「**i s o l a t e d (単離された)**」として定義される、ことに留意のこと。

40

#### 【0048】

本明細書で使用する用語「**s u b s t a n t i a l l y p u r e c u l t u r e (実質的に純粋な培養体)**」は、望ましい株または微生物株以外の微生物を実質的に含まない、株または培養体を指す。換言すると、微生物株の実質的に純粋な培養体は、望ましくない微生物の不純物質と共に化学的な不純物質を含んだその他の汚染物質を、実質的に含んでいない。

#### 【0049】

本明細書で使用する用語「**b i o l o g i c a l l y p u r e c u l t u r e (生**

50

生物学的に純粹な培養体)」は、生物学的な汚染物質を本質的に含まず、及びそこから取得した異なる二次培養体が、実質的に同一の遺伝子型及び表現型を現すような、遺伝的均一性を有する培養体を意味することを意図している(例えば、培養体が、少なくとも60%の、少なくとも65%の、少なくとも70%の、少なくとも75%の、少なくとも80%の、少なくとも85%の、少なくとも90%の、少なくとも91%の、少なくとも92%の、少なくとも93%の、少なくとも94%の、少なくとも95%の、少なくとも96%の、少なくとも97%の、少なくとも98%の、少なくとも99%の、100%までの純度を有する)。さらに、本明細書で使用する「biological pure(生物学的に純粹)」は、通常自然界に関連する物質から分離された株を意味することを意図している。

10

#### 【0050】

本明細書で使用する「culture medium(培養培地)」は、微生物細胞の増殖を助ける混合物として定義され、その混合物には、非限定的に、炭水化物または細胞のエネルギー源、アミノ酸源、ペプトン、大豆ペプトン、及び酵母抽出物パウダーなどの成分を含んで良い。当該培地の特徴は、本開示の単離された微生物の増殖を助けるその能力である。

#### 【0051】

本出願を通して、多様な出版物が参照される。これら出版物のその全体における開示を、本出願が関連する技術分野の状況をより完全に記述するために、本出願に参照として組み入れる。開示される参照をまた、その参照される文章で考察される、そこに含まれる内容に対応して、個別に及び特異的に本明細書に組み入れる。本明細書で考察される出版物は、本出願の提出日に先立つそれらの開示に対してのみ、提供される。そのような出版物が事前に開示されていたという事実によって、本開示が、それに先行する権利がないことの承認として、本明細書が解釈されるべきではない。さらに、本明細書に与えられた公開日は、実際の公開日とは異なる可能性があり、個別の確認が必要になる可能性がある。

20

#### 【0052】

##### 組成物

1つの態様において、無細胞上清組成物として本明細書で参照される、開示の組成物は、単離された微生物の1つ以上で植菌された微生物培養体の無細胞上清を含み、ここでその微生物には、*Aspergillus spp.*、*Bacillus spp.*、*Rhodopseudomonas spp.*、*Candida spp.*、*Lactobacillus spp.*、*Lactococcus spp.*、*Pseudomonas spp.*、*Saccharomyces spp.*または*Streptococcus spp.*もしくはそれらの組み合わせを含む。1つの態様において、無細胞上清組成物は、開示される方法によって調合される。

30

#### 【0053】

1つ以上の単離された微生物で植菌された微生物培養体の無細胞上清を含む組成物において、ここでその微生物には、*Aspergillus spp.*、*Bacillus spp.*、*Rhodopseudomonas spp.*、*Candida spp.*、*Lactobacillus spp.*、*Lactococcus spp.*、*Pseudomonas spp.*、*Saccharomyces spp.*または*Streptococcus spp.*もしくはそれらの組み合わせを含む。微生物培養体の無細胞上清を含む組成物であって、ATCC特許寄託指定番号PTA-12383の、混合培養物IN-M1で植菌されている。微生物培養体の無細胞上清を含む組成物であって、IN-M2の指定を伴い、顧客番号200139の下、ATCC特許寄託指定番号PTA-121556で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下のATCC特許寄託により寄託された、混合培養物のIN-M2で植菌されている。本明細書に開示された組成物であって、当該無細胞上清がフィルター滅菌されている。開示された無細胞上清組成物であって、除草剤をさらに含む。開示された無細胞上清組成物であって、殺虫剤をさらに含む。開示された無細胞上清組成物であって、殺真菌剤をさらに含む。開示された無細胞上清組成物

40

50

であって、栄養溶液をさらに含む。IN-M1及び/またはIN-M2を含む無細胞上清組成物であって、除草剤、殺虫剤、殺真菌剤、栄養溶液またはそれらの組み合わせをさらに含む。

#### 【0054】

微生物培養体由来の開示された無細胞上清組成物であって、ここで当該*Aspergillus* spp. が、*Aspergillus oryzae* であり、またはここで当該*Aspergillus* spp. が、*Aspergillus oryzae* の、IN-AO1の指定を伴い、顧客番号200139の下、ATCC特許寄託指定番号PTA-121551で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下のATCC特許寄託により寄託された、IN-AO1である。微生物培養体由来の開示された無細胞上清組成物であって、ここで当該*Bacillus* spp. が、*Bacillus subtilis* であり、またはここで当該*Bacillus* spp. が、*Bacillus subtilis* の、ATCC特許寄託指定番号PTA-12385の、IN-BS1である。微生物培養体由来の開示された無細胞上清組成物であって、ここで当該*Rhodopseudomonas* spp. が、*Rhodopseudomonas palustris* であり、またはここで当該*Rhodopseudomonas* spp. が、*Rhodopseudomonas palustris* の、受入番号PTA-12387の、IN-RP1である。微生物培養体由来の開示された無細胞上清組成物であって、ここで当該*Candida* spp. が、*Candida utilis* であり、またはここで当該*Candida* spp. が、*Candida utilis* の、IN-CU1の指定を伴い、顧客番号200139の下、ATCC特許寄託指定番号PTA-121550で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下のATCC特許寄託により寄託された、IN-CU1である。微生物培養体由来の開示された無細胞上清組成物であって、ここで当該*Lactobacillus* spp. が、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus helveticus*、*Lactobacillus lactis*、*Lactobacillus rhamnosus*、または*Lactobacillus plantarum*、もしくはそれらの組み合わせである。微生物培養体由来の開示された無細胞上清組成物であって、ここで当該*Lactobacillus* spp. が、*Lactobacillus helveticus* の、ATCC特許寄託指定番号PTA-12386の、IN-LH1である。微生物培養体由来の開示された無細胞上清組成物であって、ここで当該*Lactobacillus* spp. が、*Lactobacillus casei* であり、本明細書ではIN-LC1と呼ばれ、IN-LC1の指定を伴い、顧客番号200139の下、ATCC特許寄託指定番号PTA-121549で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下のATCC特許寄託により寄託された。微生物培養体由来の開示された無細胞上清組成物であって、ここで当該*Lactobacillus* spp. が、*Lactobacillus lactis* であり、本明細書ではIN-LL1と呼ばれ、IN-LL1の指定を伴い、顧客番号200139の下、ATCC特許寄託指定番号PTA-121552で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下のATCC特許寄託により寄託された。微生物培養体由来の開示された無細胞上清組成物であって、ここで当該*Lactobacillus* spp. が、*Lactobacillus plantarum* であり、IN-LP1の指定を伴い、顧客番号200139の下、ATCC特許寄託指定番号PTA-121555で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下のATCC特許寄託により寄託された、IN-LP1である。微生物培養体由来の開示された無細胞上清組成物であって、ここで当該*Lactobacillus* spp. が、*Lactobacillus rhamnosus* であり、IN-LR1の指定を伴い、顧客番号200139の下、ATCC特許寄託指定番号PTA-121554で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下のATCC特許寄託により寄託された、IN-LR1である。微生物培養体由来の開示された無細胞上清組成物であって、ここで当該*Pseudomonas* spp. が、*Pseudomonas aeruginosa* である。微生物培養体由来の開示された無細胞上清組成物であって、ここ

10

20

30

40

50

で当該 *Rhodopseudomonas* spp. が、*Rhodopseudomonas palustris* である。微生物培養体由来の開示された無細胞上清組成物であって、ここで当該 *Rhodopseudomonas* spp. が、*Rhodopseudomonas palustris* であり、ATCC特許寄託指定番号PTA-12383の、IN-RP1である。微生物培養体由来の開示された無細胞上清組成物であって、ここで当該 *Rhodopseudomonas* spp. が、*Rhodopseudomonas palustris* であり、IN-RP2の指定を伴い、顧客番号200139の下、ATCC特許寄託指定番号PTA-121553で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下のATCC特許寄託により寄託された、IN-RP2である。微生物培養体由来の開示された無細胞上清組成物であって、ここで当該 *Saccharomyces* spp. が、*Saccharomyces cerevisiae* である。微生物培養体由来の開示された無細胞上清組成物であって、ここで当該 *Saccharomyces* spp. が、*Saccharomyces cerevisiae* であり、ATCC特許寄託指定番号PTA-12384の、IN-SC1である。微生物培養体由来の開示された無細胞上清組成物であって、ここで当該 *Streptococcus* spp. が、*Streptococcus lactis* である。微生物培養体由来の開示された無細胞上清組成物であって、少なくとも1つの単離された菌根菌をさらに含む。微生物培養体由来の開示された無細胞上清組成物であって、ここでその微生物培養体が、*Aspergillus* spp.、*Bacillus* spp.、*Rhodopseudomonas* spp.、*Candida* spp.、*Lactobacillus* spp.、*Pseudomonas* spp.、*Saccharomyces* spp.、または*Streptococcus* spp. の少なくとも2つで植菌される。微生物培養体由来の開示された無細胞上清組成物であって、ここでその微生物培養体が、*Aspergillus oryzae*、*Bacillus subtilis*、*Lactobacillus helveticus*、*Lactobacillus casei*、*Rhodopseudomonas palustris*、及び*Saccharomyces cerevisiae* で植菌される。

#### 【0055】

1つの態様において、無細胞上清組成物は、フィルター滅菌される。1つの態様において、無細胞上清組成物はさらに、除草剤、殺虫剤、殺真菌剤、液体の栄養成分、または目的植物の成長を助け、もしくは望ましくない植物の成長、昆虫、線虫、または他の植物の害虫を阻害する、その他の化合物または組成物の1つ以上を含んで良い。

#### 【0056】

多様な態様において、無細胞上清組成物は、液体、ゲル、スラリー、固体、または粉末（湿潤粉末または乾燥粉末）の形態であり得る。さらなる態様において、無細胞上清組成物は、種子被覆の形態であり得る。液体、スラリー、または粉末（例えば、湿潤粉末）形態の組成物が、種子の被覆に適切であり得る。種子の被覆に使用する場合、無細胞上清組成物を、種子に適用でき、及び乾燥が可能である。多様な態様において、無細胞上清組成物は、粉末（例えば、湿潤粉末）、水などの液体として処方化でき、種子への適用前にその粉末に添加できる。

#### 【0057】

本明細書に開示の無細胞上清組成物には任意で、1つ以上の本明細書に記述のグルコノラクトン以外に、1つ以上の本明細書に記述の生物学的に活性な成分を含んで良い。生物学的に活性な成分の非限定的な例示には、植物シグナル分子（例えば、脂肪-キトオリゴ糖（LCO）、キトオリゴ糖（CO）、キチン質化合物、フラボノイド、ジャスモン酸またはその誘導体、リノール酸またはその誘導体、リノレン酸またはその誘導体、カリキンなど）、及び1つ以上の有益な微生物（例えば、*Rhizobium* spp.、*Bradyrhizobium* spp.、*Sinorhizobium* spp.、*Azorhizobium* spp.、*Glomus* spp.、*Gigaspora* spp.、*Hymenoscyphus* spp.、*Oidiodendron* spp.、*L*

10

20

30

40

50

*accaria* spp.、*Pisolithus* spp.、*Rhizopogon* spp.、*Scleroderma* spp.、*Rhizoctonia* spp.、*Acinetobacter* spp.、*Arthrobacter* spp.、*Arthrobacter* spp.、*Aspergillus* spp.、*Azospirillum* spp.、*Bacillus* spp.、*Burkholderia* spp.、*Candida* spp.、*Chryseomonas* spp.、*Enterobacter* spp.、*Eupenicillium* spp.、*Exiguobacterium* spp.、*Klebsiella* spp.、*Kluyvera* spp.、*Microbacterium* spp.、*Mucor* spp.、*Paecilomyces* spp.、*Paenibacillus* spp.、*Penicillium* spp.、*Pseudomonas* spp.、*Serratia* spp.、*Stenotrophomonas* spp.、*Streptomyces* spp.、*Streptosporangium* spp.、*Swaminathania* spp.、*Thiobacillus* spp.、*Torulospora* spp.、*Vibrio* spp.、*Xanthobacter* spp.、*Xanthomonas* spp.など)を含む。  
10

#### 【0058】

1つの態様において、無細胞上清組成物には、栄養溶液を含んで良い。本明細書で使用する用語「liquid nutrient solution(栄養溶液)」は、非限定的に、その溶液またはその混合物に、エネルギー源の分子(例えばブドウ糖)、アミノ酸、ビタミン、ミネラル、植物代謝の補因子を含有する栄養素を含む液体を指す。栄養溶液は、添加された栄養素を含んでもまたは含まなくても良い過酸化水素水または曝気水を含んで植物成長を可能にする、任意の液体を含むことを意図している。  
20

#### 【0059】

1つの態様において、無細胞上清組成物は、1つ以上の有益な微量栄養素を含むことができる。本明細書に記述される組成物での使用に対応した、微量栄養素の非限定的な例示には、ビタミン(例えば、ビタミンA、ビタミンB複合体(すなわち、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB5、ビタミンB6、ビタミンB7、ビタミンB8、ビタミンB9、ビタミンB12、コリン)ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンK、カロテノイド(-カロテン、-カロテン、クリプトキサンチン、ルテイン、リコピン、ゼアキサンチンなど)、多量ミネラル(例えば、リン、カルシウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウム、鉄など)、微量ミネラル(例えば、ホウ素、コバルト、塩化物、クロム、銅、フッ化物、ヨウ素、鉄、マンガン、モリブデン、セレン、亜鉛など)、有機酸(例えば、酢酸、クエン酸、乳酸、リンゴ酸、タウリンなど)、及びそれらの組み合わせを含む。1つの態様において、組成物には、リン、ホウ素、塩素、銅、鉄、マンガン、モリブデン、亜鉛、またはそれらの組み合わせを含んで良い。  
30

#### 【0060】

特定の態様において、本明細書に記述の組成物が、リンを含んで良い場合、任意の適切なリンの供給源が与えられて良いと想定される。1つの態様において、当該リンは、供給源に由来して良い。他の態様において、適切なリンの供給源には、1つ以上の微生物(例えば、*Penicillium bilaiiae*)によって可溶化が可能なリン源を含む。1つの態様において、当該リンは、鉱石のリン源由来であって良い。他の態様において、当該リンは、1つ以上のリン源を含む肥料由来であって良い。市販の工業生産されたリン肥料には、多数の種類がある。いくつかの一般的なものは、リン鉱石、リン酸アンモニウム、リン酸二アンモニウム、第一リン酸カルシウム、過リン酸塩、重過リン酸石灰、及び/またはポリリン酸アンモニウムを含むものである。これら肥料のすべては、大規模な肥料製造工場において、不溶性の自然のリン鉱石の化学的加工によって製造され、及びその製品は高価である。本開示によって、その土壤からの同量のリン吸収を維持しながら、土壤に用いるこれら肥料の量を減らすことが可能になる。  
40

#### 【0061】

50

さらに他の態様において、当該リンは、有機物のリン源由来であって良い。さらに特定の態様において、そのリン源には、有機肥料を含んで良い。有機肥料は、少なくとも、いくらかの窒素、リン酸、及び／またはカリを与える、自然源由来の土壤改良剤を指す。有機肥料の非限定的な例示には、植物及び動物の副産物、岩石粉、海藻、乳酸菌、及び調整剤を含む。これらは、多くの場合、園芸用品センター及び園芸用品供給会社を通して入手可能である。リン源は、骨粉、肉びき粉、動物のふん尿、堆肥、下水汚泥、または、糞の堆積物、もしくはそれらの組み合わせからであって良い。

#### 【0062】

1つの態様において、当該リンは、非限定的に、リン鉱石、1つ以上のリン源を含む肥料（例えば、リン酸一アンモニウム、リン酸二アンモニウム、第一リン酸カルシウム、過リン酸塩、重過リン酸石灰、ポリリン酸アンモニウムなど）、1つ以上の有機リン源、及びそれらの組み合わせを含む、リン源の組み合わせ由来で良い。10

#### 【0063】

1つの態様において、無細胞上清組成物には、1つ以上の有益な生物刺激剤を含んで良い。生物刺激剤は、代謝または呼吸、光合成、核酸の摂取量、イオン吸収、栄養の送達、もしくはそれらの組み合わせなどの、生理学的なプロセスを増進させて良い。生物刺激剤の非限定的な例示には、海藻抽出物（例えば、ヒバマタ科の茶色の海藻）、フミン酸（例えば、カリウムフミン酸）、フルボ酸、ミオイノシトール、グリシン、及びそれらの組み合わせを含む。1つの態様において、組成物には、海藻抽出物、フミン酸、フルボ酸、ミオイノシトール、グリシン、またはそれらの組み合わせを含んで良い。20

#### 【0064】

1つの態様において、無細胞上清組成物には、1つ以上の植物のシグナル分子を含んで良い。1つの態様において、その1つ以上の植物シグナル分子は、1つ以上のLCOsである。1つの態様において、当該の1つ以上の植物シグナル分子は、1つ以上のCOSである。1つの態様において、当該の1つ以上の植物シグナル分子は、1つ以上のキチン質化合物である。1つの態様において、当該の1つ以上の植物シグナル分子は、1つ以上のフラボノイドまたはその誘導体である。1つの態様において、当該の1つ以上の植物シグナル分子は、1つ以上の非フラボノイドのnod遺伝子誘導物質（例えば、ジャスモン酸、リノール酸、リノレン酸、及びそれらの誘導体）である。1つの態様において、当該の1つ以上の植物シグナル分子は、1つ以上のカリキンまたはその誘導体である。1つの態様において、当該の1つ以上の植物シグナル分子は、1つ以上のLCOs、1つ以上のCOS、1つ以上のキチン質化合物、1つ以上のフラボノイド及びその誘導体、非フラボノイドのnod遺伝子誘導及びその誘導体、1つ以上のカリキン及びその誘導体、またはそれらの任意のシグナル分子の組み合わせである。30

#### 【0065】

リポ-キトオリゴ糖化合物（LCOs）はまた、共生NodシグナルまたはNod因子として知られ、その非還元末端で凝縮された、N結合の脂肪酸アシル鎖を伴った、I<sub>4</sub>-結合N-アセチル-D-グルコサミン（「GlcNAc」）残基のオリゴ糖骨格から構成される。LCOsは、その骨格のGlcNAc残基数において、その脂肪酸アシル鎖の長さ及び飽和度において、及び還元ならびに非還元の糖残基の置換において異なる。LCOsには、異性体、塩、及び溶媒和物などのすべてのLCOsを含むことを意図している。LOCsは、根粒菌、例えば、Rhizobium spp.、Bradyrhizobium spp.、Sinorhizobium spp. 及びAzorhizobium spp.などの細菌から取得されて（単離及び／または精製されて）良い。LCO構造は、各細菌の種類に対応した特徴があり、及び各株は、異なる構造を持つ複数のLCOsを產生して良い。40

#### 【0066】

Bradyrhizobium japonicumからのLCOsは、米国特許第5,175,149号及び第5,321,011号に記述されている。一般的には、それらは、メチルグルコースを含む五糖類植物ホルモンである。多数のこれらB. japoni

10

20

30

40

50

cum由来のLCOsが、5つのN-アセチルグルコサミンの存在を示す「V」、アセチル化を示す「Ac」、脂肪酸側鎖中の炭素数を示す「C」の後の数値、及び二重結合の数である「:」の後の数値を伴って、BjNod-V(C18:1)、BjNod-V(AC, C18:1)、BjNod-V(C16:1)、BjNod-V(AC, C16:0)などと記述される。

#### 【0067】

本開示の組成物に使用されるLCOsは、Bradyrhizobium(B. japonicumを含む)、Mesorhizobium、Rhizobium(R. leguminosarumを含む)、Sinorhizobium(S. melilotiを含む)の株、及びLCOsを産生するように遺伝子組み換えされた細菌株などの、LCOsを産生する細菌株から取得されて(すなわち、単離及び/または精製されて)良い。  
10

#### 【0068】

また本開示によって包含されるものは、Glomerocycta、例えばGlomus intraradicusの菌群などの、菌根菌から取得された(すなわち、単離及び/または精製された)LCOsを使用した組成物である。これら真菌類から取得された代表的なLCOsの構造は、WO 2010/049751及びWO 2010/049751(当該LCOsは、そこでは、「Myc factors(Myc因子)」とも呼ばれて記述されている)に記述されている。

#### 【0069】

本開示の組成物には、WO 2005/063784に記述されるものなどの合成LCO化合物、及び遺伝子組み換えで生成された組換えLCOsを含んで良い。基本的な、天然LCO構造には、Spaink, Crit. Rev. Plant Sci. 54: 257-288(2000)及びD Haenze, et al., Glycobiology 12: 79R-105R(2002)に記述されるものなどの、天然LCOsに見出される修飾または置換を含んで良い。LCOsの構造に対応したオリゴ糖分子の前駆体(COs、以下に記述され、また本開示における植物シグナル分子として有用である)はまた、例えば、Samain, et al., Carbohydr. Res. 302: 35-42(1997)、Samain, et al., J. Biotechnol. 72: 33-47(1999)に記述される、一般的な有機物の遺伝子組み換えによって合成されて良い。  
20

#### 【0070】

LCOsは、多様な純度の形態で利用されて良く、及び単独でまたはLCO産生の細菌または真菌類の培養形態において使用されて良い。実質的に純粋なLCOsを生成する方法には、LCOsと微生物細胞の混合物からその微生物細胞を取り除くこと、または例えば、米国特許第5,549,718号に記述されるように、LCO溶媒相の分離を通してそのLCO分子を単離及び精製し、それに続くHPLCクロマトグラフィーの追加のステップを含む。精製は、HPLCを繰り返すことによって促進され得て、及びその生成されたLCO分子は、長期保存のために冷凍乾燥することができる。

#### 【0071】

キトオリゴ糖(COs)は、キチンオリゴマーとして特定される-1-4結合N-アセチルグルコサミン構造として、またN-アセチルキトオリゴ糖として当技術分野では公知である。COsは、キチン分子[(C8H13NO5)n、CAS番号1398-61-4]、及びキトサン分子[(C5H11NO4)n、CAS番号9012-76-4]とそれらを差異化する、固有の及び異なる側鎖の装飾を有する。COsの構造及び生成を記述する代表的な文献は、Van der Hoist, et al., Current Opinion in Structural Biology, 11: 608-616(2001)、Robina, et al., Tetrahedron 58: 521-530(2002)、Hanel, et al., Planta 232: 787-806(2010)、Rouge, et al. Chapter 27, "The Molecular Immunology of Complex Carbohydrat  
40  
50

es" in Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer Science, Wan, et al., Plant Cell 21: 1053 - 69 (2009)、PCT/F100/00803 (Sep. 21, 2000)、及び Demont-Caulet, et al., Plant Physiol. 120 (1): 83 - 92 (1999) である。当該 COS は、合成または遺伝子組み換えであって良い。COS の遺伝子組み換え調合の方法は、当技術分野では公知である。例えば、Samaain, et al. (supra.)、Cottaz, et al.、Meth. Eng. 7 (4): 311 - 7 (2005) 及び Samaain, et al.、J. Biotechnol. 72: 33 - 47 (1999) を参照のこと。COS には、異性体、塩、及びそれらの溶媒和物を含むことを意図している。

10

## 【0072】

キチン及びキトサンはまた、真菌類の細胞壁、及び昆虫ならびに甲殻類の外骨格の主成分であるが、GlcNAc 残基から構成される。キチン質化合物には、キチン、(IUPAC: N-5-[3-アセチルアミノ-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)オキサン-2イル]メトキシメチル]-2-[5-アセチルアミノ-4,6-ジヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)オキサン-3-イル]メトキシメチル]-4-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)オキサン-3-イス(y s)エタンアミド)、キトサン、(IUPAC: 5-アミノ-6-[5-アミノ-6-[5-アミノ-4,6-ジヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)オキサン-3-イル]オキシ-4-ヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)オキサン-3-イル]オキシ-2(ヒドロキシメチル)オキサン-3,4-ジオール)、及び異性体、塩、ならびにそれらの溶媒和物を含む。

20

## 【0073】

これらの化合物は、商業的に、例えば、Sigma-Aldrich 社から入手でき、または昆虫、甲殻類の殻、または真菌類の細胞壁から調合されて良い。キチン及びキトサンの調合法は、当技術分野では公知であり、及び例えば、米国特許第 4,536,207 号(甲殻類の殻からの調合)、Pochanavanh, et al., Lett. Appl. Microbiol. 35: 17 - 21 (2002)(真菌類の細胞壁から調合)、及び米国特許第 5,965,545 号(カニの殻からの調合及び商業用キトサンの加水分解)に記述されている。ジアセチル化キチン及びキトサンは、35%未満から 90%を上回るジアセチル化の範囲で取得されて良く、及び例えば、15kD 未満の低分子量キトサンオリゴマー、及び 0.5 から 2kD のキチンオリゴマー、約 15kD の分子量を持つキトサンの「practical grade(実用グレード)」、及び 70kD までの高分子量キトサンなどの、幅広い分子量分布を占める。種子の処理に処方されるキチン及びキトサンの組成物はまた、商業的に入手可能である。商業製品には、例えば、EXA(登録商標)(Plant Defense Boosters, Inc.) 及び BEYOND(商標)(Agrihouse, Inc.) を含む。

30

## 【0074】

フラボノイドは、3つの炭素架橋によって接合された2つの芳香族環の一般構造を有する、フェノール化合物である。フラボノイドは、植物によって産生され、及び例えば、有益なシグナル伝達分子として、昆虫、動物、真菌類および細菌に対して保護をするなどの多数の機能を有する。フラボノイドの分類には、カルコン、アントシアニジン、クマリン、フラボン、フラバノール、フラボノール、フラバノン、イソフラボンを含む。 Jain, et al., J. Plant Biochem. & Biotechnol. 11: 1 - 10 (2002)、Shaw, et al., Environmental Microbiol. 11: 1867 - 80 (2006) を参照のこと。

40

## 【0075】

本開示の組成物において有用な代表的なフラボノイドには、ルテオリン、アピゲニン、タンゲリチン(tangeritin)、ケルセチン、ケンフェロール、ミリセチン、フィセチン、イソラムネチン、パキポドール、ラムナジン、ヘスペレチン、ナリンゲニン、ホルモノネチン、エリオジクチオール、ホモエリオジクチオール、タキシフォリン、ジヒ

50

ドロクエルセチン、ジヒドロケンペロール、ゲニステイン、ダイゼイン、グリシテイン、カテキン、ガロカテキン、カテキン3-没食子酸、ガロカテキン3-没食子酸、エピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキン3-没食子酸、エピガロカテキン3-没食子酸、シアニジン、デルフィニジン、マルビジン、ペラルゴニジン、ペオニジン、ペツニジン、またはその誘導体を含む。フラボノイド化合物は、例えば、Nat 1 and International Corp., Research Triangle Park, N.C.、MP Biomedicals, Irvine, Calif.、LC Laboratories, Woburn Mass から、市販されている。フラボノイド化合物は、例えば、米国特許第5,702,752号、第5,990,291号、及び第6,146,668号に記述されるように、植物または種子から単離されて良い。フラボノイド化合物はまた、Ralston, et al., Plant Physiology 137: 1375-88 (2005) に記述されるように、酵母などの遺伝子組み換え有機物によって産生されて良い。フラボノイド化合物は、異性体、塩、及びそれらの溶媒和物と共に、すべてのフラボノイド化合物を含むことを意図している。  
10

## 【0076】

ジャスモン酸 (JA、[1R-[1,2(Z)]]-3-オキソ-2-(ペンテニル)シクロ pentan 酢酸) 及びその誘導体、リノール酸 ((Z,Z)-9,12-オクタデカジエン酸) 及びその誘導体、およびリノレン酸 ((Z,Z,Z)-9,12,15-オクタデカトリエン酸) 及びその誘導体はまた、本明細書に開示の組成物に使用されて良い。非フラボノイドnod遺伝子誘導物質は、本明細書に記述の非フラボノイドnod遺伝子誘導物質のみならず、異性体、塩、及びそれらの溶媒和物を含むことを意図している。  
20

## 【0077】

ジャスモン酸及びそのメチルエステル、ジャスモン酸メチル(MeJA)は、まとめてジャスモン酸類として知られるが、植物に自然発生するオクタデカノイドに基づく化合物である。ジャスモン酸は、小麦苗の根によって、及びBotryodiplodia theobromae 及び Gibberella fujikuroi、酵母(Saccharomyces cerevisiae)、ならびにEscherichia coli の病原性及び非病原性菌株などの、真菌性の微生物によって産生される。リノール酸及びリノレン酸は、ジャスモン酸の生合成の過程で産生される。ジャスモン酸、リノール酸及びリノレン酸(ならびのそれらの誘導体)は、nod遺伝子発現または根圏細菌によるLCO産生の誘導物質であると報告されている。例えば、Mabood, Fazli, Jasmonates induce the expression of nod genes in Bradyrhizobium japonicum, May 17, 2001、及びMabood, Fazli, "Linoleic and linolenic acid induce the expression of nod genes in Bradyrhizobium japonicum," USD A3, May 17, 2001を参照のこと。  
30

## 【0078】

当該無細胞上清組成物に添加して有用であろう、リノール酸、リノレン酸、及びジャスモン酸の有用な誘導体には、エステル、アミド、グリコシド及び塩を含む。代表的なエステルは、リノール酸、リノレン酸、またはジャスモン酸のカルボキシル基が、COR基で置き換えた化合物であり、ここでRは、OR<sub>1</sub>基であり、R<sub>1</sub>が、C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>の非分岐または分岐のアルキル基、例えば、メチル、エチル、またはプロピル基などのアルキル基、C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>の非分岐または分岐のアルケニル基などのアルケニル基、C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>の非分岐または分岐のアルキニル基などのアルキニル基、例えば、6から10の炭素原子を有するアリール基、または例えば、4から9の炭素原子を有するヘテロアリール基であり、ここでそのヘテロアリール基のヘテロ原子が、例えば、N、O、P、またはSであり得る。代表的なアミドは、リノール酸、リノレン酸、またはジャスモン酸のカルボキシル基が、COR基で置き換えた化合物であり、ここでRは、NR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>基であり、R<sub>2</sub>及び  
40

R<sub>3</sub>が、独立して、水素、C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>の非分岐または分岐のアルキル基、例えば、メチル、エチル、またはプロピル基などのアルキル基、C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>の非分岐または分岐のアルケニル基などのアルケニル基、C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>の非分岐または分岐のアルキニル基などのアルキニル基、例えば、6から10の炭素原子を有するアリール基、または例えば、4から9の炭素原子を有するヘテロアリール基であり、ここでそのヘテロアリール基のヘテロ原子が、例えば、N、O、P、またはSであり得る。エステルは、酸触媒による求核付加反応などの、公知の方法によって調合されて良く、ここでそのカルボン酸が、ミネラル酸の触媒量の存在下で、アルコールと反応する。アミドはまた、中性条件の下、ジシクロヘキシリカルボジイミド(DCC)などのカップリング剤の存在下で、カルボン酸と適切なアミンとの反応によるなどの、公知の方法で調合されて良い。リノール酸、リノレン酸、及びジャスモン酸の適切な塩には、例えば、塩基添加の塩を含む。代謝的に許容される、これら化合物の塩基塩を調合する試薬として使用して良い塩基には、アルカリ金属イオン(カリウム及びナトリウムなど)、ならびにアルカリ土類金属イオン(カルシウム及びマグネシウムなど)から誘導されるものを含む。これらの塩は、リノール酸、リノレン酸、またはジャスモン酸の溶液を、その塩基溶液と一緒に混合することによって、容易に調合される。当該塩は、溶液から沈殿させて良く、及びろ過によって収集され、またはその溶媒を揮発させるなどのその他の手段によって回収されて良い。

10

## 【0079】

カリキンは、誘導体及びそれらの類似体を含む、ビニル性の4H-ピロン、例えば、2H-フロ[2,3-c]ピラン-2-オンである。カリキンには、異性体、塩、及びそれらの溶媒和物を含むことを意図している。

20

## 【0080】

1つの態様において、無細胞上清組成物は、1つ以上のグルコノラクトンをさらに含んで良い。その1つ以上のグルコノラクトンは、天然のグルコノラクトン(すなわち、合成で生成されていない)、合成グルコノラクトン(例えば、化学的に合成されたグルコノラクトン)またはそれらの組み合わせであって良い。

## 【0081】

1つの態様において、無細胞上清組成物は、除草剤を含んで良い。例示的な除草剤には、非限定的に、イミダゾリノン、スルホニルウレア、グリホサート、グルホシネット、L-ホスフィノトリシン、トリアジン、ベンゾニトリル、Dicamba(3,6-ジクロロ-0-アニス酸または3,6-ジクロロ-2-メトキシ安息香酸)、BANVEL(商標)(BASF)、CLARITY(商標)(BASF)、及びVANQUISH(商標)(Syngenta)などの除草剤中の有効成分、ピレトリンや合成ピレスロイド、アゾール、オキサジジン(oxadiazine)誘導体、クロロニコチニル、ニトログアニジン誘導体、トリアゾール、有機リン酸エステル、ピロール、ピラゾール、フェニルピラゾール、ジアシルヒドラジン、及びカーバメイトを含む。前記一覧の分類のいくつかに属する除草剤の追加の例示は、The Pesticide Manual, 12th Ed., C.D.S.Tomlin, Ed., British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, UK(2000)に見出すことができる。

30

## 【0082】

1つの態様において、無細胞上清組成物には、殺虫剤を含んで良い。例示的な殺虫剤には、非限定的に、任意の細菌種(すなわち、Bacillus thuringiensis)、ウイルス(すなわち、デンソウイルス)、生物防除農薬、アバーメクチン、ホストキシン/フミトキシン、ビフェントリン、カルバリル、クロルフェナビル、ベータ-シフルトリン、シペルメトリン、デルタメトリン、ジクロルボス、D-フェノトリン、D-transアレスリン、レスメトリン、メソミル、ヒドロメチルノン、フェノキシカルブ、フィプロニル、イミダクロブリド、イミダクロブリド、ラムダ-シハロトリン、マラチオン、メトブレン、ナレド、ニチアジン、P-ジクロロベンゼン、ペルメトリン、ペルメトリン-ピペロニルブトキシド、プロペタンホス、プロポスキル、ピレトリン、フェノト

40

50

リン、アレスリン、ヒドロブレン、レスメトリン、スピノサド、スミトリン、スミトリン-ピペロニルブトキシド、テメホス、蚊の幼虫駆除剤、幼虫駆除剤、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

#### 【0083】

1つの態様において、無細胞上清組成物には、殺真菌剤を含んで良い。例示的な殺真菌剤には、非限定的に、Mefenoxam & Fludioxonil (Apron Maxx RTA, Syngenta USA)、テブコナゾール、シメコナゾール、フルキンコナゾール、ジフェノコナゾール、4,5-ジメチル-N-(2-プロペニル)-2-(トリメチルシリル)-3-チオフェンカルボアミド(シルチオファム)、ヘキサコナゾール、エタコナゾール、プロピコナゾール、トリチコナゾール、フルトリアホル、エポキシコナゾール、フェンブコナゾール、プロムコナゾール、ペンコナゾール、イマザリル、テトラコナゾール、フルシラゾール、メトコナゾール、ジニコナゾール、マイクロブタニル、トリアジメノール、ビテルタノール、ピリメタニル、シプロジニル、トリデモルフ、フェンプロピモルフ、クレソキシムメチル、アゾキシストロビン、ZEN90160、フェンピクロニル、ベナラキシル、フララキシル、メタラキシル、R-メタラキシル、オルフレイス、オキサジキシル、カルボキシン、プロクロラズ、トリフルミゾール、ピリフェノックス、アシベンゾラル-5-メチル、クロロタロニル、シモキサニル、ジメトモルフ、ファモキサドン、キノキシフェン、フェンプロピジン、スピロキサミン、トリアゾキシド、BAS50001F、ヒメキサゾール、ペンシクリン、フェナミドン、グアザチン、及びシプロコナゾールを含む。

10

20

30

#### 【0084】

1つの態様において、無細胞上清組成物には、殺虫剤(*insecticides*)を含んで良い。本明細書に記述の組成物に有用な殺虫剤は、非限定的に、ハリガネムシ、ヨトウムシ、地虫、コーンルートワーム、種トウモロコシワーム、ノミトビヨロイムシ、アメリカコバネナガカメムシ、アブラムシ、ハムシ、カメムシ、及びそれらの組み合わせを含む、広範な昆虫に対して活動を適切に阻害する。

#### 【0085】

本明細書に開示の組成物に対して適切な、商業用殺虫剤の非限定的な例示には、C.R.UISER (Syngenta, Wilmington, Del.)、GAUCHO及びPONCHO (Gustafson, Plano, Tex.)を含む。これら及びその他の商業用殺虫剤の有効成分には、チアメトキサム、クロチアニジン、イミダクロブリドを含む。商業用殺虫剤は、製造者の指示書に従ったその推奨濃度において、最も適切に使用される。

40

#### 【0086】

多様な態様において、当該無細胞上清組成物には、揮発性脂肪酸を含む。さらなる態様において、その揮発性脂肪酸には、酢酸、酪酸、イソ酪酸、及びプロピオン酸を含む。多様な態様において、当該揮発性脂肪酸の濃度は、発酵条件(その培養物中の微生物の選択を含んで)、及び/または望ましい濃度を達成するために、精製した揮発性脂肪酸の無細胞上清への添加によって調整が可能である。

#### 【0087】

さらなる態様において、当該無細胞上清中の酢酸濃度は、約2000~2400 ppmである。そのうえさらなる態様において、当該無細胞上清中の酪酸濃度は、約1300~1800 ppmである。しかもさらなる態様において、当該無細胞上清中のイソ酪酸濃度は、約200~700 ppmである。加えてさらなる態様において、当該無細胞上清中のプロピオン酸濃度は、約100~1200 ppmである。

#### 【0088】

さらなる態様において、当該無細胞上清中の酢酸濃度は、約2000~2400 ppmである。そのうえさらなる態様において、当該無細胞上清中の酪酸濃度は、約1300~1750 ppmである。しかもさらなる態様において、当該無細胞上清中のイソ酪酸濃度は、約600~650 ppmである。加えてさらなる態様において、当該無細胞上清中の

50

プロピオン酸濃度は、約 140 ~ 1100 ppm である。

**【0089】**

さらなる態様において、酢酸、酪酸、イソ酪酸、及びプロピオン酸の比率は、固定した比率である。そのうえさらなる態様において、その比率は、本明細書に与えられた酢酸、酪酸、イソ酪酸、及びプロピオン酸のレベルによって決定された比率である。

**【0090】**

1つの態様において、無細胞上清組成物は、少なくとも1つの単離された菌根菌を含む微生物培養体から調合されて良い。菌根菌は、根の表面吸収部分を増やし、及び有機窒素、リン、鉄、及びその他の強く結合した土壤養分を含む、摂取が困難な栄養素を溶解し、土壤中に強力な酵素を増やすことによって、植物の栄養吸収を増加させる。この摂取プロセスは、植物栄養素にとって有益であり、及び菌根菌を持たない植物にとって、その健康を維持するためには、高い施肥のレベルが必要になる理由を示していると思われる。菌根菌は、栄養素を捕捉し及び同化して、土壤にその栄養素の利点を保存する、複雑な仕組みを形成する。

10

**【0091】**

1つの態様において、無細胞上清組成物は、農学的に許容されるキャリアーを含むことができる。本明細書に記述のキャリアーは、無細胞上清組成物が、効果（例えば、植物成長を促す可能性）を維持することを可能にする。キャリアーを含有する無細胞上清組成物の非限定的な例示には、液体、ゲル、スラリー、または固体（湿潤粉末または乾燥粉末を含む）を含む。当該キャリアー材の選択は、意図した用途に依存するであろう。キャリアーは、例えば、土壤と相性の良いキャリアー、種子と相性の良いキャリアー、及び／または葉面と相性の良いキャリアーであって良い。1つの態様において、キャリアーは、土壤と相性の良いキャリアーである。1つの態様において、キャリアーは、種子と相性の良いキャリアーである。1つの態様において、キャリアーは、葉面と相性の良いキャリアーである。

20

**【0092】**

1つの態様において、キャリアーは、液体キャリアーである。本明細書に開示の組成物にとって、キャリアーとして有用な液体キャリアーには、水、水溶液、または非水溶液を含む。1つの態様において、キャリアーは、水である。1つの態様において、キャリアーは、水溶液である。1つの態様において、キャリアーは、非水溶液である。仮に液体キャリアーが使用される場合、その液体（例えば、水）キャリアーにはさらに、記述される当該組成物に使用される、1つ以上の微生物株を培養する増殖培地を含んで良い。微生物株にとって適切な増殖培地の非限定的な例示には、YEM培地、マンニトール酵母エキス、グリセロール酵母エキス、Czapek-Dox培地、ジャガイモデキストロースの汁、または本明細書に開示の組成物に含まれて良い微生物株と相性が良い、及び／またはその株に成長の栄養素を与えるとして当業者に公知の培地を含む。

30

**【0093】**

1つの態様において、当該キャリアーは、水である。1つの態様において、無細胞上清は、水に希釈される。1つの態様において、無細胞上清は、無細胞上清の保管濃度から、約 1 / 10、1 / 20、1 / 30、1 / 40、1 / 50、1 / 60、1 / 70、1 / 80、1 / 90、1 / 100、1 / 150、または 1 / 200 に水で希釈される。

40

**【0094】**

1つの態様において、本明細書に記述の無細胞上清は、1つ以上のポリマーを含んで良い。農産業に行けるポリマーの非限定的な使用には、農薬の送達、重金属除去、保水及び／または配水、ならびにそれらの組み合わせを含む。Pouciet al., Am. J. Agric. & Biol. Sci., 3(1): 299 - 314 (2008)。1つの態様において、当該1つ以上のポリマーは、天然ポリマー（例えば、寒天、澱粉、アルギン酸、ペクチン、セルロースなど）、合成ポリマー、生分解性ポリマー（例えば、ポリカプロラクトン、ポリ乳酸、ポリ（ビニルアルコール）など）、またはそれらの組み合わせである。

50

## 【0095】

本明細書に記述の組成物にとって有用なポリマーの非限定的な一覧は、Pouuci, et al., Am. J. Agric. & Biol. Sci., 3(1):299-314(2008)を参照のこと。1つの態様において、本明細書に記述の組成物には、セルロース、セルロース誘導体、メチルセルロース、メチルセルロース誘導体、澱粉、寒天、アルギン酸、ペクチン、ポリビニルピロリドン、及びそれらの組み合わせを含んで良い。

## 【0096】

1つの態様において、本明細書に記述の無細胞上清組成物には、1つ以上の湿潤剤を含んで良い。湿潤剤は通常、水の土壤への浸潤及び浸透を改善するために、土壤、特に疎水性土壤に使用される。この湿潤剤は、補助剤、オイル、界面活性剤、緩衝剤、酸味料、またはそれらの組み合わせであって良い。1つの態様において、当該湿潤剤は、界面活性剤である。1つの態様において、当該湿潤剤は、1つ以上の非イオン性界面活性剤、1つ以上の陰イオン性界面活性剤、またはそれらの組み合わせである。1つの態様において、当該湿潤剤は、1つ以上の非イオン性界面活性剤である。

10

## 【0097】

1つの態様において、無細胞上清組成物には、界面活性剤を含んで良い。本明細書に記述の組成物に適した界面活性剤には、非イオン性界面活性剤（例えば、半極性及び／または陰イオン性及び／または陽イオン性及び／または両性）であって良い。当該界面活性剤は、土壤（複数可）及び／または泥（複数可）を、湿潤し及び乳化することができる。開示される組成物に使用する界面活性剤は、その処方物に含まれるいかなる微生物にも低毒性であることが、想定される。開示される組成物に使用する界面活性剤は、低い薬害性（すなわち、物質または物質の組み合わせが、植物に与える毒性の度合い）であることが、さらに想定される。単一の界面活性剤または複数の界面活性剤の混合物が、使用できる。

20

## 【0098】

陰イオン性界面活性剤または陰イオン性及び非イオン性界面活性剤の混合物をまた、本明細書に開示の組成物に使用して良い。陰イオン性界面活性剤は、水溶液中で、陰イオンまたは負の電荷状態の親水性部分を有する界面活性剤である。本明細書に記述の組成物は、1つ以上の陰イオン性界面活性剤を含んで良い。この陰イオン性界面活性剤（複数可）は、水に可溶な界面活性剤、水に不溶な界面活性剤のいずれでも、または水に可溶な界面活性剤と水に不溶な界面活性剤の組み合わせでも良い。陰イオン性界面活性剤の非限定的な例示には、スルホン酸、硫酸エステル、カルボン酸、及びそれらの塩を含む。水溶性界面活性剤の非限定的な例示には、アルキル硫酸塩、アルキルエーテル硫酸塩、アルキルアミドエーテル硫酸塩、アルキルアリールポリエーテル硫酸塩、アルキルアリール硫酸塩、アルキルアリールスルホン酸塩、モノグリセリド硫酸塩、アルキルスルホン酸塩、アルキルアミドスルホン酸塩、アルキルアリールスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩、キシレンスルホン酸塩、クメンスルホン酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩、アルキルジフェニルオキシドスルホン酸塩、アルファ-オレフィンスルホン酸塩、アルキルナフタリンスルホン酸塩、パラフィンスルホン酸塩、リグニンスルホン酸塩、アルキルスルホコハク酸塩、エトキシスルホコハク酸塩、アルキルエーテルスルホコハク酸塩、ヒドロキシアミドスルホコハク酸塩、アルキルスルホスクシナミン酸塩、アルキルスルホ酢酸塩、アルキルリン酸塩、リン酸エステル、アルキルエーテルリン酸塩、アシルサルコシネート、アシルイセチオネート、N-アシルタウレート、N-アシル-N-アルキルタウレート、アルキルカルボン酸塩、またはそれらの組み合わせを含む。

30

## 【0099】

非イオン性界面活性剤は、水溶媒に溶解または分散させた時に、電荷を持たない界面活性剤である。本明細書に記述の組成物には、望ましい湿潤及び乳化作用を与るために使用され、及び胞子の安定性及び活性を著しく阻害しない、1つ以上の非イオン性界面活性剤を含んで良い。当該非イオン性界面活性剤（複数可）は、水に可溶な界面活性剤、水に不溶な界面活性剤のいずれでも、または水に可溶な界面活性剤と水に不溶な界面活性剤の組み合わせでも良い。

40

50

**【0100】**

水に不溶な界面活性剤の非限定的な例示には、アルキル及びアリール:グリセロールエーテル、グリコールエーテル、エタノールアミド、スルファニルアミド (sulfonyl amides)、アルコール、アミド、アルコールエトキシレート、グリセロールエステル、グリコールエステル、グリセロールエステル及びグリコールエステルのエトキシレート、砂糖ベースのアルキルポリグリコシド、ポリオキシエチレン化脂肪酸、アルカノールアミン凝縮体、アルカノールアミド、第三級アセチレングリコール、ポリオキシエチレン化メルカプタン、カルボン酸エステル、ポリオキシエチレン化ポリオキシプロピレングリコール、ソルビタン脂肪酸エステル、またはそれらの組み合わせを含む。EO / PO プロックコポリマー (EOは、エチレンオキサイド、POは、プロピレンオキサイド)、EOポリマー及びコポリマー、ポリアミン、ならびにポリビニルピロリドンもまた、含まれる。

10

**【0101】**

水溶性の非イオン性界面活性剤の非限定的な例示には、ソルビタン脂肪酸アルコールエトキシレート、ソルビタン脂肪酸エステルエトキシレートを含む。

**【0102】**

1つの態様において、本明細書に記述の組成物には、少なくとも1つの非イオン性界面活性剤を含む。1つの態様において、組成物には、少なくとも1つの水に不溶な非イオン性界面活性剤及び少なくとも1つの水溶性の非イオン性界面活性剤を含む。1つの態様において、組成物には、実質的に同じ長さの炭化水素鎖を有する、非イオン性界面活性剤の組み合わせを含む。

20

**【0103】**

1つの態様において、本明細書に記述の組成物には、有機シリコーン系界面活性剤、シリコーンベース及びミネラルオイルベースの消泡剤中に、界面活性剤として使用されるシリコーンベースの消泡剤を含んで良い。1つの態様において、本明細書に記述の組成物には、脂肪酸のアルカリ金属塩（例えば、水溶性の脂肪酸のアルカリ金属塩、及び／または水に不溶性の脂肪酸のアルカリ金属塩）を含んで良い。

**【0104】**

単離された微生物で植菌された、微生物培養体

本開示の無細胞上清組成物は、1つ以上の単離された微生物で植菌された、微生物培養体の無細胞上清である。これら微生物の例示には、非限定的に、*Aspergillus spp.*、*Bacillus spp.*、*Rhodopseudomonas spp.*、*Candida spp.*、*Lactobacillus spp.*、*Lactococcus spp.*、*Pseudomonas spp.*、*Saccharomyces spp.*、及び*Streptococcus spp.*を含む。本明細書に開示の微生物培養体には、特定の無細胞上清組成物によって行われる方法に依存して、これらの及びその他の微生物の異なる量及び組み合わせを含む。

30

**【0105】**

本開示に有用な微生物には、非限定的に、1つ以上の以下の微生物を含む。

## 微生物

Lactobacillus	Hyperthermophile
Lactobacillus fermentum	Methanopyrus kandleri
Streptococcus thermophiles	Methanobrevibacter smithii
Lactococcus diacetylactis	Pyrococcus furiosus
Lactococcus lactis	Ferrglobus
Bifidobacterium bifidum	Ferrglobus placidus
Lactibacillus delbrueckii	Hydrothermal
Yeasts	Pyrolobus fumarii
Candida Antarctica	Thermophile
Candida chauliode	Sulfolobus acidocaldarius
Candida corydalidis	Sulfolobus islandicus
Candida albicans	Sulfolobus metallicus
Lodderomyces elongisporus	Sulfolobus shibatae
Candida dosseyi	Sulfolobus solfataricus
Candida blattae	Bacillus thuringiensis
Candida ascalaphidarum	Bacillus thuringiensis Israensis
Candida membranifaciens	Pseudomonas
Candida oleophila	Pseudomonas alcaligenes
Streptomyces albus	Pseudomonas mendocina
Lachancea fermentati	Pseudomonas pseudoalcaligenes
Lachancea thermotolerans	Pseudomonas resinovorans
Hanseniaspora vineae	Pseudomonas veronii
Saccharomycotina	Pseudomonas putida
Aspergillus	Pseudomonas stutzeri
Aspergillus oryzae	Pseudomonas fluorescens
Aspergillus niger	Pseudomonas chlororaphis
Aspergillus terreus	Pseudomonas aurantiaca
Aspergillus fischerianus	Pseudomonas aeruginosa
Green sulfur bacteria	White rot fungi
Purple sulfur bacteria	Xanthomonas
Chromatiaceae	Acinetobacter
Ectothiorhodospiraceae	Rhodococcus sp.
Halothiobacillaceae	Arthrobacter
Halothiobacillus halophilus	Aureobasidium sp.
Halothiobacillus hydrothermalis	Alcaligeness sp.
Halothiobacillus kellyi	Leuconostoc sp.
Halothiobacillus neapolitanus	Sclerotium sp.
Purple non sulfur bacteria	Clostridium,
Rhodopseudomonas palustris	Zymomonas
Salt or Ocean Bacterium	Klebsiella

10

20

30

40

*Halobacterium jilantaiense*  
*Halobacterium noricense*  
*Halobacterium salinarum*  
*Halobacterium piscisalsi*

## 【0106】

本開示に有用な細菌には、非限定的に、1つ以上の以下の細菌を含む。

細菌	10
<i>Bacillus alcalophilus</i>	<i>Bacillus latus</i>
<i>Bacillus alvei</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>Bacillus aneurinolyticus</i>	<i>Bacillus mesentericus</i>
<i>Bacillus aquaemaris</i>	<i>Bacillus mucilaginosus</i>
<i>Bacillus brevis</i>	<i>Bacillus mycoides</i>
<i>Bacillus caldolyticus</i>	<i>Bacillus natto</i>
<i>Bacillus centrosporus</i>	<i>Bacillus pantothenticus</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus polymyxa</i>
<i>Bacillus circulans</i>	<i>Bacillus pseudoanthracis</i>
<i>Bacillus clausii</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus schlegelii</i>
<i>Bacillus firmus</i>	<i>Bacillus sphaericus</i>
<i>Bacillus flavothermus</i>	<i>Bacillus sporothermodurans</i>
<i>Bacillus fusiformis</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
<i>Bacillus globigii</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bacillus halodurans</i>	<i>Bacillus thermoglucosidasius</i>
<i>Bacillus infernos</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Bacillus larvae</i>	<i>Bacillus vulgaris</i>
<i>Bacillus laterosporus</i>	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>
	20
	30
	40

## 【0107】

多様な態様において、本開示の無細胞上清組成物を產生するために培養された微生物は、大量に、工業生産規模で増殖できる。例えば、非限定的であるが、1000リットルバッヂで微生物を増殖させる方法には、50リットルの硫黄を含まない農業糖蜜、3.75リットルの小麦ふすま、3.75リットルの昆布、3.75リットルのベントナイト粘土、1.25リットルのフィッシュエマルジョン(Nutriver社、Dunham社、Quebec社からの無殺菌の市販有機土壌改良剤)、1.25リットルの大豆粉、675mgの市販の海塩、50リットルの選択された微生物株、微生物培養体を形成するための最大1000リットルの非塩素化温水を含有する媒体を含む。当該微生物を増殖させる方法にはさらに、いくらかの量の温水で糖蜜を溶解すること、タンクを満たすまで、先に挙げたその他成分を添加すること、30℃に温度を維持すること、及び、5日以内で約3.7までそのpHを下げた後、1日1回軽く攪拌すること、ならびにpH、微生物培養体の形成をモニターすることを含むことができる。この微生物培養体は、2~8週間で培養できる。培養に対応して決定された期間の後、その微生物を、その微生物培養体の液体部分から分離し、及び残された無細胞液体が、本開示の無細胞上清組成物である。無細胞

上清組成物は、例えば、気密容器に、太陽光のない暗所に、例えば、室温で、容器に詰められ及び保管されて良い。微生物培養体は、米国特許出願番号 13 / 979419 に教示されるように製造でき、その全体を本明細書に組み入れる。

#### 【0108】

これらの微生物は、協同したやり方で、いくつかの属または種が、その組み合わせにおけるその他微生物にとって有益な副産物または合成化合物与えることで、増殖し及び生存する。例えば、微生物培養体は、代謝活性に酸素が必要な好気性微生物、及び太陽光または特定物質の存在などの他のエネルギー源を利用する嫌気性微生物の両方で植菌され得る。

#### 【0109】

微生物培養体は、酸素及び／またはその環境中での栄養素濃縮によって代謝活性を調整する、例えば、乳酸菌株などの、通性微生物で植菌され得る。

#### 【0110】

生きている有機物のすべての種には、その他とは遺伝子的に及び生化学的に異なり、しかしその種内のスペクトルの正常変動とされる範囲内である個体を含む。これら個体の自然変動は、その遺伝子配列における非破壊的な置換または欠失、遺伝子発現またはRNAプロセス化における変動、及び／またはペプチド合成における変動、及び／または細胞内膜の細胞プロセス化の変動の結果であろう。微生物培養体は、ある種の正常な変動内または変動外の微生物で植菌され得る。そのような微生物の識別においては、当業者には公知の遺伝学的、分子生物学的方法、及び／または生化学的試験によって検出されて良い。

10

20

30

40

50

#### 【0111】

例えば、本開示の微生物培養体は、特定微生物の独立したコロニーを単離して選択された微生物で、植菌され得る。そのコロニー構成体は、例えば、その単離された微生物に対応した酵素プロファイルを確立するために、その単離した微生物に存在する酵素レベルと物質の試験パネルで、特定物質の活性を試験評価することによって、特徴付けられる。これらの物質は、野菜の有機物質または動物性物質の破壊などの一般的な修復目的に対してもしくは特定化学物質の破壊などの特定の修復目的に対して利用される、本開示の組成物における微生物によって必要とされる、その生化学的経路の断面を代表する。

#### 【0112】

1つの態様において、微生物培養体には、*Aspergillus oryzae*などの、*Aspergillus spp.*を含む。1つの態様において、当該*Aspergillus spp.*は、*Aspergillus oryzae*であり、本明細書ではIN-AO1を指し、IN-AO1の指定を伴い、顧客番号200139の下、ATCC特許寄託指定番号PTA-121551で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下のATCC特許寄託により寄託された。

#### 【0113】

1つの態様において、微生物培養体には、*Bacillus subtilis*などの、*Bacillus spp.*を含む。1つの態様において、当該*Bacillus spp.*は、*Bacillus subtilis*であり、本明細書ではIN-B51を指し、顧客番号200139の下、及びATCC特許寄託指定番号PTA12385を与えられ、2011年1月12日に、ブダペスト条約下のATCC特許寄託により寄託された。

#### 【0114】

1つの態様において、微生物培養体には、*Rhodopseudomonas palustris*などの、*Rhodopseudomonas spp.*を含む。1つの態様において、当該*Rhodopseudomonas spp.*は、*Rhodopseudomonas palustris*であり、本明細書ではIN-RP1を指し、顧客番号200139の下、及びATCC特許寄託指定番号PTA-12387を与えられ、2011年1月12日に、ブダペスト条約下のATCC特許寄託により寄託された。

#### 【0115】

1つの態様において、微生物培養体には、*Candida utilis*などの、*Candida spp.*を含む。1つの態様において、当該*Candida spp.*は、*Candida utilis*であり、本明細書ではIN-CU1を指し、IN-CU1の指定を伴い、顧客番号200139の下、ATCC特許寄託指定番号PTA-121550で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下のATCC特許寄託により寄託された。

#### 【0116】

1つの態様において、微生物培養体には、*Lactobacillus helveticus*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus rhamnosus*、または*Lactobacillus plantarum*、もしくはそれらの組み合わせなどの、*Lactobacillus spp.*を含む。1つの態様において、当該*Lactobacillus spp.*は、*Lactobacillus helveticus*である。1つの態様において、当該*Lactobacillus spp.*は、*Lactobacillus helveticus*であり、本明細書ではIN-LH1を指し、顧客番号200139の下、及びATCC特許寄託指定番号PTA-12386を与えられ、2011年1月12日に、ブダペスト条約下のATCC特許寄託により寄託された。微生物培養体には、*Lactobacillus plantarum*などの、*Lactobacillus spp.*を含む。1つの態様において、当該*Lactobacillus spp.*は、*Lactobacillus plantarum*であり、本明細書ではIN-LP1を指し、IN-LP1の指定を伴い、顧客番号200139の下、ATCC特許寄託指定番号PTA-121555で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下のATCC特許寄託により寄託された。微生物培養体には、*Lactobacillus rhamnosus*などの、*Lactobacillus spp.*を含む。1つの態様において、当該*Lactobacillus spp.*は、*Lactobacillus rhamnosus*であり、本明細書ではIN-LR1を指し、IN-LR1の指定を伴い、顧客番号200139の下、ATCC特許寄託指定番号PTA-121554で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下のATCC特許寄託により寄託された。微生物培養体には、*Lactobacillus rhamnosus*などの、*Lactobacillus spp.*を含む。1つの態様において、当該*Lactobacillus spp.*は、*Lactobacillus lactis*であり、本明細書ではIN-LL1を指し、IN-LL1の指定を伴い、顧客番号200139の下、ATCC特許寄託指定番号PTA-121552で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下のATCC特許寄託により寄託された。微生物培養体には、*Lactobacillus casei*などの、*Lactobacillus spp.*を含む。1つの態様において、当該*Lactobacillus spp.*は、*Lactobacillus casei*であり、本明細書ではIN-LC1を指し、IN-LC1の指定を伴い、顧客番号200139の下、ATCC特許寄託指定番号PTA-121549で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下のATCC特許寄託により寄託された。

#### 【0117】

1つの態様において、微生物培養体には、*Pseudomonas aeruginosa*などの、*Pseudomonas spp.*を含む。1つの態様において、*Pseudomonas spp.*は、*Pseudomonas aeruginosa*である。

#### 【0118】

1つの態様において、微生物培養体には、*Rhodopseudomonas palustris*などの、*Rhodopseudomonas spp.*を含む。1つの態様において、当該*Rhodopseudomonas spp.*は、*Rhodopseudomonas palustris*であり、本明細書ではIN-RP1を指し、顧客番号200139の下、及びATCC特許寄託指定番号PTA-12383を与えられ、2011年1月12日に、ブダペスト条約下のATCC特許寄託により寄託された。1つの態

10

20

30

40

50

様において、微生物培養体には、*Rhodopseudomonas palustris*などの、*Rhodopseudomonas spp.*を含み、本明細書ではIN-RP2を指し、IN-RP2の指定を伴い、顧客番号200139の下、ATCC特許寄託指定番号PTA-121553で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下のATCC特許寄託により寄託された。

#### 【0119】

1つの態様において、微生物培養体には、*Saccharomyces cerevisiae*などの、*Saccharomyces spp.*を含む。1つの態様において、当該*Saccharomyces spp.*は、*Saccharomyces cerevisiae*であり、本明細書ではIN-SC1を指し、顧客番号200139の下、及びATCC特許寄託指定番号PTA-12384を与えられ、2011年1月12日に、ブダペスト条約下のATCC特許寄託により寄託された。1つの態様において、微生物培養体には、*Saccharomyces lactis*などの、*Saccharomyces spp.*を含む。

10

#### 【0120】

微生物培養体には、本明細書ではIN-AO1(ATCC特許寄託指定番号PTA-121551)を指す、*Aspergillus oryzae*、本明細書ではIN-BS1(ATCC特許寄託指定番号PTA-12385)を指す、*Bacillus subtilis*、本明細書ではIN-RP1(ATCC特許寄託指定番号PTA-12387)を指す、*Rhodopseudomonas palustris*、本明細書ではIN-CU1(ATCC特許寄託指定番号PTA-121550)を指す、*Candida utilis*、本明細書ではIN-LC1(ATCC特許寄託指定番号PTA-121549)を指す、*Lactobacillus casei*、本明細書ではIN-LH1(ATCC特許寄託指定番号PTA-12386)を指す、*Lactobacillus helveticus*、本明細書ではIN-LR1(ATCC特許寄託指定番号PTA-121554)を指す、*Lactobacillus rhamnosus*、本明細書ではIN-LP1(ATCC特許寄託指定番号PTA-121555)を指す、*Lactobacillus plantarum*、本明細書ではIN-RP1(ATCC特許寄託指定番号PTA-12387)を指す、*Pseudomonas aeruginosa*、*Rhodopseudomonas palustris*、本明細書ではIN-RP2(ATCC特許寄託指定番号PTA-121553)を指す、*Rhodopseudomonas palustris*、本明細書ではIN-SC1(ATCC特許寄託指定番号PTA-12384)を指す、*Saccharomyces cerevisiae*、及び*Saccharomyces lactis*を含む、単離された微生物の混合物を含んで良い。本開示の微生物培養体に植菌される、単離微生物の例示には、非限定的に、*Aspergillus oryzae*、*Rhodopseudomonas palustris*、*Candida utilis*、*Lactobacillus helveticus*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus plantarum*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Rhodopseudomonas palustris*、*Saccharomyces cerevisiae*、及び*Saccharomyces lactis*を含む。

20

30

40

50

#### 【0121】

微生物培養体には、異なる量の及び組み合わされた、これらの及びその他の単離された微生物を含んで良い。したがって、多様な態様において、微生物培養体は、*Aspergillus spp.*、*Bacillus spp.*、*Rhodopseudomonas spp.*、*Candida spp.*、*Lactobacillus spp.*、*Pseudomonas spp.*、*Saccharomyces spp.*、または*Streptococcus spp.*の、少なくとも2つで植菌される。1つの態様において、微生物培養体は、*Aspergillus oryzae*、*Bacillus su*

*btilis*、*Lactobacillus helveticus*、*Lactobacillus casei*、*Rhodopseudomonas palustris*、及び*Saccharomyces cervisiae*で植菌される。1つの態様において、微生物培養体は、混合培養体、IN-M1(ATCC特許寄託指定番号PTA-12383)で植菌される。この堆積した混合培養体、IN-M1は、先に本明細書に使用した指定を利用して、菌株のIN-LH1、IN-BS1、IN-SC1、IN-RP1、及び*Lactobacillus casei*ならびに*Aspergillus oryzae*から構成される。1つの態様において、微生物培養体は、*Aspergillus oryzae*、*Bacillus subtilis*、*Candida utilis*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus helveticus*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactococcus lactis*、*Rhodopsseudomonas palustris*、及び*Saccharomyces cervisiae*で植菌される。1つの態様において、微生物培養体は、本明細書でIN-M2を指し、IN-M2の指定を伴い、顧客番号200139の下、ATCC特許寄託指定番号PTA-121556で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下のATCC特許寄託により寄託された、混合培養体で植菌され及びそれを含む。当該堆積した混合培養体、IN-M2は、先に本明細書に使用した指定を利用して、菌株のIN-LC1、IN-LH1、IN-LP1、IN-LR1、IN-LL1、IN-BS1、IN-AO1、IN-SC1、IN-CU1、IN-RP1、及びIN-RP2から構成される。開示される微生物培養体のいずれもが、本開示の無細胞上清組成物に対応した微生物培養源であり得る。本開示の無細胞上清組成物は、本明細書に教示される方法において、有用である。

#### 【0122】

##### 選定基準

1つ以上の選定基準が、標準化された生態系を与え、及び特定の反応を行って無細胞上清組成物を与える微生物の、微生物培養体に対応した微生物処方を可能にする。例えば、酵素を与える微生物は、物質の酵素活性レベルに対して、酵素プロファイル試験で評価されて良い。

#### 【0123】

微生物培養体に対応した、微生物の選定法には、酵素プロファイル活性のための試験、酸素、温度など異なる条件下での増殖特性、硝酸塩、炭水化物、ミネラルまたは特定の混入物などの、特定の媒体条件での成長、及び胞子を形成する能力などの、特定微生物に対する特徴的な反応を含む。これらの試験は、特定の微生物を特徴付け、及び有用な微生物培養体の形成を可能にする。したがって、微生物培養体に対応した微生物の1つの試験基準は、一緒にした多様な微生物種の相互作用である。微生物は、その酵素プロファイル試験及びその他の基準に合致するとしても、微生物の共同体に添加された場合には、十分に成長できない可能性があり、及びしたがってその微生物が、微生物培養体の成分として選択されないであろう。

#### 【0124】

##### 酵素プロファイル試験

酵素プロファイル試験の例示には、物質を与えること、及びどこに、+3またはそれ以上の高い活性があるか、ならびにどこに、+2及びそれ以下の低い活性があるか、さらに活性が無いかを記録することを含む。例えば、乳酸菌を試験したが、アルカリホスファターゼに対しては+5酵素レベル、及びリパーゼに対しては0酵素レベルであった。そのような乳酸菌は、そのリパーゼ集団が、+4または+5の場所では、微生物培養体において、他の微生物と混合されて良い。例えば、有機物を破壊するために、反応が必要な場所では、微生物培養体に、両方の酵素活性が必要である。異なる強みを持つ微生物を使用することは、協調を可能にし、その環境に対して生物学的に利用可能ではない、または栄養素もしくはプレバイオティクスとして、その他の微生物種にとって利用可能ではない、もしくは特定の混入物を標的にした活性化合物／酵素を与えない、いずれかの中間化合物を残

10

20

20

30

40

50

す、不完全な生化学的経路を持たないようにして、代謝経路の完成を可能にする。不完全な生化学的経路はまた、その組成物において、または破損した環境の成長及び再生におけるパラクリン作用を伴う、ホルモン、増殖因子、抗殺菌剤などの植菌された環境において、異なる種に対する栄養素の産生または活性化に関与する分子を与えない。不完全な生化学的経路の他の有害な影響は、硫化水素などの、毒性及び／または悪臭のいずれかの中間化合物の産生である。

#### 【0125】

例えば、細菌種から単離された細菌株は、纖維質（セルロース及びヘミセルロース）、タンパク質及び脂肪を加水分解する能力、及びその代謝過程で蓄積する多量の中間分子及び細胞の分解を完了する能力を含む、酵素プロファイルによって特徴づけられた。これらの特徴は、有機物の分解、及び悪臭ならびにその他の気体の排出を減らしまたは防ぐのに有用である。当該酵素反応での色の変化を評価する、訓練された目視による0から5の尺度で、特定の有機物によっては低い反応であるが、+4から+5のランクが、一般に最適である。

10

#### 【0126】

この酵素試験は、商業的に利用可能であり、及び微生物に対する試験手順ならびに活性レベルを決定する方法は、当技術分野では公知である。その他の特徴には、例えば、発酵酵素及び酵素プロファイルが公知の細菌種に対する、*Saccharomyces cerevisiae*のスクリーニングを含む。菌株が、証明された発酵経路に参加する、特定酵素の高い酵素活性を有するかどうかを決定するために、微生物を試験することは、微生物培養体において良好に活躍する微生物の特定を可能にする。独立したコロニーの単離及びそれらの酵素プロファイル試験は、その酵素の強力発現因子の単離を可能にする。その他の機能的スクリーニング試験が、微生物培養体における微生物を特徴づけるために利用可能である。

20

#### 【0127】

##### 胞子の形成

微生物の基準が、胞子の形成もしくは無形成であって良い。例えば、菌株は、飢餓状態の培地から栄養豊富な培地に移された場合の、それらの応答性に基づいて選択されて良い。飢餓状態の培地から栄養豊富な培地に移された場合に積極的な増殖を示す菌株、及びまたその飢餓状態の培地において、胞子形成の減少を示す、または低量の胞子形成を示す菌株は、最適であろう。胞子の形成に不利な条件を克服する種は、微生物培養体にとって最適ではないであろう。

30

#### 【0128】

##### 温度

微生物培養体に植菌される微生物の選択基準は、異なる温度でのその微生物の増殖であって良い。例えば、1つ以上の*Bacillus*株を、好気性条件の異なる温度での増殖能力に基づいて選択した。15°C～40°Cの異なる温度での、経時におけるOD及びpHによる、細菌数の成長曲線を、選択基準に使用した。選択された株は、硝酸塩の存在下で増殖でき、嫌気性条件下で増殖できるであろうし、またはその他の選択された特徴を有する。例えば、微生物培養体に有用な*Bacillus*は、+5レベルのセルラーゼ、+2から+3レベルのプロテアーゼ、少なくとも+4のファターゼ(fatase)、8%硝酸培地での増殖、30°Cから40°Cの温度範囲での増殖、及び胞子を形成しないことによって特徴づけられる。

40

#### 【0129】

*B. subtilis*は、末端電子受容体として硝酸または亜硝酸を使用することによって、または発酵によってのいずれかにおいて、嫌気的に増殖する。2成分のシグナル伝達系は、嫌気呼吸を支配する制御経路における初期段階である。嫌気的遺伝子制御におけるResD及びResEの役割の1つは、酸素制限下でのfnr転写の誘導である。FnRは、呼吸性の硝酸還元酵素、nargHJIに対応するものを含む、嫌気的に誘導された遺伝子に対する、転写誘導因子である。*B. subtilis*は、2つの異なる硝酸還元

50

酵素を有し、1つは、硝酸塩窒素の同化に対してであり、及びその他は、硝酸塩呼吸に対してである。対照的に、1つの亜硝酸還元酵素は、亜硝酸窒素の同化及び亜硝酸呼吸の両方に機能する。ピルビン酸ギ酸リーゼを利用する、多数の嫌気性菌とは異なり、*B. subtilis* は、外部電子受容体の存在下で、発酵を遂行でき、ここではピルビン酸脱水素酵素が、ピルビン酸塩を代謝するために利用されている。*B. subtilis* は一般に、15～40で観察される遺伝子発現を伴い、25～37で増殖する。

### 【0130】

#### 酸素代謝及び栄養素濃度

本開示の当該無細胞組成物の調合に使用する培養体に植菌するため、酸素代謝及び栄養素濃度の選択基準を、微生物を特徴づけるために使用して良い。例えば、*Lactobacillus* 株は、その増殖培地における酸素濃度または栄養素濃度に依存している、代謝活性を調整する能力に基づいて、及びその延長線上で、その乳酸菌が、本開示の組成物が使用される場合の特定環境において、どんな活性を有するかに基づいて、選択されて良い。例えば、*Lactobacillus* は、乳糖及びその他の糖を乳酸に転換する。この乳酸の生成は、その乳酸菌環境を酸性にし、いくつかの有害な細菌の繁殖を阻害する。当該培養体における主要な酸性化した微生物叢は一般に、その環境の pH を制御する。この特徴は、低 pH 組成物を与えるため、生物刺激または生物学的保護に対応して提供される場合、本開示の方法を可能にする。そのような組成物は、2年を超えて長い保存寿命を有しているであろう。特定の乳酸菌株、例えば、*L. plantarum* において、乳酸の分泌は、その pH が、pH 3 を下回る場合には下方制御され、及び pH 4～5 が最適であるのに対して、その pH が、非常に高い場合は、上方制御される。

10

20

30

40

### 【0131】

本開示の無細胞組成物の調合に使用する培養体の植菌において使用される、*Lactobacillus* 株は、室温での長期保存寿命に対応した安定性を与える処方物に、その成分提供を補助するそれらの能力に基づいて選択されて良い。例えば、仮に本開示の組成物が、封止されまたは密閉された容器に室温で保管される場合、その容器を開封して、及び既知微生物による希釈ステップによってその組成物を再活性化し、ならびに糖蜜（栄養源）の添加、及び 30～37 での培養によって、その組成物の生物学的活性を測定する。その pH が 3.7 まで下がったことを観測し、及び 5～7 日以内であることをモニターする。室温で保管され、封止された容器中の本開示の組成物は、2ヶ月を超えて長い、4ヶ月を超えて長い、6ヶ月を超えて長い、8ヶ月を超えて長い、10ヶ月を超えて長い、12ヶ月を超えて長い、18ヶ月を超えて長い、24ヶ月を超えて長い、30ヶ月を超えて長い、または 36 ヶ月を超えて長い保存寿命を有する。

### 【0132】

#### 酵母及び真菌類

有益な酵母、真菌及び麹菌は、本開示の当該無細胞組成物に、酵素、タンパク質、脂肪酸、及び培養中に細胞から活発に分泌された、または溶解細胞からの、その他の小分子成分などの成分を与える。いかなる特定の理論にも拘束されることを望まないが、そのような分泌成分は、対象植物の成長を直接刺激することによる直接的な生物刺激効果を、及び / または例えば、コロニーを形成するためのその植物の生育環境及びその他の微生物活性に存在する、多様な微生物種の能力を高めることによる間接的な生物刺激効果を与える。本開示の組成物において、酵母、真菌及び麹菌は、酵素、タンパク質、脂肪酸、及び生物刺激を与えるその他の小分子成分、ならびにその環境に存在する嫌気性光合成細菌を維持するための細胞残屑などの成分を与える。本開示の組成物の特定利用に有用であろう酵母または真菌の特徴は、それらが、ヒト及び動物に対して非病原性であり及び無毒性であること、及びそれらが、ヒト及び動物に対して非病原性であり及び無毒性である、当該無細胞組成物に見出される成分を分泌する、ということである。

### 【0133】

#### 植物の成長を促す方法

1つの態様において、本明細書の開示は、開示された無細胞上清組成物を、種子に、植

50

物に、または特定の成長段階で植物に、もしくはそれらの組み合わせで与えること、その結果として植物の成長を促すことを含む、植物の成長を促す方法である。組成物には、単離された微生物で植菌された微生物培養体の無細胞上清を含み、ここでその微生物には、*Aspergillus spp.*、*Bacillus spp.*、*Rhodopseudomonas spp.*、*Candida spp.*、*Lactobacillus spp.*、*Lactococcus spp.*、*Pseudomonas spp.*、*Saccharomyces spp.*、または*Streptococcus spp.*もしくはそれらの組み合わせを含む。1つの態様において、当該微生物培養体は、IN-M1を含む。1つの態様において、当該微生物培養体は、IN-M2を含む。

【0134】

開示された無細胞上清組成物を、種子に、植物に、または特定の成長段階で植物に、もしくはそれらの組み合わせで与えることまたは処理すること、その結果として、未処理の植物と比べて処理した植物の成長を促すことを含む、植物の成長を促す方法であって、ここで当該無細胞上清組成物を与えることが、当該無細胞上清を植物の種子に適用すること含み、またはここで当該無細胞上清組成物を与えることが、当該無細胞上清を植物の根に適用すること含み、ここで当該無細胞上清組成物を与えることが、当該無細胞上清を植物の葉または茎に適用することを含む。当該方法には、その植物が、水耕栽培条件下で成長する、またはその植物が、気耕栽培条件または気耕及び水耕を組み合わせた栽培条件下で成長する、もしくはその植物が、温室で成長する、またはその植物が、野外農地で成長する植物を含んで良い。

10

【0135】

開示された無細胞上清組成物を、種子に、植物に、または特定の成長段階で植物に、もしくはそれらの組み合わせで与えることまたは処理すること、その結果として、未処理の植物と比べて処理した植物の成長を促すことを含む、植物の成長を促す方法であって、ここで植物の成長を促すことが、生長点組織の分化の刺激であり、またはここで植物の成長を促すことが、種子の増加した発芽率であり、ここでその増加した発芽率が、当該無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似した種子の発芽率より、10%、15%、または20%を超えて大きく、ここで発芽率が、無細胞培養液において誘導された非生物的ストレスの実験条件下で、0～70時間の期間にわたって決定される。開示された無細胞上清組成物を、種子に、植物に、または特定の成長段階で植物に、もしくはそれらの組み合わせで与えることまたは処理すること、その結果として、未処理の植物と比べて処理した植物の成長を促すことを含む、植物の成長を促す方法であって、ここで植物の成長を促すことが、葉面積または乾燥バイオマスの増加であり、ここでその葉面積の増加が、当該無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似した植物の葉面積と比べて、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、22%、24%、26%、28%、または30%であり、またはここでその乾燥バイオマスの増加が、当該無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似した植物の乾燥バイオマスと比べて、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、22%、24%、26%、28%、または30%である。開示された無細胞上清組成物を、種子に、植物に、または特定の成長段階で植物に、もしくはそれらの組み合わせで与えることまたは処理すること、その結果として、未処理の植物と比べて処理した植物の成長を促すことを含む、植物の成長を促す方法であって、ここで植物の成長を促すことが、当該無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似した植物の果実生産量と比べた、当該無細胞上清を与えられた植物の果実生産量の増加である。開示された無細胞上清組成物を、種子に、植物に、または特定の成長段階で植物に、もしくはそれらの組み合わせで与えることまたは処理すること、その結果として、未処理の植物と比べて処理した植物の成長を促すことを含む、植物の成長を促す方法であって、ここで植物の成長を促すことが、当該無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似した植物の生産寿命と比べた、当該無細胞上清を与えられた植物の生産寿命の増加である。開示された無細

20

30

40

50

胞上清組成物を、種子に、植物に、または特定の成長段階で植物に、もしくはそれらの組み合わせで与えることまたは処理すること、その結果として、未処理の植物と比べて処理した植物の成長を促すことを含む、植物の成長を促す方法であって、ここで植物の成長を促すことが、当該無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似した植物の生産期間と比べた、当該無細胞上清を与えられた植物の生産期間の増加である。

### 【0136】

本開示の組成物の使用法には、植物の成長に影響を与え、植物の成長を促し、調整し、刺激したまは助け、植物が成長する部位に、植物に、または特定の成長段階で植物に、もしくはそれらの組み合わせで、無細胞上清組成物を含ませ、与え、そのため処理した植物の成長が、類似の未処理の植物と比べて、増加し、高められまたは刺激される方法を含む。方法には、当該無細胞上清組成物を、植物の種子に適用することを含んで良い。方法には、成長培地にその植物を植える前のまたは植えた後のいずれかで、当該無細胞上清組成物を植物の根に適用することを含んで良い。方法には、当該無細胞上清組成物を植物の葉及び／または茎に適用することを含んで良い。方法には、本開示の無細胞上清組成物の有効量を、その植物に、植物の種子に、その植物が植えられている土壤（または成長培地）に、またはその植物に与えられている水もしくはその他の液体に適用することによって、種子の発芽を促進することを含んで良く、ここでその種子の発芽が、例えば、未処理の種子と比べて、より早い発芽またはより良好な成長によって、促進される。方法には、本開示の無細胞上清組成物の効果的な量を、その植物に、植物の種子に、その植物が植えられている土壤（または成長培地）に、またはその植物に与えられている水もしくはその他の液体に適用することによって、根の生成を促進することを含んで良く、ここでその処理された植物が、未処理の植物と比べて、根の生成が促進される。方法には、本開示の無細胞上清組成物の効果的な量を、その植物に、植物の種子に、その植物が植えられている土壤（または成長培地）に、またはその植物に与えられている水もしくはその他の液体に適用することによって、未処理の植物と比べた、処理された植物の単位収穫量を増加させることを含んで良い。方法には、本開示の無細胞上清組成物の効果的な量を、その植物に、植物の種子に、その植物が植えられている土壤（または成長培地）に、またはその植物に与えられている水もしくはその他の液体に適用することによって、未処理の植物と比べた、処理された植物のバイオマスを増加させることを含んで良い。方法には、本開示の無細胞上清組成物の効果的な量を、その植物に、植物の種子に、その植物が植えられている土壤（または成長培地）に、またはその植物に与えられている水もしくはその他の液体に適用することによって、未処理の植物と比べた、処理された植物の果実生産量を増加させることを含んで良い。方法には、本開示の無細胞上清組成物の効果的な量を、その植物に、植物の種子に、その植物が植えられている土壤（または成長培地）に、またはその植物に与えられている水もしくはその他の液体に適用することによって、未処理の植物と比べた、処理された植物の生産期間を増加させることを含んで良い。方法には、本開示の無細胞上清組成物の効果的な量を、その植物に、植物の種子に、その植物が植えられている土壤（または成長培地）に、またはその植物に与えられている水もしくはその他の液体に適用することによって、未処理の植物と比べた、処理された植物の生産寿命を増加させることを含んで良い。当該方法は、水耕栽培条件下で植物を成長させる方法の利用を含んで良い。当該方法は、温室で植物を成長させる方法の利用を含んで良い。方法は、農場または野外で植物を成長させる方法の利用を含んで良い。方法は、気耕栽培条件下で、または水耕及び気耕栽培を組み合わせた条件下で植物を成長させる方法の利用を含んで良い。方法は、水植栽培農法を伴う方法の利用を含んで良い。

### 【0137】

1つ以上の混合培養体、例えば、IN-M1またはIN-M2、もしくはIN-AO1、IN-BS1、IN-RP1、IN-RP2、IN-LH1、IN-LC1、IN-LL1、IN-LP1、IN-LR1、及びIN-SC1の1つ以上を、組み合わせてまたは単独で、及び／またはその他の微生物を伴って含む組成物などの、単離された微生物で植菌された微生物培養体から作られる、無細胞上清組成物の使用は、菌根菌を持つ有機物

10

20

30

40

50

で栽培される植物の成長の刺激、栄養溶液中の藻類の繁殖の抑制、一般的な植物感染の抑制、及びゴルフ場グリーンの芝草上での藻類成長ならびに栽培植物の葉上にはえるカビの抑制を示した。

#### 【0138】

本発明の組成物及び方法には、種子の発芽の増進を含む。したがって、多様な態様において、1つ以上の混合培養体、例えば、IN-M1またはIN-M2、もしくはIN-A01、IN-B51、IN-RP1、IN-RP2、IN-LH1、IN-LC1、IN-LL1、IN-LP1、IN-LR1、及びIN-SC1の1つ以上を、組み合わせてまたは単独で、及び／またはその他の微生物を伴って含む組成物などの、単離された微生物で植菌された微生物培養体から作られる、無細胞上清組成物を、種子、例えば、大豆の種子に与えることが、種子の発芽を促進して良い。多様な態様において、例えば、ゴルフコースで使用されるものなどの、芝草における種子の発芽は、1つ以上の混合培養体、例えば、IN-M1またはIN-M2、もしくはIN-LH1、IN-B51、IN-SC1、及び／またはIN-RP1を、組み合わせてまたは単独で、及び／またはその他の微生物を伴って含む組成物などの、単離された微生物で植菌された微生物培養体から作られる、無細胞上清組成物で、その芝草の種子を処理することによって、促進されて良い。10

#### 【0139】

1つの態様において、当該無細胞上清組成物を与えることには、植物の種子に、その無細胞上清を適用することを含む。1つの態様において、当該無細胞上清組成物を与えることには、植物の根に、その無細胞上清を適用することを含む。1つの態様において、当該無細胞上清組成物を与えることには、植物の葉、または茎に、その無細胞上清を適用することを含む。1つの態様において、当該無細胞上清組成物を与えることには、植物に与えられる水またはその他の液体組成物に、無細胞上清組成物を添加することを含む。例えば、無細胞上清組成物を、灌漑システムに添加して良く、そのためその灌漑用水が与えられる際に、当該無細胞上清組成物が与えられる。20

#### 【0140】

1つの態様において、種子は、本明細書に記述の1つ以上の組成物で被覆される。1つの態様において、種子は、複数の方法、例えば、噴霧または滴下を介して、本明細書に記述の1つ以上の組成物（複数可）で処理されて良い。噴霧及び滴下処理は、本明細書に記述の組成物を配合し、及びドラム型の処理装置などの、（種子の連続的な流れに比例して、予め定められた割合で処理を施すように調整されている）連続処理システムを介して、その組成物（複数可）を種子（複数可）上に噴霧または滴下することによって、実施されて良い。予め定められたバッチサイズの種子及び本明細書に記述の組成物（複数可）を混合器に送り込んだ、バッチシステムをまた取り入れて良い。これらのプロセスを行うシステム及び装置は、例えばBayer CropScience (Gustafson)社などの多数のサプライヤーから、市販されている。30

#### 【0141】

他の態様において、種子の処理には、種子を被覆することを含む。1つのそのようなプロセスは、1つ以上の本明細書に記述の組成物（複数可）を丸い容器の内壁に被覆し、種子を添加し、次いでその容器を、その種子が壁及び当該組成物（複数可）に接触を起こすように回転する、「container coating（容器被覆）」として当技術分野で公知のプロセスを関与させる。種子は、被覆方法の組み合わせによって、被覆され得る。種子の浸漬は通常、記述の当該組成物の溶液形態の使用を含む。例えば、種子を、約1分から約24時間（例えば、少なくとも1分間、5分間、10分間、20分間、40分間、80分間、3時間、6時間、12時間、24時間）の間、浸漬できる。40

#### 【0142】

1つの態様において、処理される植物は、水耕栽培条件下で成長する。1つの態様において、処理される植物は、気候栽培条件、または気候栽培と水耕栽培条を組み合わせた条件下で成長する。1つの態様において、処理される植物は、温室で成長する。1つの態様において、処理される植物は、野外農地で成長する。50

**【 0 1 4 3 】**

1つの態様において、促進された植物成長には、未処理の植物と比べた、生長点の分化の刺激を含む。1つの態様において、促進された植物成長には、未処理の種子と比べた、処理された種子の増加した発芽率を含む。

**【 0 1 4 4 】**

1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された種子の増加した発芽率は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の種子の発芽率と比べて、5%を超えて大きい。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された種子の増加した発芽率は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の種子の発芽率と比べて、10%を超えて大きい。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された種子の増加した発芽率は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の種子の発芽率と比べて、15%を超えて大きい。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された種子の増加した発芽率は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の種子の発芽率と比べて、20%を超えて大きい。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された種子の増加した発芽率は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の種子の発芽率と比べて、25%を超えて大きい。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された種子の増加した発芽率は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の種子の発芽率と比べて、10%、15%、20%、30%、40%、50%を超えて、またはそれ以上大きい。

10

**【 0 1 4 5 】**

1つの態様において、当該発芽率は、無細胞培養液中で、誘導された非生成物的ストレスの実験条件下で、0~70時間に期間にわたって決定される。

20

**【 0 1 4 6 】**

1つの態様において、植物の成長を促進することは、葉面積または乾燥バイオマスの増加である。1つの態様において、植物の成長を促進することは、葉面積の増加である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の葉面積と比べて、5%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の葉面積と比べて、6%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の葉面積と比べて、7%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の葉面積と比べて、8%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の葉面積と比べて、9%である。1つの態様において、当該葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の葉面積と比べて、10%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の葉面積と比べて、11%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の葉面積と比べて、12%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の葉面積と比べて、13%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の葉面積と比べて、14%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の葉面積と比べて、15%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の葉面積と比べて、16%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似

30

40

50

の植物の葉面積と比べて、17%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかつた、実質的に類似の植物の葉面積と比べて、18%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかつた、実質的に類似の植物の葉面積と比べて、19%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかつた、実質的に類似の植物の葉面積と比べて、20%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかつた、実質的に類似の植物の葉面積と比べて、22%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかつた、実質的に類似の植物の葉面積と比べて、24%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかつた、実質的に類似の植物の葉面積と比べて、26%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかつた、実質的に類似の植物の葉面積と比べて、28%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかつた、実質的に類似の植物の葉面積と比べて、30%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の葉面積の増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかつた、実質的に類似の植物の葉面積と比べて、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、24%、26%、28%、30%、40%、50%、またはそれ以上である。

【 0 1 4 7 】

イオマスの増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の乾燥バイオマスと比べて、17%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の乾燥バイオマスの増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の乾燥バイオマスと比べて、18%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の乾燥バイオマスの増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の乾燥バイオマスと比べて、19%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の乾燥バイオマスの増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の乾燥バイオマスと比べて、20%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の乾燥バイオマスの増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の乾燥バイオマスと比べて、22%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の乾燥バイオマスの増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の乾燥バイオマスと比べて、24%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の乾燥バイオマスの増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の乾燥バイオマスと比べて、26%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の乾燥バイオマスの増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の乾燥バイオマスと比べて、28%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の乾燥バイオマスの増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の乾燥バイオマスと比べて、30%である。1つの態様において、無細胞上清組成物で処理された植物の乾燥バイオマスの増加は、その無細胞上清組成物を与えられなかった、実質的に類似の植物の乾燥バイオマスと比べて、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、22%、24%、26%、28%、30%、40%、50%、またはそれ以上である。

10

20

20

30

40

50

#### 【0148】

1つの態様において、植物の成長を促進することは、無細胞上清組成物与えられた植物の果実生産量の、その無細胞上清組成物を与えられなかった実質的に類似の植物の果実生産量と比べた増加である。

#### 【0149】

1つの態様において、植物の成長を促進することは、無細胞上清組成物与えられた植物の生産寿命の、その無細胞上清組成物を与えられなかった実質的に類似の植物の生産寿命と比べた増加である。

#### 【0150】

1つの態様において、植物の成長を促進することは、無細胞上清組成物与えられた植物の生産期間の、その無細胞上清組成物を与えられなかった実質的に類似の植物の生産期間と比べた増加である。

#### 【0151】

##### 物品の製造法

1つの態様において、本明細書の開示は、物品の表面に当該開示の無細胞上清組成物を与えることを含んだ、無細胞上清を含有する物品の製造法である。方法には、当該無細胞上清組成物を物品に適用すること、及び次いでその組み合わされた無細胞上清組成物と物品を、その無細胞上清組成物が、その物品の表面に付着するように乾燥することのステップを含んで良い。方法には、物品の1つ以上の表面が、当該無細胞上清組成物の付着を助けるように処理されるステップを含んで良い。方法には、当該無細胞上清組成物の表層または当該物品の表面への付着を助けるために、当該無細胞上清組成物に1つ以上の成分を添加することを含んで良い。方法には、当該無細胞上清組成物の表層への付着を助けるために、当該無細胞上清組成物及び、物品の1つ以上の表面の両方に、1つ以上の成分を添加することを含んで良い。そのような成分は、当該無細胞上清組成物の当該物品の表面への付着を助ける任意の物質、化合物または分子であって良い。例えば、接着のり、デンプン、天然素材、高分子材料、及び表面や物品に付着することが知られている材料などの成

分が、使用されて良い。方法には、その表層または物品が、ガラスピーズ、不活性材料、織物材料、不織布材料、植物材料などの天然素材、ココマット、シリカビーズ、高分子材料、植物容器、容器、フィルター構造体、多孔質不活性粒子、またはゼオライトである、表層または物品を含んで良い。付着した本開示の無細胞上清組成物を伴って作られた物品は、本開示によって熟考される。

#### 【0152】

10  
物品の表面に、開示された無細胞上清組成物を与えることを含む、無細胞上清を含有する物品の製造法である。当該方法にはさらに、当該無細胞上清を与えられた後で乾燥される、物品の乾燥を含んで良い。当該方法にはさらに、当該物品の表面に、当該無細胞上清組成物を与える前に、その物品の表面を処理するステップを含んで良い。当該方法にはさらに、当該物品の表面に、当該無細胞上清組成物を与えた後で、その物品の表面を処理するステップを含んで良い。無細胞上清組成物を含む物品を提供する方法であって、ここでその無細胞上清組成物を与えることが、噴霧であり、またはここで、その無細胞上清組成物を与えることが、その無細胞上清組成物を入れた容器に、その物品を浸漬することである。当該方法はさらに、当該無細胞上清組成物に、1つ以上の表面付着助剤を添加することを含んで良く、ここでその表面付着助剤が、当該物品の表面に、当該無細胞上清組成物の1つ以上の成分の付着を促進し、またはここでその表面付着助剤が、当該無細胞上清組成物の1つ以上の成分を、その物品の表面に結合することができ、もしくはここで、表面付着助剤が化学物質であり、またはここでその化学物質が、該無細胞上清組成物の1つ以上の成分と当該物品の表面との間に、可逆的な化学的結合を提供し、もしくはここで、その化学物質が、該無細胞上清組成物の1つ以上の成分と当該物品の表面との間に、不可逆的な化学的結合を提供し、またはここで、その表面付着助剤が、核酸、蛋白質、オリゴヌクレオチド、もしくはペプチドである。無細胞上清組成物を含む物品を提供する方法であって、ここでその物品が、バイオ炭、ビーズ、フィルター、容器、ナノ粒子、微粒子、マット材、ふるい網、パウダー、微粒子、または布、織物材料、不織布材料、植物材料、マット材、容器、高分子材料、多孔質材料、非多孔質材料、またはゼオライトである。

20

20

20

#### 【0153】

1つの態様において、方法は、当該無細胞上清組成物を当該物品に与えた後で、その無細胞上清組成物で被覆された物品を乾燥することを含む。

30

#### 【0154】

1つの態様において、方法は、当該無細胞上清組成物を当該物品の1つ以上の表面に与える前に、物品の1つ以上の表面を処理するステップを含む。

#### 【0155】

1つの態様において、方法は、当該無細胞上清組成物を当該物品の1つ以上の表面に与えた後で、その物品の1つ以上の表面を処理するステップを含む。

#### 【0156】

1つの態様において、当該無細胞上清組成物を与えることは、当該物品を、その無細胞上清組成物で噴霧することを含む。1つの態様において、当該無細胞上清組成物を当該物品に与えることは、無細胞上清組成物を入れた容器に、その物品を浸漬することを含む。

40

#### 【0157】

1つの態様において、方法には、当該無細胞上清組成物への1つ以上の表面付着助剤の添加を含み、ここでその表面付着助剤が、当該物品の1つ以上の表面への、当該無細胞上清の1つ以上の成分の付着を促進する。1つの態様において、当該表面付着助剤は、当該物品の1つ以上の表面に、当該無細胞上清の1つ以上の成分を結合できる。1つの態様において、当該表面付着助剤は、化学物質である。1つの態様において、この化学物質は、当該無細胞上清の1つ以上の成分と当該物品の1つ以上の表面との可逆的な化学結合を与える。1つの態様において、当該化学物質は、当該無細胞上清の1つ以上の成分と当該物品の1つ以上の表面との不可逆的な化学結合を与える。1つの態様において、当該表面付着助剤は、核酸、タンパク質、オリゴヌクレオチド、またはペプチドである。

50

#### 【0158】

1つの態様において、当該物品は、バイオ炭、ビーズ、フィルター、容器、ナノ粒子、微粒子、マット材、ふるい網、パウダー、微粒子、または布である。1つの態様において、当該物品は、織布材料、不織布材料、植物材料、マット材、容器、高分子材料、多孔質材料、非多孔質材料、またはゼオライトである。

#### 【0159】

##### 無細胞上清組成物の調合法

1つの態様において、本明細書の開示は、(a) 単離された微生物で、発酵培養液とも呼ばれる培養地に植菌することによって、本明細書に開示の微生物培養体を形成することであって、ここでその微生物が、微生物培養体を形成する、IN-M1、In-M2、本明細書に開示の堆積させた菌株、*Aspergillus spp.*、*Bacillus spp.*、*Rhodopseudomonas spp.*、*Candida spp.*、*Lactobacillus spp.*、*Pseudomonas spp.*、*Saccharomyces spp.*、または*Streptococcus spp.*、もしくはそれらの組み合わせなどの本明細書に開示の微生物を含み、(b) その微生物培養体を、少なくとも5日間培養すること、及び(c) ステップ(b)の後で、その微生物培養体を、少なくとも10分間、10,000×gの遠心力で遠心分離し、その結果、その微生物培養体の液体から、微生物を含む遠心分離物質を単離し、及び当該無細胞上清組成物を提供すること、のステップを含む無細胞上清組成物の調合法である。方法には、当該微生物培養体の特徴を測定することを含んで良い。当該微生物培養体の特徴を測定することは、1つ以上のその他の選択された微生物による、1つ以上の選択された微生物の捕食を測定すること、1つ以上の微生物により放出または作られた因子またはタンパク質、pH変化、もしくは1つ以上の選択された微生物によって排出された、細胞外酵素及び1つ以上のその他の選択された微生物に及ぼす影響を測定すること、当該微生物培養体における、1つ以上の選択された微生物の1mLあたりの細胞数を測定すること、1つ以上の選択された微生物の増殖率、または特性及び測定値の組合せを決定すること、を含んで良い。方法には、1つ以上の微生物を、当該微生物培養体から除去するかどうか、または1つ以上の微生物を、当該微生物培養体に添加するかどうかを決定するために、当該微生物培養体の測定された特徴を利用することを含んで良い。方法には、1つ以上の微生物が、当該微生物培養体から除去されている場合を含んで良く、その方法には、当該微生物培養体を殺菌することを含んで良い。方法には、1つ以上の微生物が、当該微生物培養体に添加される場合、当該方法が、1つ以上の望ましい単離された微生物を、当該微生物培養体に添加すること、及びその微生物培養体を、微生物培養体を產生するために予め定められた細胞濃度に増殖させること、ならびに任意で、その微生物培養体の全部または一部を容器に詰めることのステップを含んで良い。方法には、1回以上、方法のそのステップを繰り返すことを含んで良い。方法には、単独の微生物培養体を形成するために、当該微生物培養体の細胞を、特定濃度まで増殖させることを含んで良い。方法には、1つ以上の微生物培養体を作り、及び微生物培養体を形成するために、単独の微生物培養体を組み合わせることを含んで良い。方法には、微生物培養体を特定濃度まで増殖させ、及びその微生物培養体の全部または一部を容器に詰めること、を含んで良い。当該方法には、当該微生物培養体を増殖させ、及びその微生物培養体の特徴を測定することを含んで良い。方法には、1つ以上のその他の選択された微生物による、1つ以上の選択された微生物の捕食を測定すること、当該微生物により排出された因子、pH変化、または1つ以上の選択された微生物によって排出された、細胞外酵素及び1つ以上のその他の選択された微生物に及ぼす影響を測定すること、当該微生物培養体における、1つ以上の選択された微生物の1mLあたりの細胞数を測定すること、1つ以上の選択された微生物の増殖率、または特性及び測定値の組合せを決定することを含む、当該微生物培養体の特徴を測定するステップを含んで良い。方法には、1つ以上の微生物を、当該培養された混合培養体から除去するかどうか、または1つ以上の微生物を、当該培養された混合培養体に添加するかどうか、もしくは微生物に変化を起こさないかどうかを決定するために、当該微生物培養体の測定された特徴を利用することを含んで良い。

10

20

30

40

50

## 【0160】

無細胞上清組成物の調合法であって、(a) 単離された微生物で、発酵培養液を植菌すること、ここでその微生物には、*Aspergillus spp.*、*Bacillus spp.*、*Rhodopseudomonas spp.*、*Candida spp.*、*Lactobacillus spp.*、*Pseudomonas spp.*、*Saccharomyces spp.*、または*Streptococcus spp.*、もしくはそれらの組み合わせを含み、(b) その植菌された発酵培養液を、少なくとも5時間培養すること、(c) ステップ(b)の後で、その培養体を、少なくとも10分間、少なくとも14,000×gの遠心力で遠心分離すること、及び(d) 0.22umMCEフィルターでろ過し、その結果、当該無細胞上清を提供すること、のステップを含む。当該 *Aspergillus spp.* が、*Aspergillus oryzae* である方法であって、またはここで当該 *Aspergillus spp.* が、IN-AO1 の指定を伴い、顧客番号 200139 の下、ATCC 特許寄託指定番号 PTA-121551 で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下の ATCC 特許寄託により寄託された、*Aspergillus oryzae* の、IN-AO1 である。当該 *Bacillus spp.* が、*Bacillus subtilis* である方法であって、またはここで当該 *Bacillus spp.* が、ATCC 特許寄託指定番号 PTA-12385 である、*Bacillus subtilis* の、IN-B51 である。当該 *Rhodopseudomonas palustris* である方法であって、またはここで当該 *Rhodopseudomonas spp.* が、ATCC 特許寄託指定番号 PTA-12387 である、*Rhodopseudomonas palustris* の、IN-RP1 である。当該 *Candida spp.* が、*Candida utilis* である方法であって、またはここで当該 *Candida spp.* が、IN-CU1 の指定を伴い、顧客番号 200139 の下、ATCC 特許寄託指定番号 PTA-121550 で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下の ATCC 特許寄託により寄託された、*Candida utilis* の、IN-CU1 である。当該 *Lactobacillus spp.* が、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus helveticus*、*Lactobacillus lactis*、*Lactobacillus rhamnosus*、または*Lactobacillus plantarum*、もしくはそれらの組み合わせである方法であって、またはここで当該 *Lactobacillus spp.* が、ATCC 特許寄託指定番号 PTA-12386 である、*Lactobacillus helveticus* の、IN-LH1 であり、またはここで当該 *Lactobacillus spp.* が、IN-LC1 の指定を伴い、顧客番号 200139 の下、ATCC 特許寄託指定番号 PTA-121549 で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下の ATCC 特許寄託により寄託された、IN-LC1 と呼ばれる、*Lactobacillus casei* であり、またはここで当該 *Lactobacillus spp.* が、IN-LL1 の指定を伴い、顧客番号 200139 の下、ATCC 特許寄託指定番号 PTA-121552 で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下の ATCC 特許寄託により寄託された、IN-LL1 と呼ばれる、*Lactobacillus lactis* であり、またはここで当該 *Lactobacillus spp.* が、IN-LP1 の指定を伴い、顧客番号 200139 の下、ATCC 特許寄託指定番号 PTA-121555 で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下の ATCC 特許寄託により寄託された、*Lactobacillus plantarum* の、IN-LP1 であり、もしくはここで当該 *Lactobacillus spp.* が、IN-LR1 の指定を伴い、顧客番号 200139 の下、ATCC 特許寄託指定番号 PTA-121554 で、2014年9月4日に、ブダペスト条約下の ATCC 特許寄託により寄託された、*Lactobacillus rhamnosus* の、IN-LR1 である。当該 *Pseudomonas spp.* が、*Pseudomonas aeruginosa* である方法である。当該 *Rhodopseudomonas palustris* である方

法であって、またはここでその *Rhodopseudomonas* spp. が、 ATCC 特許寄託指定番号 PTA - 12383 である、 *Rhodopseudomonas palustris* の、 IN - RP1 であり、もしくはここで当該 *Rhodopseudomonas* spp. が、 IN - RP2 の指定を伴い、顧客番号 200139 の下、 ATCC 特許寄託指定番号 PTA - 121553 で、 2014 年 9 月 4 日に、ブダペスト条約下の ATCC 特許寄託により寄託された、 *Rhodopseudomonas palustris* の、 IN - RP2 である。当該 *Saccharomyces* spp. が、 *Saccharomyces cerevisiae* である方法であって、またはここでその *Saccharomyces* spp. が、 ATCC 特許寄託指定番号 PTA - 12384 である、 *Saccharomyces cerevisiae* の、 IN - SC1 である。10 当該 *Streptococcus* spp. が、 *Streptococcus lactis* である方法である。当該微生物培養体がさらに、少なくとの 1 つの単離された菌根菌を含む方法である。当該微生物培養体が、 *Aspergillus* spp. 、 *Bacillus* spp. 、 *Rhodopseudomonas* spp. 、 *Candida* spp. 、 *Lactobacillus* spp. 、 *Pseudomonas* spp. 、 *Saccharomyces* spp. 、または *Streptococcus* spp. の少なくとも 2 つで植菌される方法である。当該微生物培養体が、 *Aspergillus oryzae* 、 *Bacillus subtilis* 、 *Lactobacillus helveticus* 、 *Lactobacillus casei* 、 *Rhodopseudomonas palustris* 、及び *Saccharomyces cerevisiae* で植菌される方法である。当該微生物培養体が、 ATCC 特許寄託指定番号 PTA - 12383 である、混合培養体の IN - M1 で植菌される方法である。当該微生物培養体が、 *Aspergillus oryzae* 、 *Bacillus subtilis* 、 *Candida utilis* 、 *Lactobacillus casei* 、 *Lactobacillus helveticus* 、 *Lactobacillus plantarum* 、 *Lactobacillus rhamnosus* 、 *Lactococcus lactis* 、 *Rhodopseudomonas palustris* 、及び *Saccharomyces cervisiae* で植菌される方法である。当該微生物培養体が、 IN - M2 の指定を伴い、顧客番号 200139 の下、 ATCC 特許寄託指定番号 PTA - 121556 で、 2014 年 9 月 4 日に、ブダペスト条約下の ATCC 特許寄託により寄託された、混合培養体の IN - M2 で植菌される方法である。20 さらに、当該無細胞上清を滅菌するステップ (e) を含む方法である。当該発酵培養液（微生物培養体）を培養する時間は、少なくとも 24 時間、または少なくとも 60 時間、もしくは少なくとも 120 時間、または少なくとも 360 時間である。無細胞上清組成物は、当該方法によって調合される。30

#### 【0161】

1 つの態様において、方法はさらに、当該無細胞上清を滅菌するステップ (e) を含む。40

#### 【0162】

1 つの態様において、滅菌は、ろ過滅菌による。

#### 【0163】

1 つの態様において、当該微生物培養体の培養期間は、少なくとも 24 時間である。1 つの態様において、当該微生物培養体の培養期間は、少なくとも 60 時間である。1 つの態様において、当該微生物培養体の培養期間は、少なくとも 120 時間である。1 つの態様において、当該微生物培養体の培養期間は、少なくとも 360 時間である。当業者は、微生物培養体の培養に対する効果的な期間を決定することができ、及びその時間は、その微生物培養体から誘導された当該無細胞上清組成物の使用方法に依存して良い。

#### 【0164】

1 つの態様において、無細胞上清は、遠心分離を介して微生物培養体の細胞を取り除くことによって、微生物培養体から形成される。遠心分離を通して、当該培養体の細胞成分

(すなわち、細菌)は、無細胞上清組成物を提供する目的に対応して、その上清から分離される。当該無細胞上清組成物の利用は、無細胞上清組成物の一部を、微生物培養体に添加することである。微生物培養体を作るステップは、その微生物培養体への、無細胞上清組成物の添加であって良い。

#### 【0165】

1つの態様において、遠心分離は、約1,000rpmから約15,000rpmで実施できる。1つの態様において、遠心分離は、約2,500rpmから約15,000rpmで実施できる。1つの態様において、遠心分離は、約5,000rpmから約15,000rpmで実施できる。1つの態様において、遠心分離は、約7,500rpmから約15,000rpmで実施できる。1つの態様において、遠心分離は、約10,000rpmから約15,000rpmで実施できる。1つの態様において、遠心分離は、約12,500rpmから約15,000rpmで実施できる。1つの態様において、遠心分離は、約1,000rpmから約12,500rpmで実施できる。1つの態様において、遠心分離は、約1,000rpmから約10,000rpmで実施できる。1つの態様において、遠心分離は、約1,000rpmから約7,500rpmで実施できる。1つの態様において、遠心分離は、約1,000rpmから約5,000rpmで実施できる。1つの態様において、遠心分離は、約1,000rpmから約2,500rpmで実施できる。

10

#### 【0166】

1つの態様において、無細胞上清は、微生物培養体から形成(または誘導、生成、もしくは製造)され、ここでその細胞または固体物質が、遠心分離を介して当該微生物培養体の液体部分から分離される。1つの態様において、ろ過は、限外ろ過膜で達成される。限外ろ過膜の形成に通常使用される、高性能合成ポリマーの例示には、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、及びポリアクリロニトリルを含む。

20

#### 【0167】

1つの態様において、限外ろ過膜は、約0.01μMから約0.1μMの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約0.03μMから約0.1μMの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約0.05μMから約0.1μMの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約0.07μMから約0.1μMの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約0.09μMから約0.1μMの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約0.01μMから約0.09μMの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約0.01μMから約0.07μMの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約0.01μMから約0.05μMの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約0.01μMから約0.03μMの細孔径を有する。

30

#### 【0168】

1つの態様において、限外ろ過膜は、約1,000分画分子量(NMWC)から約750,000NMWCの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約3,000NMWCから約750,000NMWCの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約5,000NMWCから約750,000NMWCの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約10,000NMWCから約750,000NMWCの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約30,000NMWCから約750,000NMWCの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約750,000NMWCの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約50,000NMWCから約750,000NMWCの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約100,000NMWCから約750,000NMWCの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約300,000NMWCから約750,000NMWCの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約500,000NMWCから約750,000NMWCの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約1,000NMWCから約500,000NMWCの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約1,000NMWCから約300,000NMWCの細孔径を有する。

40

50

孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約1,000NMWCから約100,000NMWCの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約1,000NMWCから約750,000NMWCの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約1,000NMWCから約50,000NMWCの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約1,000NMWCから約30,000NMWCの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約1,000NMWCから約10,000NMWCの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約1,000NMWCから約5,000NMWCの細孔径を有する。1つの態様において、限外ろ過膜は、約1,000NMWCから約3,000NMWCの細孔径を有する。

## 【0169】

10

1つの態様において、当該限外ろ過膜は、中空糸クロスフロー限外ろ過膜である。中空糸膜のクロスフローろ過は、通常は、細菌または哺乳類細胞の培養体の「dewatering（脱水）」である、細胞濃縮に広く採用されている。このプロセスは通常、粒子の単純な濃縮と考えられているが、しかし均質化（すなわち、微流体化）などの後続ステップの前に、媒体成分を取り除く細胞洗浄ステップを含んで良い。

## 【0170】

1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約0.0016m<sup>2</sup>から約0.0028m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約0.005m<sup>2</sup>から約28m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約0.010m<sup>2</sup>から約28m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約0.05m<sup>2</sup>から約28m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約0.1m<sup>2</sup>から約28m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約0.5m<sup>2</sup>から約28m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約1m<sup>2</sup>から約28m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約5m<sup>2</sup>から約28m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約10m<sup>2</sup>から約28m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約15m<sup>2</sup>から約28m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約20m<sup>2</sup>から約28m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約25m<sup>2</sup>から約28m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約0.0016m<sup>2</sup>から約25m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約0.0016m<sup>2</sup>から約20m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約0.0016m<sup>2</sup>から約15m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約0.0016m<sup>2</sup>から約10m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約0.0016m<sup>2</sup>から約5m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約0.0016m<sup>2</sup>から約1m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約0.0016m<sup>2</sup>から約0.5m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約0.0016m<sup>2</sup>から約0.1m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約0.0016m<sup>2</sup>から約0.05m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約0.0016m<sup>2</sup>から約0.01m<sup>2</sup>の有効面積を有する。1つの態様において、中空糸クロスフロー限外ろ過膜は、約0.0016m<sup>2</sup>から約0.005m<sup>2</sup>の有効面積を有する。

## 【0171】

20

30

40

50

記述された本開示の態様は、本開示の原則の適用のいくつかを説明していることは、理解されよう。多数の修正が、本開示の真の精神及び範囲から逸脱すること無しに、当業者によって行われて良い。

## 【0172】

本開示は、特定のそれらの態様を参照として記述してきた。しかしながら、多様な修正及び変更は、本開示の幅広い精神及び範囲から逸脱すること無しに、行われて良い。本明細書及び図面は、したがって、制限的な意味よりむしろ例示であるとみなされる。

## 【実施例】

## 【0173】

## 実施例1 - 無細胞上清組成物の調合に対応した、微生物培養体の作成法

細菌または酵母などの微生物を、当該組成物に含めるために、その酵素活性プロファイル、培地で増殖する能力、胞子形成の欠如、または本明細書に記述されるその他の基準に基づいて、選択した。当該微生物を、その有機物にとって標準的な培地で増殖させ、及び飛躍的な増殖段階で、等分し及び保管した。酵母及び細菌などの微生物を増殖させる培地は、当業者には公知である。

10

## 【0174】

例えば、I-M Lab の作成において、IN-LH1、IN-B S1 及び L. casei の各々の等分 ( $1 \times 10^6$  細胞の 5 mL) を、水 (700 mL)、糖蜜 (37.5 g)、ベントナイト粘土 (3.75 g)、及び海塩 (3.75 g) などを含んだ、乳酸菌及び桿菌に適した培地に添加した。その細菌を、600 nm で決定された、0.752 の光学密度 (以下、「OD<sub>600</sub>」) まで増殖させた。

20

## 【0175】

I-M PNSB の作成において、IN-RP1 の等分 ( $1 \times 10^6$  細胞の 5 mL) を、光合成菌に適した培地に添加した。例えば、水 (134 mL)、フィッシュエマルジョン (9 mL)、及び IN-SC1 ( $1 \times 10^6$  細胞、1 mL) を併用し、及び次いでその容積を、水で 144 mL に調整し、ならびにその細胞を、OD<sub>600</sub> が 0.856 まで増殖させた。炭水化物源 (すなわち、糖蜜) もまた、添加できる。本明細書で使用するフィッシュエマルジョンは、ケベック州、Dunham の Nutriversit 社から有機土壤改良剤 (非殺菌) として、市販されている。

20

## 【0176】

I-M Yeast の作成において、IN-SC1 及び A. oryzae (OD<sub>600</sub> 0.3、South River Miso Company, in Conway, Massachusetts, USA) の等分 ( $1 \times 10^6$  細胞の 5 mL) を、水 (390 mL)、糖蜜 (1 g)、フィッシュエマルジョン (29 g)、昆布 (9 g)、及び小麦胚芽 (1 g) を併用し、及びその容積を、水で 432 mL に調整し、ならびにその細胞を、OD<sub>600</sub> が 0.574 まで増殖させた。

30

## 【0177】

微生物培養体を作成するために、ATCC 特許寄託指定番号 PTA-12383 で寄託された、IN-M1 などの微生物を含む、3つの微生物培養体を使用した。I-M Lab、I-M PNSB 及び I-M Yeast を、以下に示す、水、糖蜜、ミネラル粉、海塩、及び小麦ふすまを含む培地に添加した。当該 3 つの微生物成分混合体を、以下の表に示すパーセンテージで添加した。IN-RP1、IN-B S1、IN-SC1、Aspergillus oryzae、IN-LH1、及び Lactobacillus casei を含んだ、このたね培養体 (初期の混合培養体) を、無菌状態で作成した。

40

組成物の成分	%
水	88.70
糖蜜	5.00
I-M LAB	2.00
I-M PNSB	2.00
I-M YEAST	1.00
ベントナイト粘度(ユタ州)	0.10
海塩(市販品)	0.10
小麦のふすま	0.10
合計	100

10

20

30

40

50

## 【0178】

糖蜜、海塩、小麦ふすま、及びミネラル粉を、温水に溶解し、及び45～50に維持した。このI-M LAB、I-M PNSB及びI-M Yeastを、別の容器と一緒に入れ、及び混ぜ合わせた。20LのI-M LAB、20LのI-M PNSB、及び10LのI-M Yeastで、その合計は、50Lであった(これら3つの微生物組成物を含む組成物を、本明細書ではたね培養体と呼ぶ)。このたね培養体を、培地の主タンクに添加し、及び110Lを作るために水を入れ、ならびにそのpHが、pH4.0以下になるまで、軽く攪拌しながら、その温度を37に維持した。

## 【0179】

1リットル当たり約10億の微生物( $1 \times 10^6$ 細胞/mL)を含んだ、安定的に濃縮された培養体(混合培養体)を産出するために、二次発酵培養体(混合培養体)を作成した。濃縮された組成物は、3年以上の保存期間を有している。典型的な1000リットルの2次発酵バッチを、50リットルの当該たね培養体(前述のように、20LがI-M LAB、20LがI-M PNSB、及び10LがI-M Yeastである)で植菌し、及びその培体は、50～200リットルの非硫黄化農業用糖蜜、3.75リットルの小麦ふすま(0.02～0.05容積%)、3.75リットルの昆布(0.02～0.05容積%)、3.75リットルのベントナイト粘度(0.02～0.05容積%)、1.25リットルのフィッシュエマルジョン(Nutriver, Dunham, Quebec社から市販の有機土壤改良剤、非殺菌)、1.25リットルの大穀粉(0.005～0.03容積%)、675mgの市販の海塩、及び1000Lにするのに十分な非塩素化温水を含むものであった。

## 【0180】

植菌後5日目までに、そのpHは、約3.7まで低下し、及びその培養体を増殖し、及び日に1回軽く攪拌し、ならびにpHをモニターした。以降の実施例に使用する微生物含有組成物をもたらすように、その培養体を、32～37で、3～10週間培養した。その組成物を、室温で、太陽光の無い無酸素条件において、気密容器に詰め及び保管した。その結果得られた組成物は、 $1 \times 10^6$ 細胞/mLの細胞を含む、濃縮組成物と呼ばれる。

## 【0181】

バッチ番号140226のIN-M2、及びバッチ番号140227のIN-M2などの微生物組成物を、IN-M1に対して前述したように、ATCC特許寄託指定番号PTA-121556として寄託された、混合培養体のストックのIN-M2から調合した。バッチ番号140226の培養体を、30～32で、3～10週間培養し、及びバッチ番号140227の培養体を、35～37で、3～10週間培養した。

## 【0182】

代替の方法において、当該二次発酵体は、企業から購入されるものなどの1つ以上の微生物株、及び／または環境から単離される、環境内微生物または微生物共同体を含んで良い。

## 【0183】

## 実施例2 - 無細胞上清組成物の調合

前述の方法を使用し調合した、当該微生物培養体を、少なくとも10分間、14,171×gの遠心力で、遠心分離することによって、無細胞上清（「CFS」）組成物を得た。このCFS組成物を次いで、いずれかの微生物が、依然存在しているかどうかを決定するために、吸光度（600nm）で確認し、及びその液体部分を、傾斜により上澄み液を取るかまたはピペットで吸い出した。その上清を次いで、0.22μMのミクロンフィルター（MCE膜）でろ過滅菌した。

10

## 【0184】

## 実施例3 - 組成物の特徴付け

IN-M1（産物A）及びIN-M2（産物B）を含む微生物培養体から作成した、当該無細胞上清組成物の化学的な特徴を決定した。その結果は、各々が、極めて高いレベルのカリウム（組成物のグラム当たり約2500μg）、それに続く窒素（組成物のグラム当たり435～600μg）、カルシウム（組成物のグラム当たり475～660μg）及びマグネシウム（組成物のグラム当たり200～260μg）を有し、各無細胞上清組成物に極めて一貫している。ナトリウムは、160～360ppmの範囲であった。そのpH範囲は、4.3～4.5で類似していた。硫黄は、試験した無細胞上清組成物においては、425～500ppmに近い量で存在していた。リンは、非常に低レベル（50～90ppm）で存在していた。その他の全ての金属類は、約20ppmで存在した鉄を除き、きわめて微量であった。

20

## 【0185】

最高レベルの酢酸（g当たり2000～2400μg）、次いで酪酸（g当たり1300～1750μg）を伴って、揮発性脂肪酸が有意水準で存在していた。産物Aのイソ酪酸含有量は、約600ppmと低かったが、しかし産物Bのそれは、650ppmであった。反対に、産物Aは、940～1100ppmのプロピオン酸含有量であったが、産物Bのそれは、たった147ppmであった。

30

## 【0186】

両サンプルは、相対的に低い量の揮発性脂肪酸（VFA's）を含んでいる。酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ酪酸などのVFA'sは、細菌の嫌気性発酵の代謝産物である。これらの生化学産物は、液体肥料、堆肥、食料品、及び嫌気的に保存されている有機産物を含む、多くの種類の部分発酵物質中に検出されている（Cooper and Comforth (1978) J. Sci. Food Agric. 29, 19-27, Guenzi and Beard (1981) J. Environ. Qual. 10, 479-482, Patni and Ju (1985) Agric. Wastes 13, 159-178）。VFA'sは、ヒト及び動物の両方の微生物病原体（Goepfert and Hicks (1969) J. Bacteriol. 97, 956-968, Kealey, et al. (1995) Appl. Microbiol. Biotechnol. 44, 507-513, Kunte, et al. (1998) J. Appl. Microbiol. 84, 138-142）、食品腐敗生物（Corsetti, et al. (1998) Appl. Microbiol. Biotechnol. 50, 253-256）、及び作物（Lynch, J. M. (1977) J. Appl. Bacteriol. 42, 81-87, Lynch, J. M. (1978) Soil Biol. Biochem. 10, 131-135）を死滅させることができる。酢酸は、登録されている有機除草剤である。酢酸、プロピオン、イソ酪酸、酪酸、イソ吉草酸の高希釈液は、未熟堆肥の植物毒性の原因であり、及び未熟堆肥に暴露された場合に、Brassica rapa L. の増殖を阻害することが示されている。この毒性は、主としてプロ

40

50

ピオン酸及び $n$ -酪酸と関連していた(Chanyasak, et al. (1983) Soil Sci. Plant Nutr. 29, 251-259)。緑肥の混入に伴つてしばしばみられるこの植物毒性は、微生物分解時に作られる酢酸の生成と関連していた(Lynch, J. M. (1977) J. Appl. Bacteriol. 42, 81-87, Lynch, J. M. (1978) Soil Biol. Biochem. 10, 131-135)。VFAは、腐敗を防ぐために、貯蔵牧草及び果実にしばしば添加され、及び酢酸ならびにプロピオン酸は、食品用防腐剤として使用される(Doores, S. (1993) Organic acids. Pages 95-136 in: Antimicrobials in Food. P. M. Davidson and A. L. Banen, eds. Marcel Dekker, New York, Ohya, et al. (1977) J. Sci. Food Agric. 28, 369-374)。VFAは、植物病原菌を含む多数の微生物の増殖を抑制することが示されている(abbassi, et al. (2009) Phytopathology 99, 274-281, Conn, et al. (2005) Phytopathology 95, 28-35, Tenuta, et al. (2002) Phytopathology 92, 548-552)。新鮮な内に堆肥となった都市ゴミ中の酢酸は、Phytophthora nicotianaeのコロニー成長及び柑橘類の苗への感染を抑制した(Widmer, et al. (1998) Plant Dis. 82, 683-688)。McKellar及びNelson (2003) (Appl. Environ. Microbiol. 69, 452-460) はまた、堆肥誘発による, Pythium減衰の抑制が、微生物群をコロニー化している脂肪酸代謝種によって媒介されることを見出した。

#### 【0187】

いかなる特定の理論にも拘束されることを望まないが、VFAの非イオン化形態は、毒性である、と現在は考えられている(Freese, et al. (1973) Nature 241, 321-325)。VFAの非イオン化形態(すなわち、酢酸)に対するイオン化(すなわち、酢酸塩)の比率は、その溶液のpHに依存している。溶液中の単独VFAの非イオン化形態の希釈状態は、ヘンダーソン・ハッセルバルヒの式を使用して推定される(Hasselbach, K. A. (1915) Biochem. Z. 78, 112-144)。VFAの潜在的利用は、それらが持つ多数の明白な利点にもかかわらず、農業においては見落とされてきた。例えばその一つは、そのほとんどが、ヒト及び動物に対して非常に低い危険性の食用産物である、ということである。それらは、環境中の寿命は短く、一般にはたった数日の存続である。それらは、土壤中の多数の微生物にとっては、栄養源として作用できる。とりわけ、それらは、果実表面に化学残留物を残さないので、その成長段階のいかなる時点でも適用が可能である。Sholberg (1998) (Plant Dis. 82, 689-693) は、収穫後の腐敗の可能性を減らすために、傷みやすい果実の燻蒸剤として、酢酸蒸気を利用する手法を開発した。しかしながら、有益であると考えられたいいくつかの要因はまた、限定的である。6以上のpH範囲にある土壤において、VFAは、ほとんど塩として存在するであろうし、及び生物学的には活性ではないであろう。pH 4.5は、IN-M1中の多数のVFAのpKaに近く、理論に拘束されることを望まないが、この点は、当該VFAの少なくとも50%が、それらの生物学的活性形態にある、ことを示すであろう。

#### 【0188】

##### 実施例4 - 当該無細胞上清組成物の使用及び発芽に影響を与える方法

大豆、大根、キャノーラ、ルッコラ、小麦、及び前述の実施例に記述の無細胞上清組成物の2バッチである、IN-M1(A)及びIN-M2(B)を使用して、2つの発芽試験を実施した。試験1に対して、実施した希釈は、蒸留水に、1/10、1/20及び1/40であり、及び試験2に対して、実施した希釈は、1/50、1/100、1/200、1/400及び1/800であった。全ての種子を、70%エタノールで30秒間すすぐことによって、表面を殺菌した。次いでそれらを、滅菌水で3回すすぎ、及び滅菌ペ

10

20

30

40

50

ーパータオル上に置いて乾燥した。2枚の滅菌ろ紙を、滅菌済みのプラスチック製ペトリ皿の底に敷いた。6mLの各希釀物を、当該種子を添加する前に、その皿に入れた。対照培養プレートには、同等量の水を入れた。そのろ紙が完全に満たされた時点で、10個の種子を、無差別にろ紙の上に置いた。大豆は、サイズが大きいので8個を、各培養プレートに追加した。この種子を、もう1枚のろ紙で覆った。この培養プレートをパラフィンで封止し、及びおおよそ(7日間)の完全発芽まで、培養チャンバー内に静置した。発芽した種子を数え、及び各試験用に用意した発芽尺度で、その割合を求めた。対照サンプル及び各処理サンプルを、3連試験で評価した。

#### 【0189】

GraphPad Prism version 6.00 ウィンドウス用、GraphPad Software, La Jolla California USA (www.graphpad.comを参照のこと)を使用して、全てのデータについて、One-way ANOVA(一元配置分散分析)とそれに続くダネット多重比較検定を実施した。種子発芽におけるIN-M1無細胞上清の適用効果の代表事例を、図1A~1B、2A~2B、及び3A~3Bに示す。追加実験を、本明細書の以下に記述する。

#### 【0190】

##### 試験1

一般的に、全ての作物において、当該無細胞上清組成物の濃度が高まるほど、種子発芽及び胚軸ならびに根の成長が低下した。バッチAとバッチBの間では、植物応答における差異が見出された。バッチBは、試験した全ての濃度で、ルッコラ及び大根に有害であった。

#### 【0191】

その結果を評価するために、得られた異なる発芽度を代表する発芽率を、作物ごとに作成した。各培養プレートを、その適切な尺度を使用して評価した。

#### 【0192】

##### 小麦

バッチA及びBの1/10ならびに1/20希釀物は、小麦の発芽に悪影響を及ぼし(図32A)、その一方でInocucor社の製品または対照サンプルの1/40希釀物の存在下で発芽した小麦の間では、統計的に有意な差異は見出されなかった(図1B)。

#### 【0193】

##### キャノーラ

この実験においては、バッチ間の差異が、より明確になった。IN-M2(B)の1/10及び1/20希釀物は、キャノーラ発芽に悪影響を及ぼした一方で、IN-M1(A)の1/10希釀物だけが、発芽に良好な影響を与えた(図32B)。種子をIN-M1(A)の1/40で処理した場合、苗は、対照植物とくらべて、根は著しくし小さかったが、より長く及びより多くのしっかりした新芽を有していた。

#### 【0194】

##### ルッコラ

試験した全ての濃度のIN-M2(B)が、ルッコラ発芽に悪影響を及ぼした。IN-M2(B)の1/10及び1/20希釀物は、完全に発芽を阻害し、及びIN-M2(B)の1/40で処理した場合、わずかな種子が発芽しただけであった。当該バッチA(IN-M1)の1/10及び1/20希釀物はまた、ルッコラの発芽に有害であり、及びAの1/40で処理したものだけが、対照サンプルと同様に発芽した(図32C)。

#### 【0195】

##### 大根

発芽を阻害はしなかったが、IN-M2(B)の無細胞上清組成物での処理は、大根の発芽に有害であった。IN-M1(A)の1/40で処理したものだけが、対照サンプルと同様に発芽した(図32C)。

#### 【0196】

##### 大豆

10

20

30

40

50

いずれの処方物及びその希釈試験においても、大豆の発芽に阻害的な影響は無かった（図32E）。事実、IN-M1（A）の無細胞上清組成物の1/40希釈物での処理は、対照サンプルと比べて、苗の品質を向上させた。

#### 【0197】

##### 試験2

前述の結果に基づいて、IN-M1（A）及びIN-M2（B）の無細胞組成物の1/50、1/100、1/200、1/400及び1/800希釈物で、7日間の発芽試験を実施した。図33A～Dに示すように、試験したいずれの種子においても、発芽に影響を与えた処理は、無かった。

#### 【0198】

要約すると、IN-M1（A）及びIN-M2（B）のより高濃度品は、種子発芽に、ある程度の悪影響を与え、この点は、菌増殖の阻害に見られた現象と類似していた。例外は、IN-M1の無細胞上清組成物の良好な影響が、1対10の最も高い濃度比率の試験で観察された、大豆の場合であった。IN-M1及びIN-M2（1/50希釈物またはより高希釈）両方の低濃度物を使用した場合には、発芽は影響されなかった。

#### 【0199】

実施例5-経時的な、微生物培養体に存在する細菌及び真菌群集プロファイルのシフトの追跡

2バッチの微生物培養体を、2014年、3月10日、化学分析及び微生物群のプロファイリングのために送った。バッチ「A」は、IN-M1であり、及び2011年からの高塩性の処方物である。バッチ「B」は、IN-M2であり、その二次発酵体に塩化ナトリウムが添加されておらず、及びさらにフミン酸を含む、2013年からの低塩性の処方物である。当該バッチを、嫌気性条件下で調合し、及び次いで封止したプラスチックボトルに静置した。その産物に存在する微生物含有量のために、酸素への暴露及び暖かい温度が、その微生物に、増殖及び潜在的なシフトを起こす可能性がある。したがって、どのようにその群が変化し、その保管条件が、そのシフトにどんな影響を及ぼすかを特定することが重要である。

#### 【0200】

実験室に到着の時点で、当該2バッチを、4の冷蔵庫に保管した。各ボトルを、生物学的に安全なキャビネット内の無菌条件下で開封し、及び $60 \times 1.5\text{mL}$ の2次サンプルを集め、ならびに $2\text{mL}$ の遠心分離管に収めた。各ボトルの60サンプルを、冷凍庫に安置し、及び-80の冷凍庫で保管した。これらのサンプルは、実験の残り部分の基準及び対照としての役割を果たす。 $61.5\text{mL}$ の追加サンプルを、「time zero（経過時間ゼロ）」に対応して、各ボトルから集めた。

#### 【0201】

この経過時間ゼロサンプルに加えて、各ボトルから $9 \times 45\text{mL}$ の二次サンプルを集め、及び $50\text{mL}$ のファルコン試験管に保管した。3つの試験管を、4の冷蔵庫に、3つを25の培養器に、及び3つを常温の実験台に静置した。合計6つの試験管（バッチAから3つ、及びバッチBから3つ）を、各温度条件で保管した。

#### 【0202】

月に一度、各温度の $50\text{mL}$ のファルコン試験管から、 $2 \times 1.5\text{mL}$ の二次サンプルを取り出した。合計で36サンプルにあたる、各温度でバッチ当たり合計6つの二次サンプルを集めた。-80の冷凍庫にある在庫から、バッチ当たり3つの対照サンプルを取り出した。1年間にわたって月に1度、42サンプルを集め、及び分析した。この実験の完了時点で、合計516サンプルを採り、及びTRFLPで分析した（12ヶ月×42サンプル = 504サンプル + 経過時間ゼロで採取の12サンプル）。細菌及び真菌の両方にに対するサンプルを、TRFLPで分析した。したがって、TRFLPで分析された合計サンプル数は、1032サンプルであった（細菌に対する504サンプル、及び真菌に対する504サンプル、プラス経過時間ゼロで採取の24（細菌用12 + 真菌用12）サンプル）。

10

20

30

40

50

## 【0203】

経過時間ゼロ - 2014年3月21日

経過時間ゼロは、そのバッチが、最初に開封され、及び酸素に暴露された時点で存在する、その微生物群を代表する。当該バッチは、それらを受領した時に4の冷蔵庫に保管し、及び経過時間ゼロサンプルは、そのバッチが、その実験室に到着の2日以内に、採取した。経過時間ゼロにおいて、バッチA及びBの微生物群は、互いに著しく異なっていた(図4)。理論に拘束されることを望まないが、最初の成分分析で観察されたこの差異は、当該バッチ間の細菌群の多様性の相違によるものであろう。各ピーク(順方向または逆方向プライマーのいずれでも)は、理論的に1つの細菌を現し、及びそのピークの高さは、その固体数を表す。バッチAは、PCAの有意な結果を説明する、バッチBに見出されていない、多数の小さなピークを有していた。バッチAに存在する、4つの最も大きなピークは、138、305、567/8及び755の塩基対においてであった(図5)。バッチBは、138塩基対における1つの大きなピークが支配的であった(図5)。バッチA及びBの真菌群は、ほぼ同一であり、及び204または205塩基対における同じピークが支配的であった(図6)。当該真菌群について、主成分分析を実施しなかったのは、各サンプルに1つまたは2つのピークしかなかったためであり、及びそれらのプロファイルが同じことが明白だったからである。

10

## 【0204】

1か月目 - 2014年4月

## 細菌

20

増殖の1か月後、バッチA及びBの細菌群は、いくつかの有意差を示すほんのわずかな点を伴って、ほとんど類似していた(図7)。-80で保管された対照サンプルA及び対照サンプルBは、その経過時間ゼロサンプルの結果と一致して、有意差があった。4で保管されたバッチA及び室温で保管されたバッチAは、25、4で保管されたバッチB、及びその対照サンプルとは、有意差があった。25で保管されたバッチAは、そのバッチAの対照サンプルとは、有意差があった。4つのバッチBサンプルの全てが、一緒に集められて、及び25ならびに4で保管されていたバッチBからは離れていた、その対照サンプル以外は、互いに類似していた。4つのバッチAサンプルの全てが、その対照サンプル及び有意差のあった25サンプル以外は、互いに類似していた。

30

## 【0205】

## IN-M1(バッチA)

増殖の1か月後、-80、4、25、及び室温で保管されたバッチAサンプルのプロファイルの全てが、138、305、及び567塩基対における同じ主要ピークを持っていた(図8)。しかしながら、その分け合ったピークの菌存在量は、その4つの保管温度の間で、著しく異なっていた。-80及び4で保管された当該バッチAサンプルの最強ピークは、305塩基対においてであった。25で保管されたバッチAサンプルの最強ピークは、138塩基対においてであった。低温で保管された当該2サンプル及び暖かい温度で保管された当該2サンプルの間での、菌存在量の相違に留意することは、興味深い。低温においては、305塩基対におけるピークの原因となる有機物が、最も支配的であり、及び最大強度を有する。高温においては、138塩基対におけるピークの原因となる有機物が、最も支配的であり、及び最大強度を有する。室温においては、305塩基対におけるピークは、その6つの複製群の内の2つにだけに、非常に低い強度レベルで見出され、及び一方で、138塩基対におけるピークは、全てのサンプル温度において、6複製群の全てで最大強度レベルであった。138及び305塩基対におけるピークは、温度変化による菌存在量のシフトを経験しているが、567/8塩基対におけるピークは、2複製群にだけ存在していた室温の場合を除いて、比較的安定した菌存在量を維持していた。理論に拘束されることを望まないが、これらの結果は、適切な環境を与えられた、138塩基対におけるピークの原因となる有機物が、急速に増殖し、及びその他の有機物の減少及び/または排除を引き起こした、ことを示唆している。

40

## 【0206】

50

## IN-M2(バッチB)

増殖の1か月後、4、25、-80及び室温で保管されたバッチB細菌群プロファイルは、全てが互いに類似しており、多数の同様に大きなピークを持っていた(図9)。その4温度の各々の6複製群の全てが、138塩基対における同じ支配的ピークを持っていた。191、194、296、305、559及び661塩基対におけるピークはまた、各温度の少なくとも5つの複製群に見出された。バッチBは、バッチAとは異なって、全ての複製群において、及び同じ強度レベルに近い他のピークを伴った4温度の全てで、ピーク138が支配的であった。温度変化による菌存在量に、シフトは観察されなかった。当該細菌群間で唯一注目できる違いは、508塩基対においてであった。508塩基対におけるピークは、高強度ではなかったが、その対照サンプル(-80)及び4のサンプルに、唯一存在していた。

10

## 【0207】

## 真菌類

## IN-M1(バッチA)

増殖の1か月後、4温度の全てで、保管されたサンプルに存在する真菌群は、実質的に同一であり、及び1つまたは2つだけの大きなピークを有していた(図10)。204/5/6塩基対におけるピークは、そのプロファイルで支配的であった。1つまたは2つだけの塩基対に異なって存在するピークは、同じ有機物を表している可能性がある。

20

## 【0208】

## IN-M2(バッチB)

増殖の1か月後、4温度の全てで、保管されたサンプルに存在する真菌群は、実質的に同一であり、及び1つまたは2つだけの大きなピークを有していた(図11)。204/5塩基対におけるピークは、すべてのプロファイルで、非常に高い強度を伴って支配的であった。

## 【0209】

この真菌群集プロファイルの結果は、その経過時間ゼロサンプルの結果と一貫性があった。

## 【0210】

理論に拘束されることを望まないが、バッチAを保管した温度が、その産物に存在する細菌群集に影響を与えた可能性がある。異なる有機物が、その産物を保管した温度に依存して、バッチAの細菌群集を支配する。そのため、温度の上昇によって、138塩基対におけるピークの原因となる有機物の集団を成す。138塩基対ピークの菌存在量の増加は、その急激な増殖によって、有機物を減らし及び/または排除するためと思われる。増殖の1か月後、両バッチA及びBの真菌群集は、着実に残り、及び1種類または2種類の有機物により支配されていた。1か月後、温度は、その真菌群集に影響を与えたかった。

30

## 【0211】

## 実施例6-当該組成物の使用及び植物の能力を引き出す方法

マイクログリーン及びチグリーンは、野菜、ハーブまたは他の植物から生産される、若い食用の緑黄色野菜である。それらの野菜は、大きな植物に成長する前に収穫され、及びそのサイズが小さいにもかかわらず、強い香り及び色を持っている。高級市場及び高級レストランで、それら生産物の需要が高まっている。急成長し及びチグリーンとして広く消費されるルッコラを、本研究用に選択し、それを、これら植物に使用する土壤と共に通点がある、the Holland Marshからの有機土壤に植えた。

40

## 【0212】

IN-M1を含む微生物培養体及びIN-M2を含む微生物培養体から作られた、異なる濃度の無細胞上清組成物を、ルッコラの種子及び土壤と混合して使用した。この処理の選択は、植物病原菌で見出された、対照サンプル(n=5)、1/10 IN-M1(n=5)、1/20 IN-M1(n=5)、1/40 IN-M1(n=5)、1/10 IN-M2(n=5)、1/20 IN-M2(n=5)、及び1/40 IN-M2(n=5)での効果に基づいた。

50

**【0213】**

360gのthe Holland Marsh土壤(80%の保水能力で)を、異なる濃度のInocuCor社製品と混合した。ポット当たり60gの処理土壤に、10粒のルッコラ種子を植え、及び処理当たり5ポットを使用した(n=5)。植物の発生及び成長をモニターし、及び2週間後に、植物を収穫し、加工し、及び結果を解析した。

**【0214】****試験1**

植栽後2週間で、当該ルッコラを加工し、植物数を数え、及びクロロフィル含有量、新芽の長さ、総植物長、及び総植物乾燥重量を測定した。植物の成長及び葉の容積を視覚的に測定する方法として使用する、ルッコラの成長力尺度を開発した(図12)。

10

**【0215】**

その成長力尺度を使用して、各処理の各ポットにおける植物を、評価した。図16Aに示すように、当該処理のいずれかと当該対照植物との間で、その成長力に、統計的な有意差はなかった。さらに、測定した当該パラメーター(植物数、クロロフィル、新芽乾燥重量、根乾燥重量、及び植物長)のいずれにおいても、処理した植物と未処理の植物の間に、差異は無かった(図13A~F)。根のバイオマスにおける差異は、統計的に有意ではなかったが、理論に拘束されることを望まないが、それらの結果は、高濃度のIN-M1及びIN-M2での処理は、根の発達には有害である可能性がある、ことを示唆している。

20

**【0216】****試験2**

前述のように、植栽後2週間で、図15に示した尺度を使用して、当該植物の、植物成長力を評価した。当該植物を、それらのポットから取り出し、及びその根を視覚的に比較するため、全ての土壤を洗い流した。植物数を数え、及びその根及び新芽を分離する前に、クロロフィル含有量及び植物長を測定し、ならびに60で一晩乾燥した。その新芽及び根の乾燥バイオマスを記録し、及び別々に比較した。図14A~F示すように、測定したパラメーターのいずれにおいても、対照植物と処理植物の間に、統計的な有意差は無かった。

30

**【0217】**

試験した条件下で、1対10から1対40の希釈での、IN-M1の微生物培養体及びIN-M2の微生物培養体から誘導された無細胞上清組成物での処理は、ルッコラの成長及び植物の能力に影響が無かった。処理及び対照の植物の間に、統計的な有意差は無かった。

**【0218】****実施例7 - 当該無細胞上清組成物に使用された微生物共同体の痕跡****微生物分析 - TRFLP**

特定が容易なように、2バッチの微生物培養体を、バッチAのIN-M1及びバッチBのIN-M2として標識化した。各バッチを、その瓶を複数回反転させて、徹底的に混合した。3つの1.5mLの二次サンプルを、各瓶から取り出し、及び2mLのマイクロ遠心分離管に入れた。この試験管を、遠心分離機に收め、及び14,000rpmで4分間回転させ、いずれの微粒子及び微生物をもペレット化した。Norgen Genomic DNA Isolation キット(Norgen Bioteck Corp. ON)を、その製造者の指示に従って使用し、各ペレットからDNA抽出を行った。

40

**【0219】**

PCRマスターの混合物を、最終反応容積を50μLで作成した。その細菌PCRに使用した2つのプライマーは、配列CAGGCCCTAACACATGCAAGTC(配列番号1)を伴う63Fプライマー、及び配列ACGGGCGGGTGTGTAACAAAG(配列番号2)を伴う1389Rプライマーであった。その真菌類PCRに使用した2つのプライマーは、配列TCCGTAGGTGAACCTTGC GG(配列番号3)を伴うITS1F、及び配列ATCCCTCCGCTTATTGATATGC(配列番号4)を伴うIT

50

S 4 であった。1 % 寒天ゲルを機能させ、その反応生成物を確認した。そのPCR生成物を、DNA清浄及び濃縮器 (Zymo Research Corporation, Irvine, CA, USA) を使用して、精製した。12 μLの精製PCRを、13 μLの限定混合物に添加し、35 °C の暗所で3時間培養し、及び3730 DNA AnalyzerとGeneScan 1200 LIZ Size Standards (Applied Biosystems, USA) を並行使用して、配列解析を行った。TRFLPの結果を、既定値設定及び50 °Cでカットオフした修正断片ピーク強度を伴った、Gene Marker (Soft Genetics LLC) を使用して解析した。順方向及び逆方向の断片サイズと強度を、Microsoft Excelに送り込んで、及びそのデータを、ソフトウェアのXLStatを備えたPCAを使用して解析した。TRFLPデータを、バイナリーに変換し、及びピークの存在の類似性に基づいて、クラスター化した。統計的な有意性が識別される場合には、各処理グループについて、95 %信頼区間を自動的に設けた。それらの微生物群集において、重なり合わない群は、統計的に有意であると考えた。

10

#### 【0220】

##### 培養プレート化及び単離による同定

各バッチからの二次サンプルを、7種の異なる培地に配置し、各バッチに存在していた微生物を決定し、及びその共同体でのいずれかの変化または新微生物を特定した。

#### 【0221】

使用した培地には、栄養寒天 (NA)、ジャガイモブドウ糖寒天 (PDA)、トリプシン大豆寒天 (TSA)、LB寒天 (LB)、クロストリジウム培地 (RCM)、King 培地、及びMRS寒天を包含していた。製造者の推奨事項に従って、培地を調合し、及び直径85 mmの滅菌済みのペトリ皿に注ぎ入れた。

20

#### 【0222】

バッチA及びBの両方に対して、1/10<sup>6</sup>まで、連続的に10倍で希釈した。100 μLの溶液で植菌した二重培養プレートを、その対照サンプルとしての水と共に、各種の培地に対して用意した。次いでその培養プレートを、25 °Cで培養し、及び増殖を毎日確認した。培養プレートを、培養器に最大10日間保管して、どんなに遅い増殖の有機物をも見逃さないように確認した。

30

#### 【0223】

各種培地からの独立したコロニーを、形態に基づいて選別し、及び新規培養プレート上に、画線によって単離した。単離体を、再度画線によって3回単離し、確実に純粋な培養体を得た。

#### 【0224】

##### 16S rRNAの增幅及び配列化による、細菌の同定

当該培養プレートから1 μLの細菌を円形上に取り、及び0.5 mmのガラスビーズならびに150 μLの滅菌水を含んだ、1.5 mLのマイクロ遠心管に、それを入れて、各菌株からDNAを抽出した。その試験管を、沸騰水中に10分間置いた。加熱に続いて、その試験管を、ビーズ式菌体破碎装置に2分間置き、及び次いで、14,000 rpmで2分間遠心分離した。次いで、そのDNAを含む上清を、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の錆型として使用した。2つのプライマー、AGAGTTTGATCCTGGCTCA G (配列番号5) の27F及びGGTTACCTTGTACGACTT (配列番号6) の1492Rを含む、最終的に50 μL容量において、16S rRNAの增幅を実施した。1% 寒天ゲルを機能させ、その反応生成物を確認した。このPCR生成物を、DNA清浄及び濃縮器 (Zymo Research Corporation, Irvine, CA, USA) を使用して、精製した。

40

【表1】

潜在的一致	単離体の数	63F 断片	1389R 断片
Bacillus megaterium	2	538	296
Acetobacterperoxydans	7	138	296
Bacillus subtilius	6	201	296
Lactobacillusparacasei	4	558	296
Lactobacillus casei	2	558	296
Lactobacillus spp.	10	558	296

10

## 【0225】

## 実施例8 - 大豆発芽を促進する、無細胞上清組成物の使用

最適条件及び塩分ストレス条件下での大豆の発芽について、IN-M1またはIN-M2を含む微生物培養体、及びそれらの無細胞上清(CFS)組成物を、多様な希釈率(1/25、1/50、1/100、及び1/1000)で評価した。2枚のろ紙(Whatman #8, Fisher Scientific, Canada)を敷いたペトリ皿中で実験を行い、及び各ペトリ培養プレート中に、7mLの溶液を使用した。その微生物培養体を、1,300rpmで少なくとも10分間遠心分離して、無細胞上清(CFS)組成物を得た。次いでこのCFS組成物を、ピペットで吸い取るかまたは傾斜により上澄み液を取り出し、及びその上清中に存在する可能性のあるいずれの細菌をも取り除くために、滅菌ろ過した。当該微生物培養体の多様な希釈物及びそのCFS組成物を、滅菌蒸留水(最適条件の実験)または100mLの食塩水(塩分ストレス条件)中において、調合した。各ペトリ皿に、10粒単位の大豆(RR2Y)を用意した。その培養プレートを、22±1で培養した。塩分条件の試験の場合、当該微生物培養体及びそのCFS組成物を、食塩水(100mLのNaCl)で希釈した。

20

30

## 【0226】

全ての発芽可能な種子は、その試験の最適条件付近で、最終的には発芽するであろうことに、留意するべきである。しかしながら、野外条件下では、その状況は、非常に異なる。野外の環境は、複雑で、非常に幅広い範囲のストレス及び多様な土壤の生命形態(昆虫、菌類、細菌)を関与させるので、理論に拘束されることを望まないが、植栽された作物のゆっくりとした発生で、より少ない芽生えしか発生しないであろう、ということを意味する。このことが、より小さな集団(群生数)をもたらし、及び多数の農作物栽培研究で、群生数と最終的な収穫量との間の一般的な相関関係が明らかになっている。仮に、生育期の条件が、ほぼ完全であれば、初期に低い群生数であった作物は、それを補い、及びその季節の終わりまでには、相違を埋め合わせることが可能である。しかしながら、「normal(普通)」の年は、ほとんど完全ではなく、及びより少ない初期群生数は、より少ない収穫量に繋がるであろう。

40

## 【0227】

## 無細胞上清組成物

## 非ストレス(最適な)条件

IN-M1またはIN-M2の各々からの無細胞上清組成物の1/100及び1/50希釈物は、67時間までの実験を通して、40時間で15%と、より早い発芽率を示した(図19)。この生物学的影響は、希釈-依存性がある、すなわち、その効果は、1/100及び1/50の間が最適であり、及びより低い希釈の1/25ならびにより高い希釈の1/1000では少ない。

50

## 【0228】

## 塩分ストレス条件(100mMのNaCl)

塩分ストレス条件下において、IN-M1またはIN-M2の微生物培養体から誘導した無細胞培養物で処理した、ストレスを受けた種子は、最大31時間までの発芽率において、類似した遅れを示した(図20)。その後、当該無細胞上清組成物の全ての希釈物は、その実験の間維持されたthe Salt Stress Control(塩分ストレス条件)(赤: C-S)の期間にわたり、発芽率の初期増加を示し、1対50希釈の使用で見られた主要な違いは、前述の非ストレスサンプルと類似していた。

## 【0229】

## 微生物培養組成物

10

## 非ストレス(最適な)条件

IN-M1またはIN-M2からの微生物培養体の1/1000、1/100、及び1/50希釈物で処理した種子は、その実験の最初から、さらに迅速な発芽率を示し、30時間で、約15%増加に達した(図21)。

## 【0230】

## 塩分ストレス条件(100mMのNaCl)

IN-M1またはIN-M2の微生物培養体(微生物を含んでいる)で処理したサンプルは、最大31時間までの発芽率で、同様に遅れを示し、その後、全ての希釈物で、the Salt Stress Control期間にわたって、発芽率に早期増加を示した(図22)。

20

## 【0231】

要約すると、大豆の種子発芽率において、用量依存して15~20%の増加が観察され、この増加はまた、ストレス条件下でも存在した。植栽時に一度処理された芝草の苗は、施肥無しで、3~4週間後に、早期バイオマスの20~30%増加を示し、土壤で発芽後の早期新芽において、成長力(堅牢性)を表した。当該無細胞培養液において、誘導された非生物的実験条件下で、67時間にわたり、発芽率の15%に、用量依存効果が観察された。

## 【0232】

このデータはさらに、この生物刺激効果を、発芽活性の離散時間周期に関連付けることができることを示す。例えば、これらのデータは、実験した条件の下で、この発芽研究を開始後の約24時間で、発芽における生物刺激活性の初期ピークまたは急上昇があり、及び次いで、本発芽研究が、最適条件下で実施される場合の30~36時間で、発芽における生物刺激活性の二番目のピークまたは急上昇があることを示す。この発芽研究が、例えば、100mMのNaClのストレス条件下で実施される場合、この生物刺激活性の二番目のピークは、約42~48時間にシフトする。本明細書に記述の発芽研究において、前述の生物刺激活性のピークまたは急上昇の存在が観察されるが、それは、植物に特異的な結果と相關している。したがって、本明細書に記述のように、発芽活性を試験評価する場合、CSF組成物は、発芽活性の2つのピークまたは急上昇と関連しており、次いでそのCSF組成物を、大豆及びトウモロコシなどの植物の成長に利用できる場合、1.温室または実験室で育つ植物の増加したバイオマス、2.温室または野外試験のいずれかで栽培された植物の増加した葉面積(約10~15%)、及び3.温室または野外試験で栽培された植物から収穫した、葉の乾燥重量の増加(約10~15%)、すなわち、細胞量の増加が、観察される。

30

## 【0233】

したがって、実験室またはペトリ皿での発芽活性の試験法は、本明細書に記述の望ましい生物刺激活性に対応する、CSF組成物を評価するために使用できる。特に、その種子への、例えば、約100粒の種子の試験バッチにおける大豆種子への、二次発酵から得たCSFの適用後の、決められた時間に発生する発芽活性の機能的活性の「peaks(ピーク)」は、そのCSFが適用される、例えば、葉のバイオマスの増加、葉面積、及び新芽のバイオマスへの、その植物における生物刺激活性と相關している。

40

50

## 【0234】

## 実施例9 - 草地の二酸化炭素排出量の削減

都市部及び郊外部の環境において、機能性土壌植生システムは、温室効果ガス、エネルギー、及び大気中の微粒子を交換することによって、地球規模及び都市気候の両方に、決定的な役割を果たす。ゴルフコースの芝及び住宅の芝生における、草地についての野外研究が行われてきた。理論に拘束されることを望まないが、これらのデータは、無細胞上清組成物が、適切な芝の管理プログラムに加えられた場合、グリーン管理者または庭師は、栄養素ストレスの兆候無しで、3年間で50%に相当する合成肥料の量を削減できる、ことを示唆している。芝の発芽率または堅牢性(バイオマス)を犠牲にすることなく、芝生及びゴルフコースの二酸化炭素排出量を減らすことが可能かどうかを検証するために、以下の実験を設計した。

10

## 【0235】

各サンプルポットを、4cmに切断して同じ状態にし、及び1週間後に、その4cmのレベルから成長した草をハサミで切断し、収穫した。10ポットから、その草を収穫し、及び計量し、ならびに平均湿重量を計算した。表2は、標準的な庭園土壌で育ったAgrostide(ベントグラス)を示す。IN-M1を含む微生物培養体から調合された、無細胞上清組成物での1回処理は、6週間苗の湿潤バイオマスを、その水対照サンプルとの比較で21%、及びその培養培地との比較で10%増加させた(図23)。6週間で、IN-M1で2回処理した苗は、苗サンプル2の湿潤バイオマスとの比較で、その水対照サンプルにおいて8%、及びその培養培地での同じ計算では17%の減少を示した。6週間で、IN-M1で3回処理した苗は、その水対照サンプルとの比較で、29%に上昇した湿潤バイオマス、及びその培養培地との比較で、17%に上昇した湿潤バイオマスを維持した。

20

## 【表2】

Agrostide	水対照サンプルを上回る、新鮮バイオマスの増加(%)	培養培地対照サンプルを上回る、新鮮バイオマスの増加(%)
対照サンプル1(水)	0	
対照サンプル2(培養培地)	10	0
処理サンプル1(1回処理)	21	10
処理サンプル2(6週間にわたり3回処理)	29	17
処理サンプル3(6週間にわたり2回処理)	11	0

30

## 【0236】

表3は、その土壌と混合し有機物の追加施肥を伴った、庭園土壌で育ったAgrostideを示す。IN-M1を含む微生物培養体から調合された、無細胞上清組成物での1回処理は、6週間苗の湿潤バイオマスを、その水対照サンプルとの比較で40%、及びその培養培地との比較で33%増加させた(図24)。6週間で、IN-M1で3回処理した苗は、湿潤バイオマスで、その各々の対照サンプルにおいて6%の減少を示した。6週間で、IN-M1で2回処理した苗は、苗サンプル2と比較した湿潤バイオマスで、その各々の対照サンプルにおいて7%の減少を示した。

40

【表3】

Agrostide (土壤 + 有機物)	水対照サンプルを上回る、新鮮バイオマスの増加 (%)	培養培地対照サンプルを上回る、新鮮バイオマスの増加 (%)
対照サンプル1 (水)	—	—
対照サンプル2 (培養培地)	6	0
処理サンプル1 (1回処理)	40	33
処理サンプル2 (6週間にわたり3回処理)	34	27
処理サンプル3 (6週間にわたり2回処理)	27	20

【0237】

10

20

表4は、異なる2種類の草で、その結果が類似しているかどうかを観察するため、標準的庭園土壤で育った、2番目の草種 (*Poa parturin*) を示す。IN-M1を含む微生物培養体から調合された、無細胞上清組成物での1回処理は、水だけの場合と比べて、対照サンプル2の培養培地において観察された増加と同じく、湿潤バイオマスの8%増加を示した(図25)。6週間で、IN-M1で3回処理した苗は、その水対照サンプルとの比較で12%上昇の、及びその培養培地との比較で3%上昇した湿潤バイオマスを示した。6週間で、IN-M1で2回処理した苗は、苗サンプル2(3回処理)との比較で、その水対照サンプルにおいては、9%の湿潤バイオマス増加、及びその培養培地での同じ計算で、8%の湿潤バイオマス増加を示した。

【表4】

30

Parturin	水対照サンプルを上回る、新鮮バイオマスの増加 (%)	培養培地対照サンプルを上回る、新鮮バイオマスの増加 (%)
対照サンプル1 (水)	—	—
対照サンプル2 (培養培地)	8	
処理サンプル1 (1回処理)	8	0
処理サンプル2 (6週間にわたり3回処理)	12	3
処理サンプル3 (6週間にわたり2回処理)	21	11

40

【0238】

50

これらの研究は、植栽から 6 週までの苗の研究であり、及びしたがって、発芽期間中の植物における IN-M1 处理、及び第 1 期 6 週間の成長を反映していた。表 2 の結果は、施肥をせず、しかし IN-M1 を含む微生物培養体から調合した無細胞上清組成物で処理した庭園土壌に植栽された、Agrostide (ベントグラス) でのバイオマス発達での増加の、最初の実験観察の確認であった。

#### 【0239】

バイオマスの発達は、種に特異的な可能性がある（表 2 及び 4 を参照）。特に、Agrostide における苗の発達段階での、合成肥料の無い、6 週間に 3 回の処理は、バイオマス発達に、増加を維持するように思われる。Poa parturin (Kentucky Blue Grass) においては、苗の発達段階での、合成肥料の無い、6 週間に 2 回の処理が、最もバイオマス発達を示すように思われる。10

#### 【0240】

理論に拘束されることを望まないが、これらのデータは、苗の早期の発達及び新芽は、堅牢で、及び化学肥料の欠乏に影響されない、ことを示唆している。しかしながら、当該実験結果（表 3）は、仮に有機肥料の追加があれば、そのバイオマス発達は、増進し及び 6 週間は維持される、ことを示している。これらの結果は、若い苗においてであり、及び肥料の減少（20～50%）は、土着した成熟芝の成長力には影響を与えない、という野外の結果を検証してはいないであろう。理論に拘束されることを望まないが、これらの結果は、標準的な庭園用混合土壌で育った 2 種の芝草の苗は、合成化学肥料を使用しないで、発芽が可能であり、及び堅牢な新芽の発達を示す、ことを示唆している。20

#### 【0241】

小麦、トウモロコシ、及び米、全ての草の類は、世界の主要な食料源である。化学薬品及び農薬の使用は、二酸化炭素排出量にかなりの影響を与える。さらに、トウモロコシを含む、スイッチグラス及びその他のバイオ燃料原料の草は、化石燃料からの転換を可能にするために、少ない二酸化炭素排出量で育つ必要がある。理論に拘束されることを望まないが、これらのデータは、化学肥料の欠如にもかかわらず、2 種の芝の発芽及び早期新芽の発達に良い影響を示唆している。

#### 【0242】

##### 実施例 10 - バイオマス発達の増進

サウスカロライナ州の Summerville (2013 年 3 月 29 日) で、植栽シーズンの初めに対照実験を開始し、IN-M1 を含む微生物培養体から調合した無細胞上清組成物を利用して、Swiss Chard の成長に与える影響を比較した。Swiss Chard の種子（25 × 2）を、発芽に対応した類似のポットに植えた。その対照植物に、20-20-20 肥料だけを与え、その試験群を、20-20-20 肥料と共に IGS を含む水を与えた。30

#### 【0243】

その苗を、植栽 6 日後の 2013 年 4 月 4 日に庭園土壌床に移した。移植時に、IGS を与えた苗の根を、1 対 50 の GS の水希釈品に漬け、その植栽穴にまた、同じ希釈物を与えた。2 つの群を、並べて植えた。

#### 【0244】

移植の後で、必要に応じておおよそ 1 週間に 1 度、その植物に水を与えた。同時に、IN-M1 で処理した試験植物に、産物対水の比率が 1 対 100 の、IGS の噴霧で水を与えた。40

#### 【0245】

5 つの植物を測定し、その植物の平均高さ及び幅を記録した。IN-M1 を含む微生物培養体からの無細胞上清組成物で処理した植物は、著しく堅牢な成長を示した。表 5 は、移植の日（植栽から 6 日後）、植栽から 15 及び 40 日後に取られた平均測定値を示し、植栽後 40 日で、当該対照群の植物が、高さの平均が 12 インチ及び幅の平均が 15 インチと測定されたのに対して、当該 IN-M1 処理の植物は、高さが平均 20 インチ及び幅が平均 25 インチを示した。50

【表5】

日時	処理群	平均の植物高さ (インチ)	平均の植物幅 (インチ)	平均の葉の数	平均の葉計測値 (長さ×幅)
04/10/2013	20-20-20	2.5	1	2	
04/19/2013		11	7	4	
05/14/2013		12	15	6	6x4
04/10/2013	IGS+20-20-20	3	1.5	2	
04/19/2013		15	14	8	
05/14/2013		20	25	10	12x9

## 【0246】

Swiss Chardを、40日目(2013年5月14日)に収穫した。図26は、高さ、幅及び葉の数で測定された、バイオマスによって示される改善した植物成長を、20図解する。

## 【0247】

## 実施例11 - 観葉植物に生物刺激を与える、組成物の使用及び方法

Brookgreen Botanical (ブルッククリン植物園)の園芸チームが、302013年の3月上旬に、ヒヤシンスを植えた。その球根を2バッチに分けて、1バッチを、植栽前及び成長期間中に、IN-M1を含む微生物培養体から調合した無細胞上清組成物で処理したが、一方その対照群は、処理しなかった。両群を、その植物園の3か所に、並べて植えた。その処理した植物は、植栽後28日で、ほとんど全てが開花し、及び平均の高さが6.6インチであった一方で、無処理群は、主として葉を現わし、葉の奥深くにほとんどの芽を持ち、ごくわずかに開花し、及び3.7インチの平均高さであった。理論に拘束されることを望まないが、これらのデータは、IN-M1を含む微生物培養体から調合した無細胞上清組成物が、観葉植物に生物刺激効果を与える可能性がある、ことを示唆している。

## 【0248】

60個のヒヤシンス球根を、2013年3月7日に植えた。植栽にあたり、30球根を、IN-M1を含む微生物培養体から調合した無細胞上清組成物の1部に対して水100部の、IN-M1を含む微生物培養体から調合した無細胞上清組成物に浸した。この処理球根を植えた土壤を、植栽前に、4インチの深さまで浸した。この処理植物に、必要に応じて、IN-M1を含む微生物培養体から調合した無細胞上清組成物対水が、1対100の希釀になるように水を加えた。40

## 【0249】

対照群を、その処理球根と同じ場所に植えた。この対照群の土壤を、4インチの深さまで水に浸し、及びその植物に、その処理群と同時に、水を加えた。当該ヒヤシンス球根の両群の進展状況を、定期的にモニターし、新芽の発生、及び葉の高さ、ならびに開花の頻度を記録した。当該球根を、各場所でモニターした。

## 【0250】

本研究の結果を、下記の表6に説明する。当該処理群における葉の発生は、植栽後平均6.1日で起こり、一方その対照群においては、その発生は、植栽後平均7.7日で起こり、21%の発生における加速があった。当該処理群の葉は、28日間の期間中、その対照群を超えた、加速成長を現わし続けた。当該処理球根のケースにおける開花は、各場所に50

おける対照群と比較して、加速されていた。ヒヤシンス球根の春植えでは、著しい効果を表し、開花の早期発達と共に、加速された発生及び高さの相違を記録した。

【表 6】

	発生における総合差(日)	28日目での、高さ(インチ)における平均差	28日目の、10の処理植物当たりの開花数	28日目の、10の未処理の対照植物当たりの開花数
変化	1.67	2.94		
加速した発生	21%			
2014年3月4日の高さにおける、平均差		44%		
位置 1			10	4
位置 2			9	3
位置 3			10	1

10

20

30

40

50

【0251】

実施例 12 - イチゴ植物の成長及び生産における、無細胞上清組成物の効果

本研究では、イチゴの成長及び生産について、IN-M1からの無細胞上清（バッチ# EA 130129-2）の効果を試験した。

【0252】

方法：総面積 522,6 m<sup>2</sup> (5,625スクエアーフィート) の野外農地に、約 15 cm (6インチ) 間隔で各 650 の植物を含む 12 敵に植栽した。処理当たり 200 個の Albinon イチゴの種子を、その農地の中央 (4 から 6 敵) の 1 つの敵に、各敵の端に植えた 50 の対照植物（水で事前処理）と共に植えた。この試験農地で、9 つの異なる処理を適用した。

【0253】

イチゴの苗を、Nova Scotia 社から受け取り、及び 4 に保管した。植栽の 1 日前に、苗を、IN-M1 の無細胞上清（バッチ# EA 130129-2）の 1 / 40 希釀物の 6 リットルに浸した。最初に、苗を、完全にその処理液に沈め、及び次いで根を、4 時間浸したままにした。対照植物を、水で処理した。植栽後の 2.5 か月目に、その各自の処理液の約 30 ml で、各植物を浸すことによって、再処理した。

【0254】

イチゴの苗を、カナダ、オンタリオ州の Lambeth の農場に、手で植えた。土壤に、硝酸カルシウムと硝酸カリウムの等しい量を、週あたり 4.5 キロ (10 ポンド) で施肥した。クロロフィル含有量、葉の高さ及び幅を測定することによって、植物の成長を、植栽後の 6 週及び 11 週でモニターした。

【0255】

11 週の間に、その収穫期は始まり、及び約 2 か月間、2 日毎に、農場従事者によって

果実を集めました。各収穫の後、処理当たりの果実を計量し、及びその結果を、A & L Biologicalsに報告した。

#### 【0256】

データを、SASプログラム及びthe General Linear Model (GLM) Procedureを使用して解析した。この試験法によって、T-Tests (T検定)、Duncan's Multiple Range Test (ダンカンの多重比較検定)、及びTukey's Studentized Range (テューキーのスチューデント検定)を含む、3種類の異なる統計的検定の結果を得た。

#### 【0257】

結果：植栽後の6週間で、植物の成長をモニターし、及びIN-M1上清で処理したイチゴの苗ならびに対照の苗は、同様の成長生理状態を示した。クロロフィル含有量を、SPAD 502クロロフィルメーター（測定面積 = 2 mm × 3 mm, Konica）を使用して決定した。SPAD 502クロロフィルメーターで定められた値は、イチゴ植物の葉に存在するクロロフィルの相対量を示す。クロロフィルの読み取りは、処理当たり40植物の3枚の葉から行った。植物は、無差別に選択した。対照またはIN-M1無細胞上清処理の植物の間に、統計的に有意な差は無かった（図27）。

10

#### 【0258】

各処理当たり40植物を、無差別に選定し、及び葉の幅及び高さを、植物当たり4枚に葉に対して、測定した。図28A及び28Bのデータは、IN-M1無細胞上清で処理された植物からの葉の幅及び高さの各々は、対照の葉と比べて著しく大きいことを示す（p < 0.0001）。これらの結果は、IN-M1無細胞上清が、植物の成長を刺激したこと示す。

20

#### 【0259】

植栽後の11週目で、葉の高さ及び幅を、前述のように測定した。しかしながら、この時点では、処理及び対照の植物間で、統計的に有意な差は見出されなかった。

#### 【0260】

11週の間に、収穫期が始まり、及びそれ以降の2日ごとに、果実を収穫した。図29は、対照及びInocucor社品で処理した植物の間の、果実生産の経時的な比較を示す。一般に、処理された植物は、対照植物と比べて、全季節を通してより高い収穫量を生み、及びその生産は、時間が経ってもより一様に維持されていた。その最終収穫（19週目）後に集められたデータは、IN-M1無細胞上清処理の植物が、42.9キロ（94.63ポンド）を産出したが、一方対照植物は、32.8キロ（72.23ポンド）を産出した、ことを示した（図30）。これは、収穫量で31%の増加を表す。

30

#### 【0261】

本研究のデータは、植栽前に、イチゴの種子をIN-M1無細胞上清で処理することは、早期段階で植物の成長を改善し、及びより重要なことは、イチゴ生産量を、対照植物と比べて、31%まで増加させたことを表す。類似の結果は、当該IN-M2無細胞上清を含む、その他に開示される組成物での処理でも期待される。

#### 【0262】

実施例13 - 温室栽培のトウモロコシ植物の成長及び生産における、無細胞上清組成物の効果

40

本研究では、温室栽培のトウモロコシの成長及び生産において、IN-M1無細胞上清の効果の試験を実施した。

#### 【0263】

方法：本研究は、各処理の4複製群を伴い、ポット当たり4つのトウモロコシ植物を利用した。この植物を、Hogren's肥料（1/2の強さ）を入れたPromix土壤に植えた。その処理は、投与1は1対100希釀、IN-M1無細胞上清を5回適用（投与1：苗段階で）、投与2は初回適用後の1週間で、投与3は初回適用後の3週間で、投与4は初回適用後の6週間で、及び投与5は初回適用後の9週間で適用した。最終収穫で、植物当たり全ての葉を、葉面積の測定に使用した。

50

**【 0 2 6 4 】**

結果：このデータは、IN-M1無細胞上清の1対100希釈物で処理したトウモロコシ植物は、対照植物と比べて、土壌から発生において、平均で20%の増加があったことを示した。さらに、この実験の結論として、処理された植物は、対照植物と比べて、植物の高さにおいて、平均で17%の増加があった。対照植物と比べて、処理された植物当たりの葉の数に増加は無かったが、対照植物と比べて、処理された植物の葉面積（11%増加）及び乾燥バイオマス（12%増加）に増加があった。

**【 0 2 6 5 】**

実施例14 - 野外条件下のトウモロコシ植物の成長及び生産における、無細胞上清組成物の効果

10

本研究では、温室栽培のトウモロコシの成長及び野外条件下での生産において、IN-M1無細胞上清の効果の試験を実施した。

**【 0 2 6 6 】**

方法：植物に、苗の段階で、当該IN-M1無細胞上清の1対100希釈物を与え、及び野外に移植するまで湿った状態に置いた。野外への移植に際して、当該IN-M1無細胞上清の1対100希釈物の葉面散布を、週に一度実施した。

**【 0 2 6 7 】**

結果：当該処理された植物は、15日で、発生において20%の増加を示した。特に、当該処理された植物について、15日で64%の発生率であったのに対し、当該対照植物については、15日で44%の発生率であった。葉の発達の進行状況に対するデータ（植栽後、6～43日の期間に及ぶ）を、図31に示す。このデータは、葉の発達の進行状況において、その次の葉に移る曲線の先端が、対照植物に比べて、処理された植物の方が迅速に伸びている、ことを示す。

20

**【 0 2 6 8 】**

実施例15 - 野外条件下の大豆植物の成長及び生産における、無細胞上清組成物の効果

本研究では、温室栽培のトウモロコシの成長及び生産において、IN-M2無細胞上清の効果の試験を実施した。この研究は、カナダのケベック州、Montrealにある、McGill University（マギル大学）のLodds Agronomy Research Centre（ロッズ農業経済学研究所）で実施された。当該IN-M2無細胞上清を、3つの三出葉の作物段階で、葉面散布として噴霧し、及びその作物収穫量を、その季節の最後に評価した。この葉面散布剤には、下記の表に示すように、除草剤（Nufarm Polaris（登録商標）, Nufarm Agriculture, Inc., Calgary, Alberta, Canada、2.5 L / haの有効量を適用）及び微量製剤（Crop Booster（登録商標）, Axter Agroscience, Inc., Mont St-Hilaire, Quebec, Canada、2 L / haの有効量を適用）を含んでいた。2013年及び2104年各々の、異なる2回の生育期の収穫量は、以下の表7及び8のようである。

30

【表7】

番号	処理	2013年収穫量*	増加した収穫量**
1	除草剤	5058	
2	除草剤 + 収穫促進剤	5481	
3	除草剤 + 収穫促進剤 + IN-M2 (1対25)	5594	
4	除草剤 + 収穫促進剤 + IN-M2 (1対100)	5619	11.0%
5	除草剤 + 収穫促進剤 + IN-M2 (1対1000)	5244	

\* kg / ヘクタール

\*\* 対照サンプルとの比較

10

20

【表8】

番号	処理	収穫量*	増加した収穫量**
1	除草剤	5033	
2	除草剤 + 収穫促進剤	5303	
3	除草剤 + 収穫促進剤 + IN-M2 (1対100)	5514	10.0%

\* kg / ヘクタール

\*\* 対照サンプルとの比較

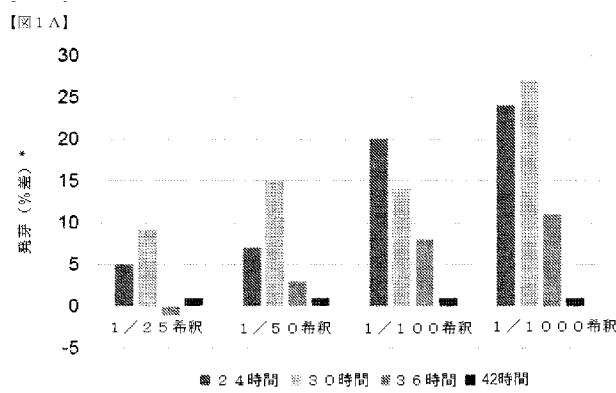
30

【0269】

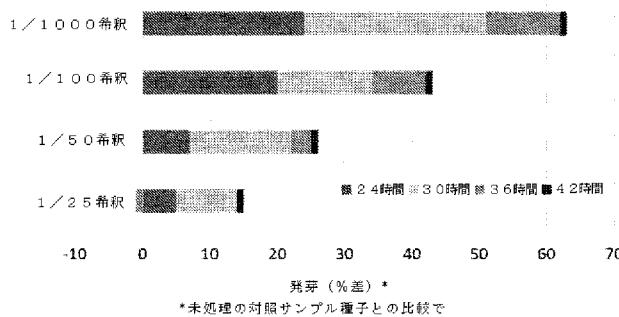
本開示の範囲または精神を逸脱すること無く、多様な修正及び変更が、本開示において行われ得ることは、当業者には明らかであろう。本開示のその他の態様は、本明細書の考察及び本明細書の開示の実践から、当業者には明らかであろう。本明細書及び実施例は、以下の請求項によって示される本開示の真の範囲及び趣旨を伴って、例示目的だけに考慮されるべきであることを意図している。

40

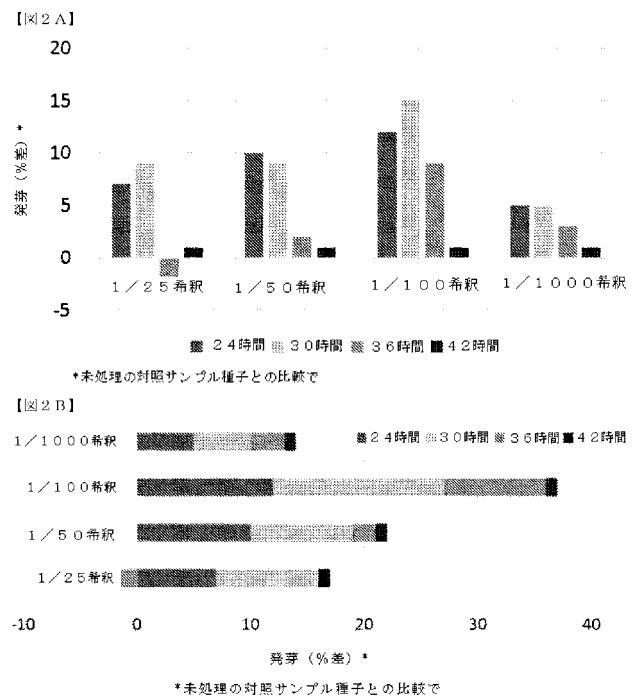
【図1】



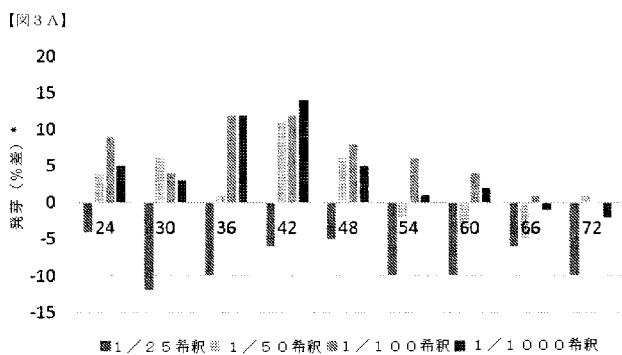
【図1B】



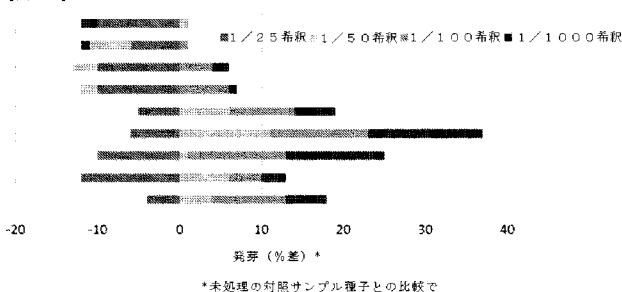
【図2】



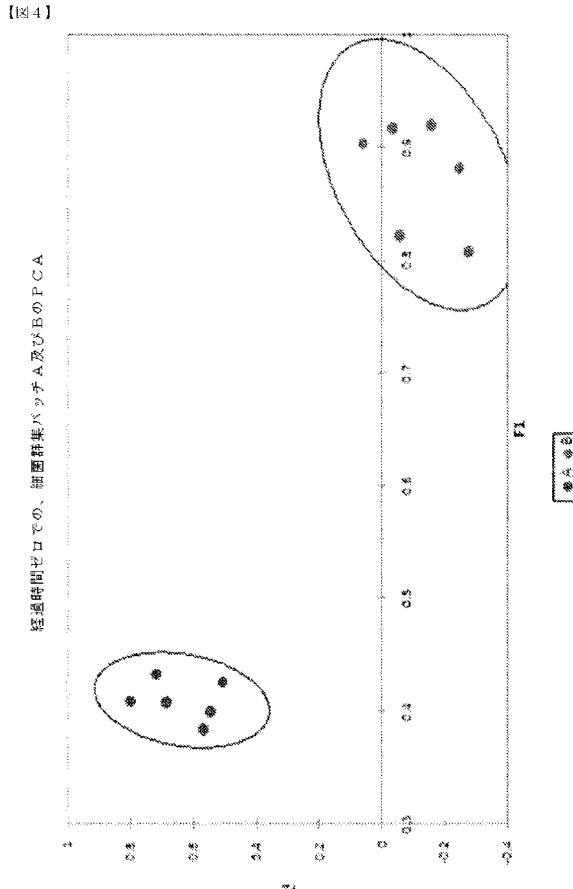
【図3】



【図3B】



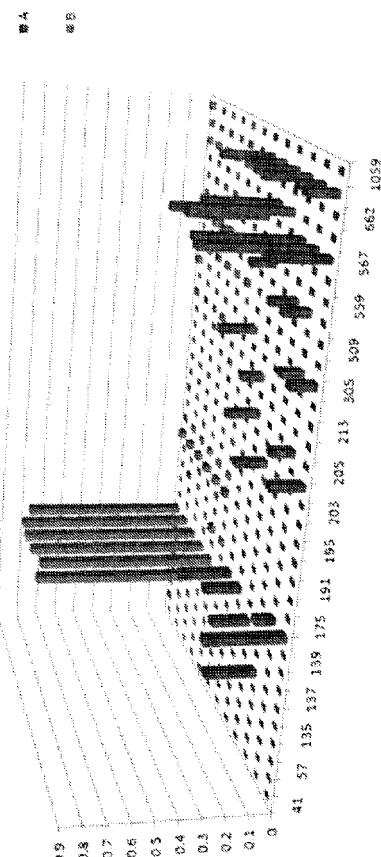
【図4】



【図 5】

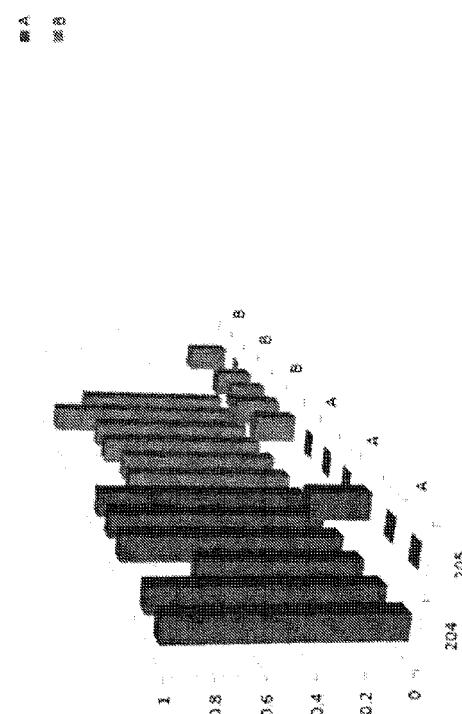
【図 5】

6 日 B を使用した、経過時間ゼロでの、バッチ A 及び B に存在する細菌群集のビーグ強度プロファイル。



【図 6】

【図 6】

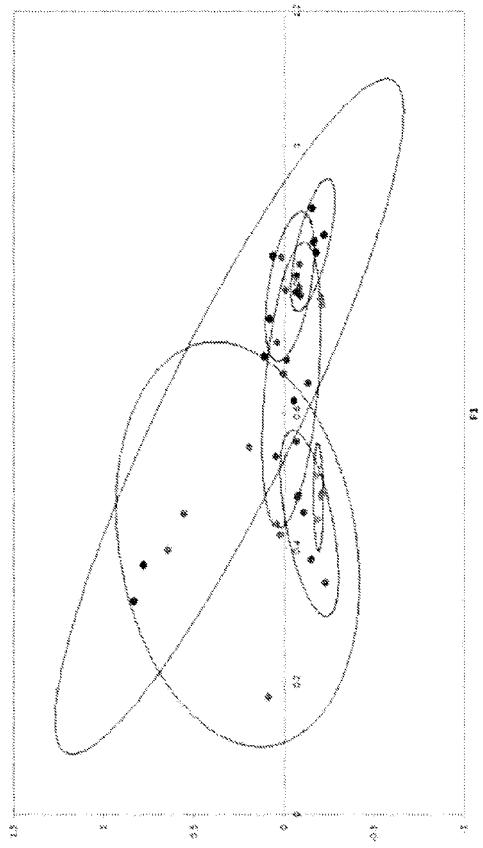


経過時間ゼロで採取した、バッチ A 及び B に存在する細菌群集のビーグ強度

【図 7】

【図 7】

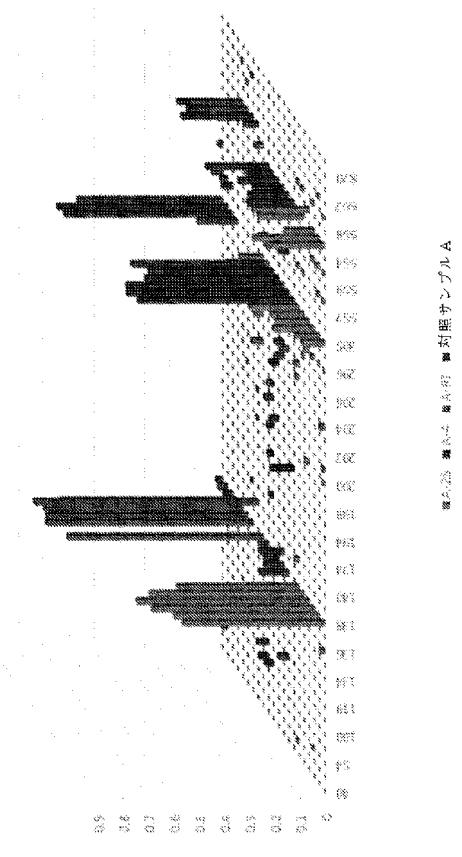
異なる 4 温度で 1か月成長後の、バッチ A 及び B に存在する細菌群集の PCA。



【図 8】

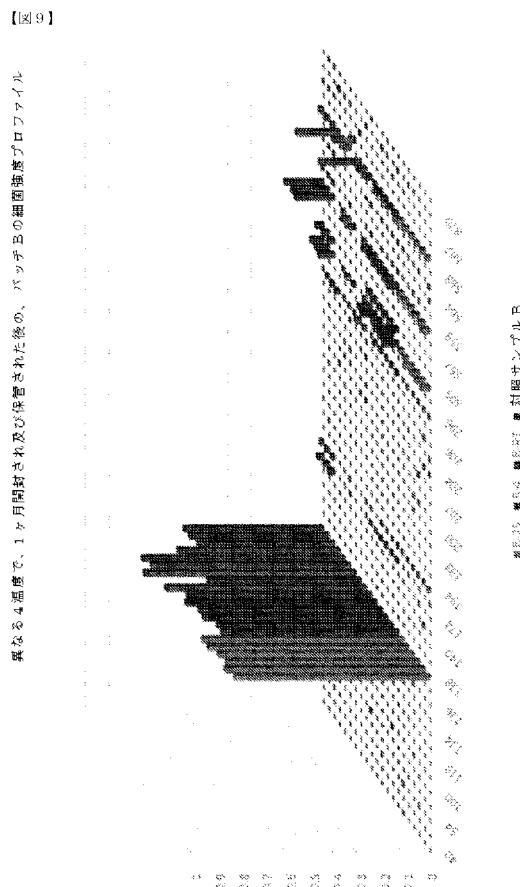
【図 8】

異なる 4 温度で、1ヶ月開封され及び保管された後、バッチ A の細菌強度プロファイル

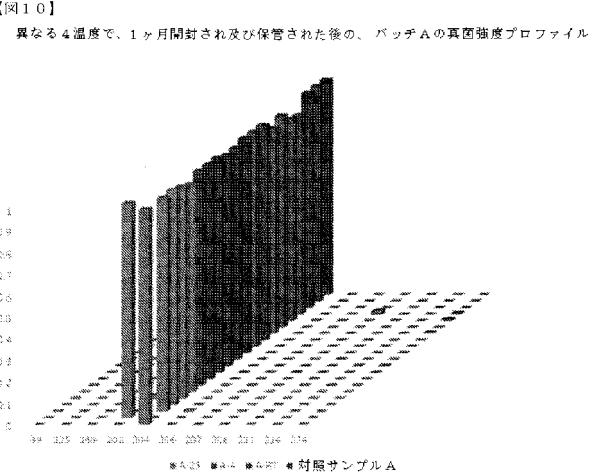


経過時間ゼロで採取した、バッチ A 及び B に存在する細菌群集のビーグ強度

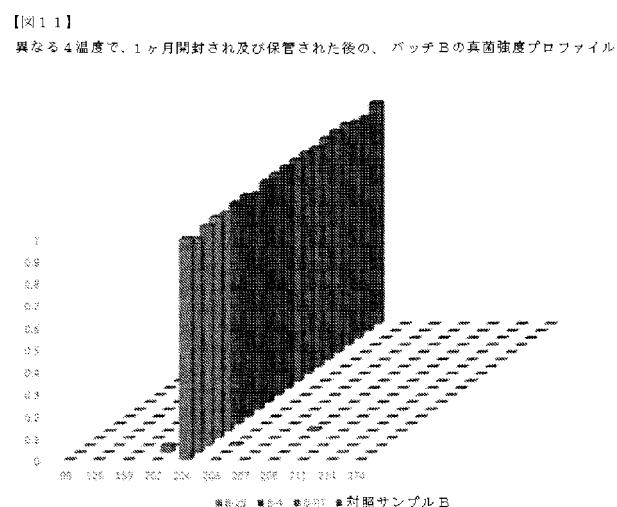
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【図 12】

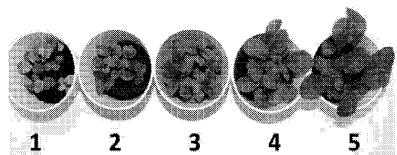
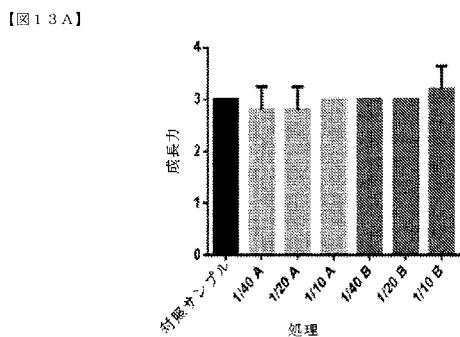
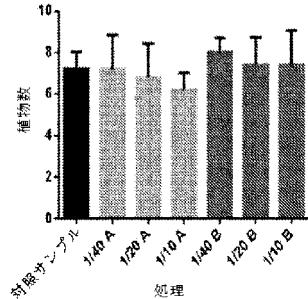


FIG. 12

【図 13 - 1】

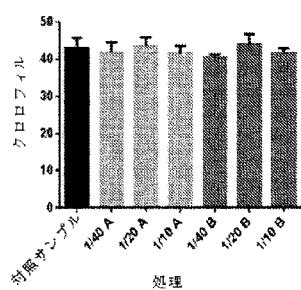


【図 13 B】

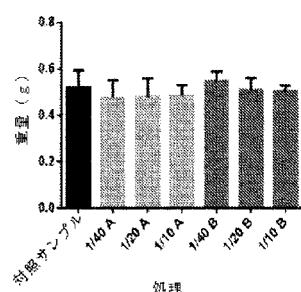


【図 1 3 - 2】

【図 1 3 C】

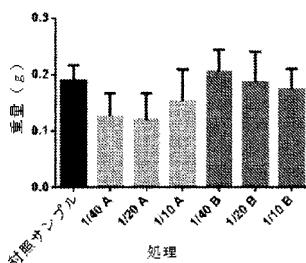


【図 1 3 D】

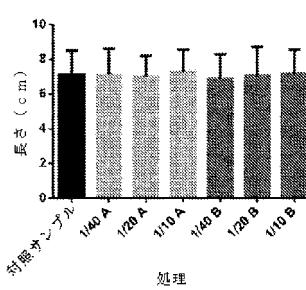


【図 1 3 - 3】

【図 1 3 E】

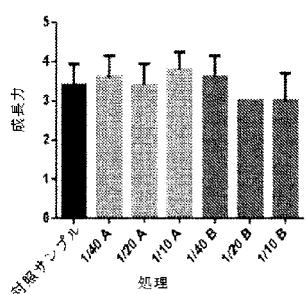


【図 1 3 F】

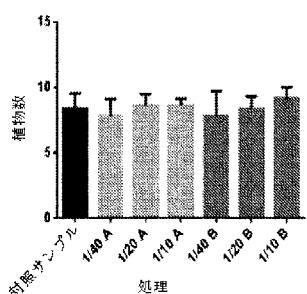


【図 1 4 - 1】

【図 1 4 A】

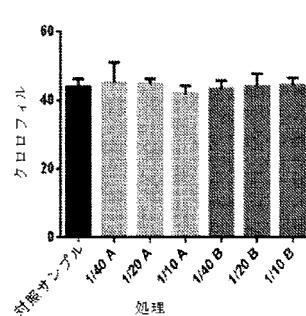


【図 1 4 B】

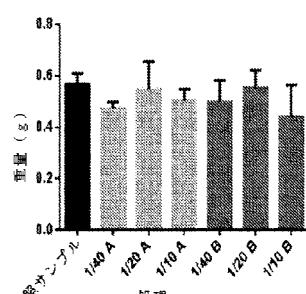


【図 1 4 - 2】

【図 1 4 C】

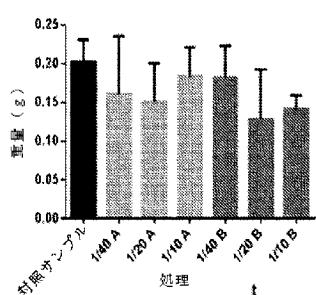


【図 1 4 D】

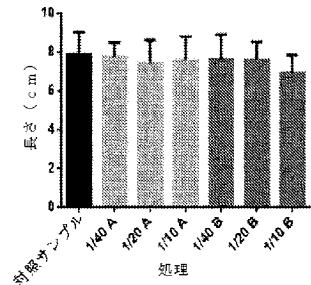


【図 1 4 - 3】

【図 1 4 E】



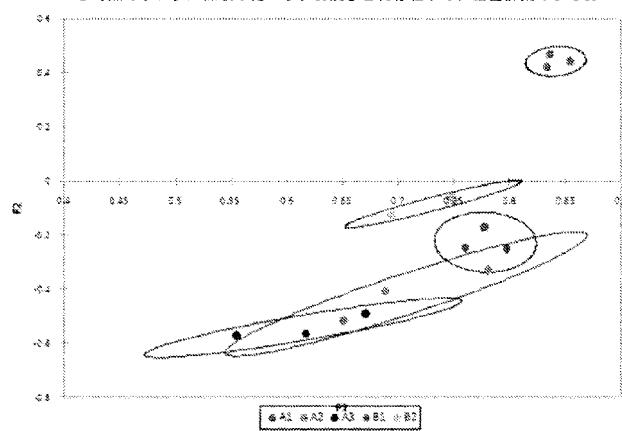
【図 1 4 F】



【図 1 5】

【図 1 5】

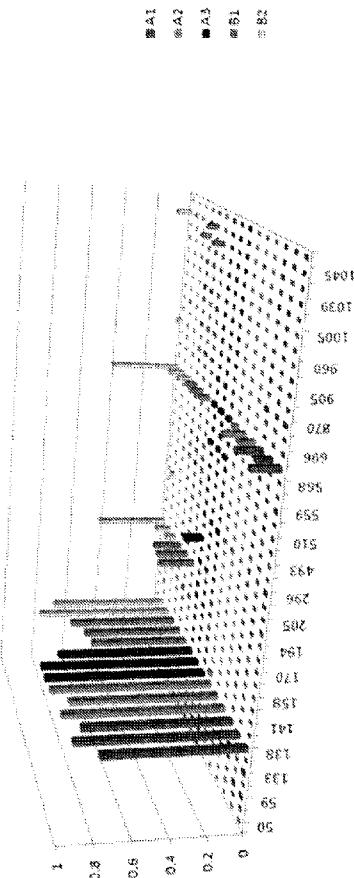
2時点でサンプル採取したパッチA及びBに存在する、細菌群集のPCA



【図 1 6】

【図 1 6】

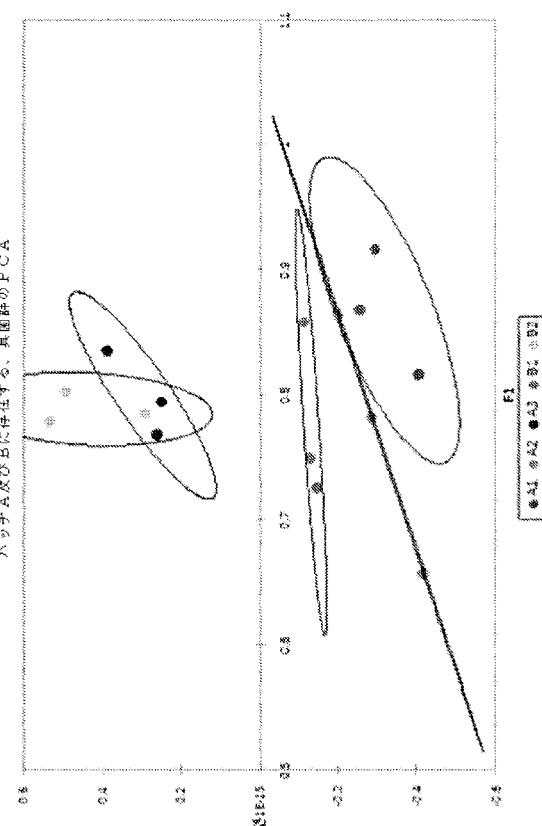
2時点でサンプル採取したパッチA及びBに存在する、細菌群集のピーケ強度プロファイル



【図 1 7】

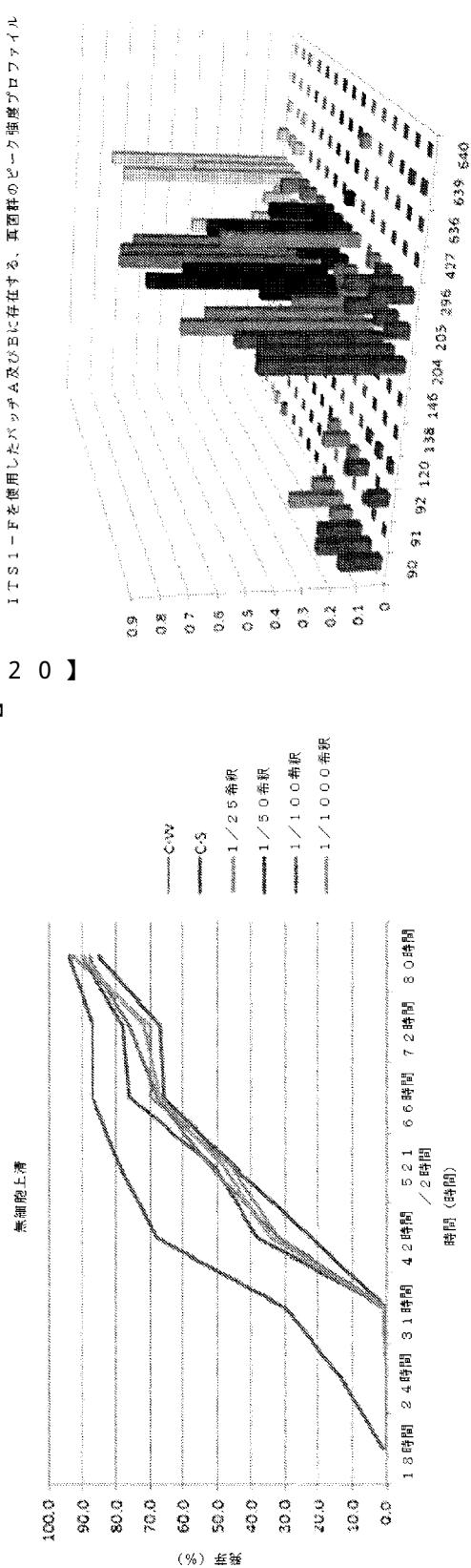
【図 1 7】

パッチA及びBに存在する、真菌群のPCA



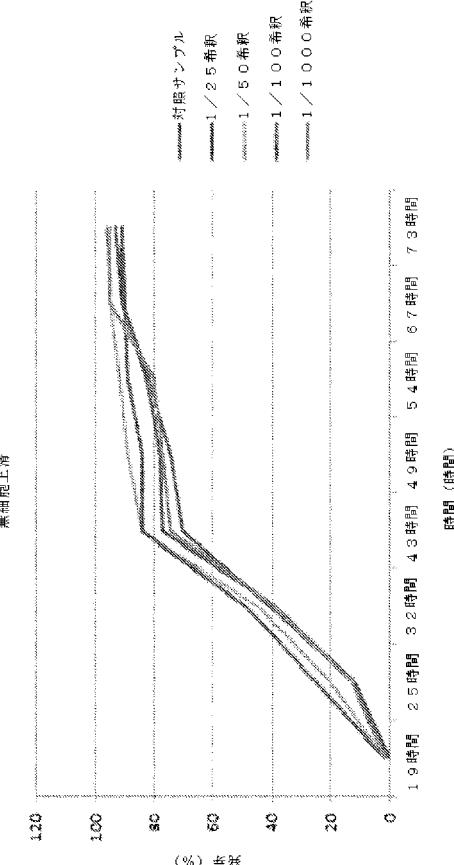
【図 18】

[図 18]



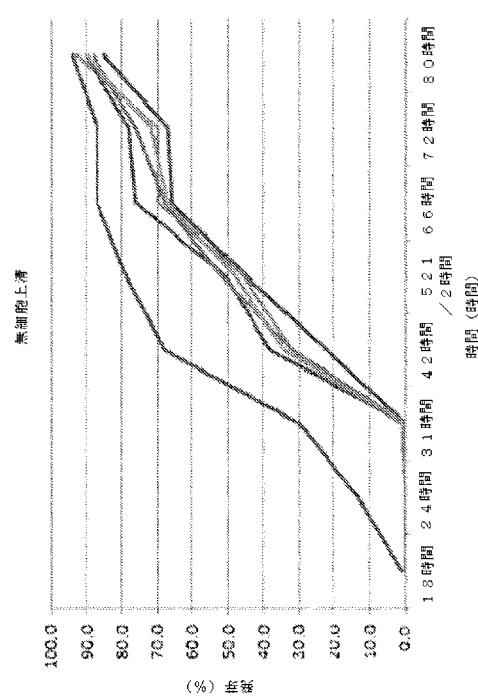
【図 19】

[図 19]



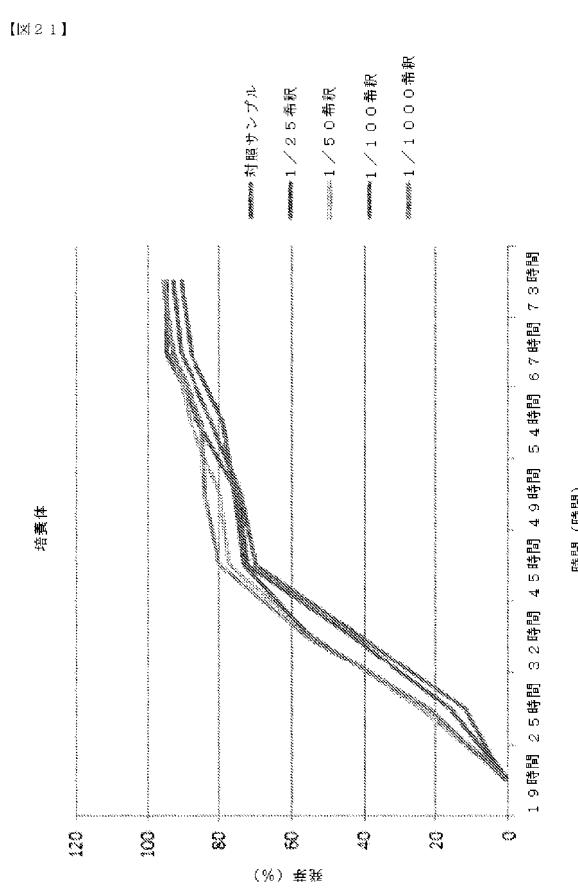
【図 20】

[図 20]



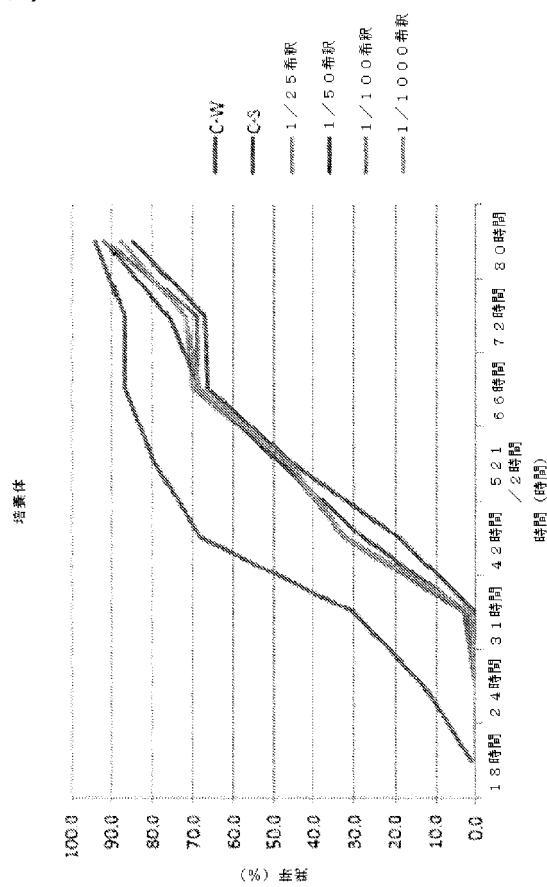
【図 21】

[図 21]



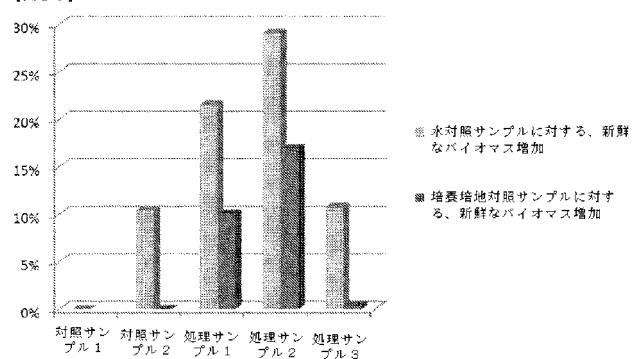
【図 2 2】

【図 2 2】



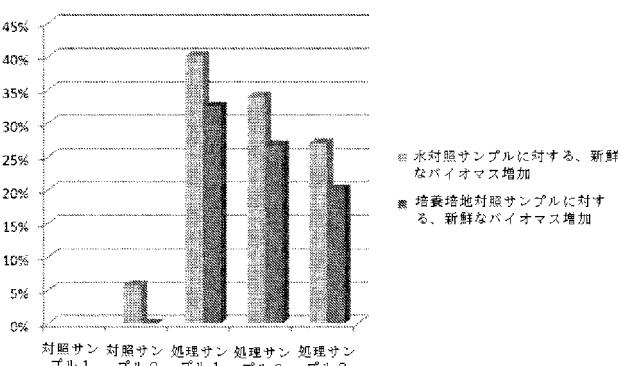
【図 2 3】

【図 2 3】



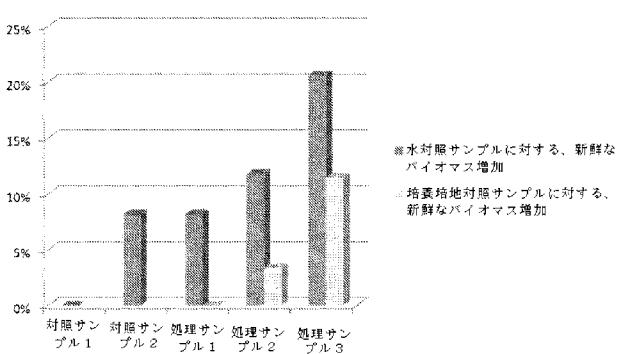
【図 2 4】

【図 2 4】



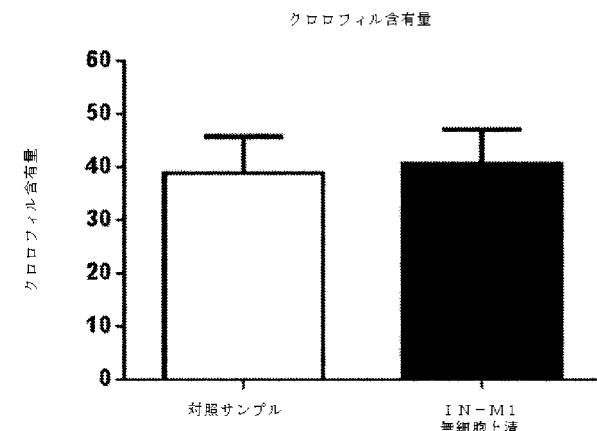
【図 2 5】

【図 2 5】



【図 2 7】

【図 2 7】



【図 2 6】

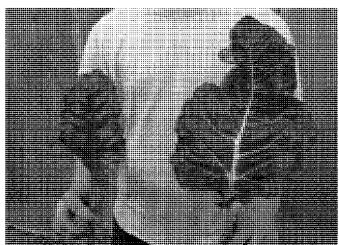
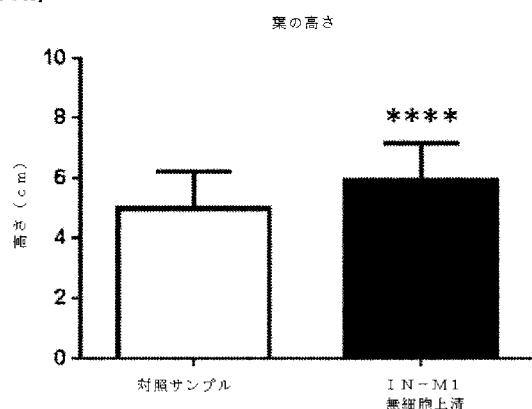


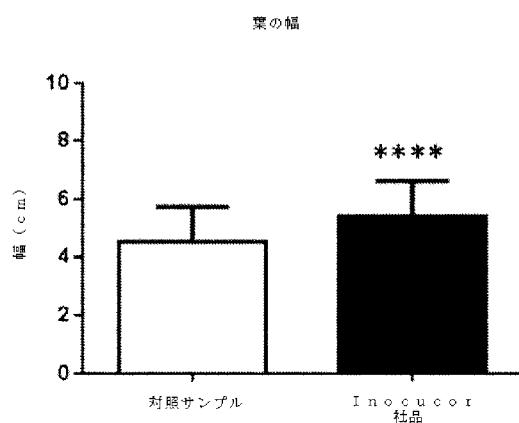
FIG. 26

【図 28】

【図 28A】

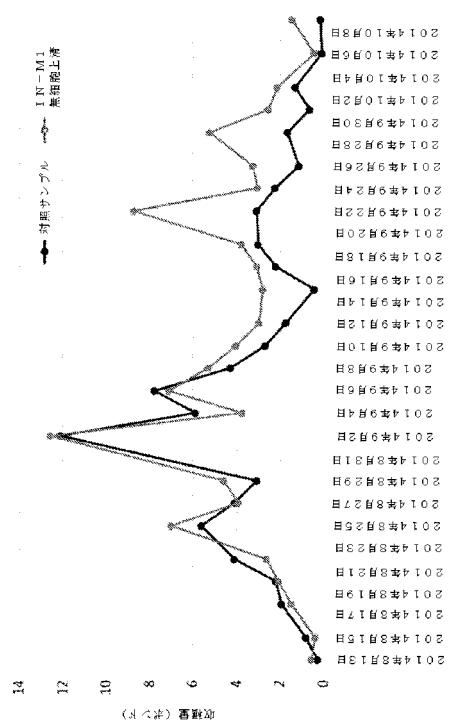


【図 28B】



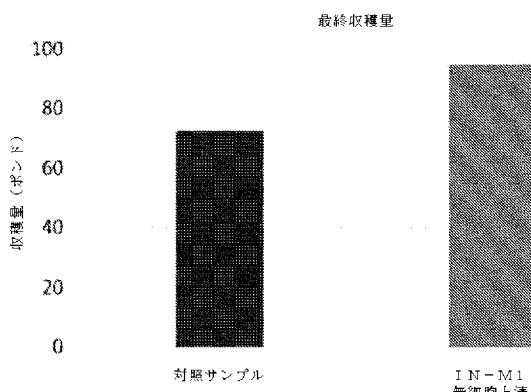
【図 29】

【図 29】



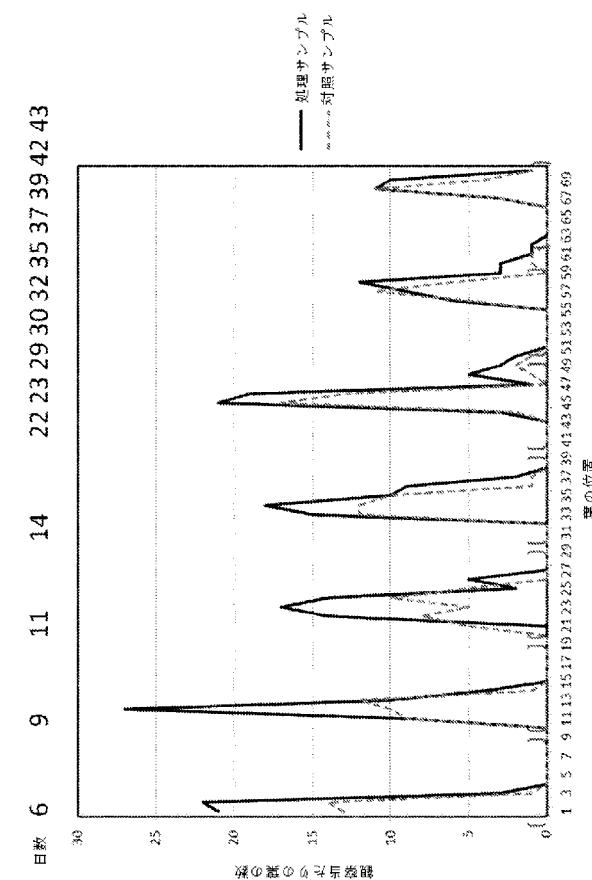
【図 30】

【図 30】



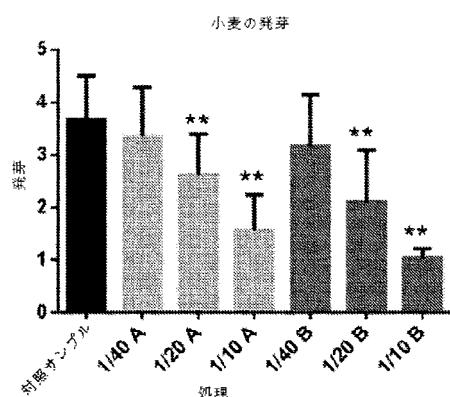
【図 31】

【図 31】



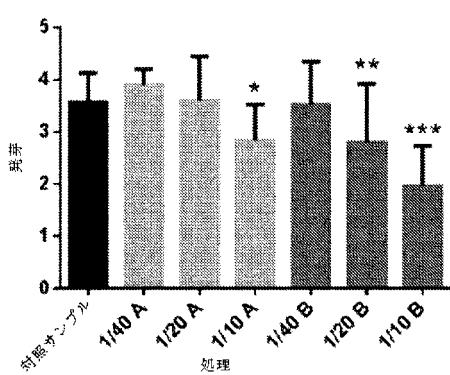
【図 3 2 - 1】

【図 3 2 A】



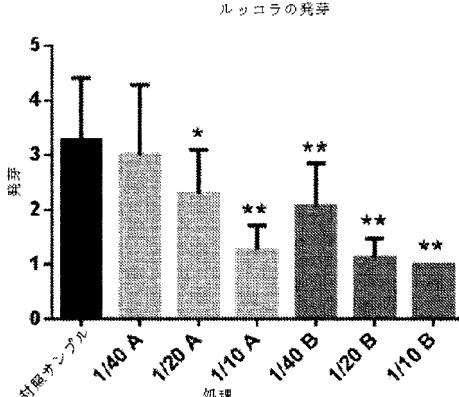
【図 3 2 B】

キャノーラの発芽



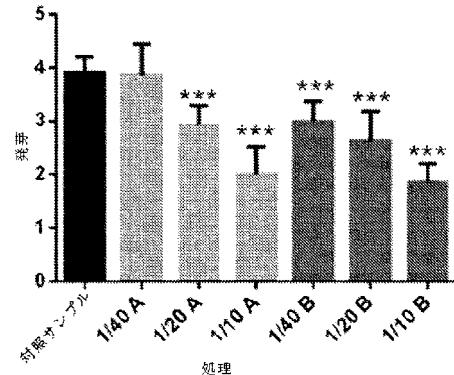
【図 3 2 - 2】

【図 3 2 C】



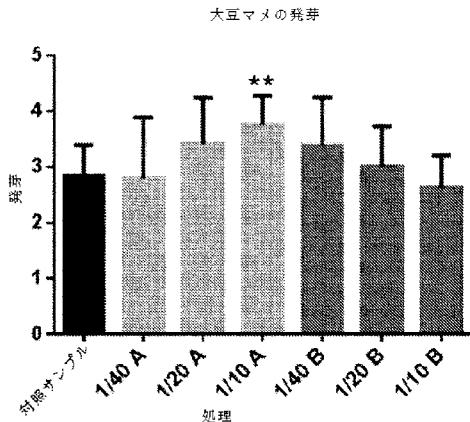
【図 3 2 D】

大根の発芽



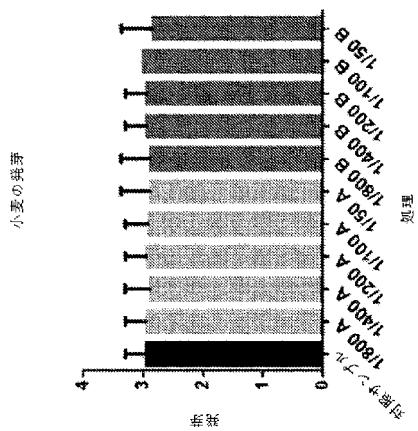
【図 3 2 - 3】

【図 3 2 E】

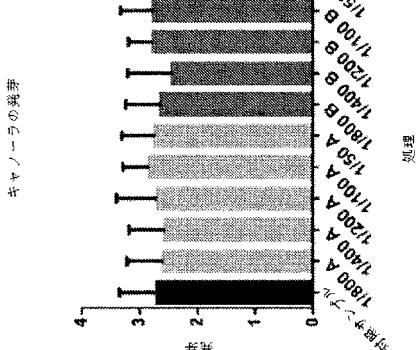


【図 3 3 - 1】

【図 3 3 A】

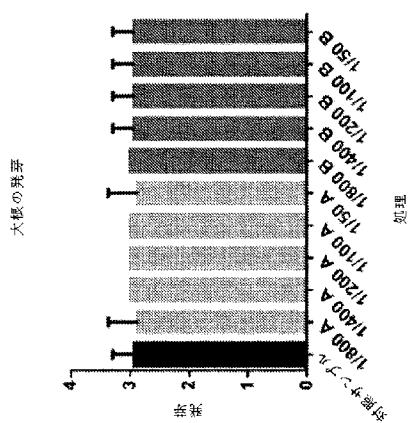


【図 3 3 B】

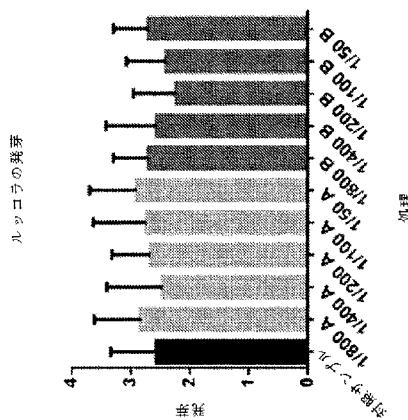


## 【図 3 3 - 2】

【図3 2 C】



【図3 2 D】



## 【配列表】

2017534671000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/IB2015/001950</b>						
<p><b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>            IPC: <i>A01N 63/02</i> (2006.01), <i>A01P 21/00</i> (2006.01), <i>C12N 1/00</i> (2006.01), <i>C12N 1/14</i> (2006.01),  <i>C12N 1/16</i> (2006.01), <i>C12N 1/20</i> (2006.01), <i>C12P 1/00</i> (2006.01), <i>C05F 11/08</i> (2006.01)            According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>								
<p><b>B. FIELDS SEARCHED</b></p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)            Keyword search across all classifications</p>								
<p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p>								
<p>Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used)  <b>Databases:</b> Questel Orbit, NCBI, Google Patent, Canadian Patent Database  <b>Keywords:</b> <i>Lactobacillus, helveticus, Aspergillus, oryzae, Lactobacillus, casei, Rhodopseudomonas, palustris, Bacillus, subtilis, Saccharomyces, cerevisiae</i></p>								
<p><b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category*</th> <th style="width: 80%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 10%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>WO2012/101528 A2 (BYWATER-EKEGARD, M. et al.) 2 August 2012 (02-08-2012)</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	WO2012/101528 A2 (BYWATER-EKEGARD, M. et al.) 2 August 2012 (02-08-2012)	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
A	WO2012/101528 A2 (BYWATER-EKEGARD, M. et al.) 2 August 2012 (02-08-2012)							
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.						
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family						
Date of the actual completion of the international search 23 February 2016 (23-02-2012)		Date of mailing of the international search report 04 April 2016 (04-04-2016)						
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476		Authorized officer Brad Temple (819) 576-2089						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members			International application No. <b>PCT/IB2015/001950</b>
Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO2012101528A2	02 August 2012 (02-08-2012)	WO2012101528A2 WO2012101528A8 WO2012101528A3 AU2012210260A1 CA2839383A1 CN103649303A EP2663635A2 EP2663635A4 US2014120601A1 US9175258B2	02 August 2012 (02-08-2012) 10 January 2013 (10-01-2013) 14 March 2013 (14-03-2013) 29 August 2013 (29-08-2013) 02 August 2012 (02-08-2012) 19 March 2014 (19-03-2014) 20 November 2013 (20-11-2013) 17 February 2016 (17-02-2016) 01 May 2014 (01-05-2014) 03 November 2015 (03-11-2015)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 01 G 7/00 (2006.01)	C 05 F 11/08	4 H 0 6 1
A 01 C 1/00 (2006.01)	A 01 G 7/00	6 0 4 Z
A 01 H 17/00 (2006.01)	A 01 G 7/00	6 0 5 Z
C 12 N 15/09 (2006.01)	A 01 C 1/00	A
C 12 N 1/14 (2006.01)	A 01 H 17/00	
C 12 N 1/16 (2006.01)	C 12 N 15/00	A
C 12 N 1/20 (2006.01)	C 12 N 1/14	A
	C 12 N 1/16	
	C 12 N 1/20	A

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 バイウォーター - エケガード、マーガレット

カナダ国 ジェイ0イー 1ブイ0 ケベック州 ラックプロム グローブ 20

(72)発明者 フィツシモンズ、アナンダ

カナダ国 ジェイ0ジェイ 1シー0 ケベック州 フレリトピュール シュマン マッキントッシュ 5

Fターム(参考) 2B022 EA10

2B030 CA28

2B051 AA01 AB01 AB06 AB07 BA01 BA04 BB02

4B065 AA15X AA30X AA41X AA60X AA73X AA79X CA53

4H011 AB01 AB03 BA06 BB09 BB21

4H061 AA01 DD07 DD08 EE66 FF01 FF07 HH01 HH07 KK01 KK02

KK05 KK07