



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0039170

(51)^{2020.01} A01N 63/32; C12P 19/44; A01M 17/00; (13) B
A01N 63/30

(21) 1-2019-03209

(22) 16/11/2017

(86) PCT/US2017/062056 16/11/2017

(87) WO 2018/094075 24/05/2018

(30) 62/422,918 16/11/2016 US

(45) 25/03/2024 432

(43) 25/09/2019 378A

(73) LOCUS AGRICULTURE IP COMPANY, LLC (US)

30500 Aurora Road, Suite 180, Solon, OH 44139, United States of America

(72) FARMER, Sean (US); ZORNER, Paul, S (US); ALIBEK, Ken (US);

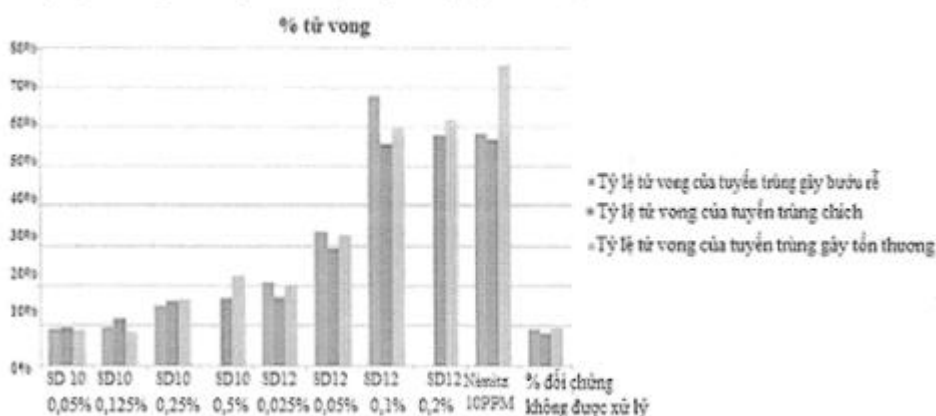
MILOVANOVIC, Maja (US); MAZUMDER, Sharmistha (US); DIXON, Tyler (US);
FOTSCH, Alex (US).

(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT TUYẾN TRÙNG

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát lây nhiễm, cụ thể là tuyến trùng. Sáng chế còn đề cập chế phẩm chứa chất hoạt động bề mặt sinh học như là thuốc trừ sâu.

Tỷ lệ tử vong của tuyến trùng được xử lý qua các nghiên cứu



Lĩnh vực kỹ thuật sáng chế đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát sinh vật gây hại cho cây trồng, cụ thể hơn là phương pháp kiểm soát tuyến trùng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Để tăng năng suất và bảo vệ cây trồng chống lại mầm bệnh, sâu bệnh, và dịch bệnh, nông dân đã phụ thuộc rất nhiều vào việc sử dụng hóa chất tổng hợp và phân bón hóa học; tuy nhiên, khi sử dụng quá mức hoặc không đúng cách, các chất này có thể chảy vào nước bề mặt, thấm vào nước ngầm, và bay hơi trong không khí. Do các nguồn gây ô nhiễm không khí và nước, nên các chất này ngày càng được xem xét kỹ lưỡng, khiến cho việc sử dụng có trách nhiệm của chúng trở thành tình trạng cấp bách đối với hệ sinh thái và thương mại. Ngay cả khi được sử dụng đúng cách, việc phụ thuộc quá mức và sử dụng lâu dài một số loại phân bón hóa học và thuốc trừ sâu có thể làm thay đổi nghiêm trọng hệ sinh thái đất, giảm khả năng chịu căng thẳng, tăng khả năng kháng sâu bệnh, cản trở sự phát triển và sức sống của cây trồng và động vật.

Tuyến trùng là lớp giun tròn hoặc giun chỉ thuộc ngành Nematoda. Các ví dụ về lớp là các tuyến trùng hình nang thuộc chi *Heterodera* (ví dụ, *H. glycines*, *H. avenae*, và *H. schachtii*) và *Globodera* (ví dụ, *G. rostochiensis* và *G. pallida*), các tuyến trùng gây mập rễ thuộc chi *Trichodorus*, các tuyến trùng gây bệnh ở củ và thân thuộc chi *Ditylenchus*, tuyến trùng vàng, *Heterodera rostochiensis*, các tuyến trùng gây bươu rễ thuộc chi *Meloidogyne* (ví dụ, *M. javanica*, *M. hapla*, *M. arenaria* và *M. incognita*), các tuyến trùng gây tổn thương rễ thuộc chi *Pratylenchus* (ví dụ, *P. goodeyi*, *P. penetrans*, *P. bractrvurus*, *P. zaeae*, *P. coffeae*, *P. bractrvurus*, và *P. thornei*), các tuyến trùng gây bệnh trên cam quýt thuộc chi *Tylenchulus*, và các tuyến trùng chích thuộc chi *Belonolaimus*.

Các tuyến trùng đã được biết là lây nhiễm cho cả thực vật và động vật. Những con giun siêu nhỏ này có thể được tìm thấy ở hầu hết các loại môi trường. Khi cư trú trong đất, tuyến trùng ăn rễ cây, gây thiệt hại đáng kể cho cấu trúc rễ và sự phát triển bất thường của cây. Các ảnh hưởng thường được biểu hiện bằng sự phát triển các vết u sọc, bươu rễ và các bất thường khác. Sự hình thành những u sọc dẫn đến giảm kích thước rễ

và làm giảm hiệu quả hệ thống rễ, do đó, ảnh hưởng nghiêm trọng đến các bộ phận khác của cây. Kết quả là, cây trở nên yếu dễ bị tấn công bởi các mầm bệnh khác. Nếu không được xử lý đúng cách, cây sẽ chết. Các tuyến trùng gây ra thiệt hại hàng triệu đô la mỗi năm cho cỏ, cây cảnh và cây lương thực.

Tuyến trùng gây bướu rễ (*Meloidogyne spp.*) là một trong ba giống gây thiệt hại kinh tế nhất của các tuyến trùng ký sinh thực vật trên cây trồng trong vườn và trên cánh đồng. Các tuyến trùng gây bướu rễ được phân bố trên toàn thế giới, và là ký sinh trùng bắt buộc ở rễ của hàng nghìn loài thực vật bao gồm cây một lá mầm, hai lá mầm, cây thân thảo và cây thân gỗ. Rau trồng ở vùng khí hậu ẩm có thể bị thiệt hại nghiêm trọng từ các tuyến trùng gây bướu rễ và thường được xử lý thường xuyên bằng hóa chất diệt giun tròn. Thiệt hại của các tuyến trùng gây bướu rễ dẫn đến tăng trưởng kém, giảm chất lượng, giảm năng suất cây trồng và giảm sức đề kháng với các căng thẳng khác (ví dụ, hạn hán, các bệnh khác). Mức độ thiệt hại cao có thể dẫn đến mất mùa. Ví dụ, mất khoảng 1,5 tỷ đô la mỗi năm chỉ cho các tuyến trùng nang đậu tương.

Các chất diệt giun tròn thông thường được sử dụng để kiểm soát các tuyến trùng được ứng dụng trong luống hạt khi trồng. Do độc tính đối với các động vật gần đó, như chim, trực tiếp trung tâm trên không với ứng dụng dạng lỏng của các hợp chất độc hại như Nematicur, Temik, Furadan, Dazinat và Mocap đều không được ưa chuộng.

Từ những năm 1960, metyl bromua đã được người trồng cây sử dụng để khử trùng hiệu quả trước khi trồng, chủ yếu để kiểm soát tuyến trùng, cũng như xử lý bệnh và cỏ dại; tuy nhiên, vì hợp chất độc hại này được sử dụng ở dạng khí, hơn một nửa lượng được phun vào đất cuối cùng có thể đi vào trong khí quyển và góp phần làm mỏng tầng ozon. Năm 2005, các nước phát triển đã cấm metyl bromua theo Nghị định thư Montreal, là điều ước quốc tế được ký năm 1987 để bảo vệ lớp ozon ở tầng bình lưu.

Theo lệnh cấm, hiệp ước cho phép sử dụng hạn chế metyl bromua trong dâu tây, hạnh nhân, và các loại cây trồng khác vì thiếu các lựa chọn thay thế để kiểm soát tuyến trùng, bệnh và cỏ dại hiệu quả và có giá cả hợp lý. Mức độ được phép sử dụng giảm dần hàng năm và có thể sẽ kết thúc sớm. Do đó, việc tìm kiếm các chất thay thế cho metyl bromua là ưu tiên hàng đầu của người trồng cây và các cơ quan quản lý; tuy nhiên, không có sản phẩm nào cung cấp phổ kiểm soát rộng giống như metyl bromua cung cấp.

Việc đặt ra các quy định pháp lý điều chỉnh và sử dụng các hóa chất sẵn có, cũng

như nhu cầu của người tiêu dùng đối với thực phẩm không có dư lượng hóa chất, tăng trưởng bền vững đang tác động đến ngành công nghiệp và gây ra sự phát triển ý muốn liên quan đến cách thức để giải quyết vô số thách thức. Mặc dù việc cấm buôn bán hóa chất là không khả thi tại thời điểm này, nông dân đang chấp nhận sử dụng các biện pháp sinh học như là phần khả thi của các chương trình Quản lý dinh dưỡng tích hợp và Quản lý dịch hại tổng hợp.

Do những bất lợi của các phương pháp chủ yếu được mô tả ở trên, nhu cầu về thuốc trừ sâu an toàn hơn và các chiến lược kiểm soát dịch hại thay thế đang gia tăng. Đặc biệt là trong những năm gần đây, kiểm soát sinh học tuyến trùng đã thu hút được sự quan tâm lớn. Phương pháp này sử dụng các tác nhân sinh học như vi sinh vật sống, các sản phẩm sinh học có nguồn gốc từ các vi sinh vật này và kết hợp chúng làm thuốc trừ sâu. Những loại thuốc trừ sâu sinh học này có những ưu điểm quan trọng so với các loại thuốc trừ sâu thông thường khác. Ví dụ, chúng ít gây hại hơn so với thuốc trừ sâu hóa học thông thường. Chúng hiệu quả và đặc hiệu hơn, và chúng thường phân hủy sinh học nhanh chóng, dẫn đến ít gây ô nhiễm môi trường hơn.

Việc sử dụng thuốc trừ sâu sinh học và các tác nhân sinh học khác đã bị hạn chế rất nhiều bởi những khó khăn trong sản xuất, vận chuyển, quản lý, giá cả và hiệu quả. Ví dụ, nhiều vi sinh vật rất khó phát triển và sau đó khó triển khai cho các hệ thống sản xuất nông lâm nghiệp với số lượng đủ để sử dụng. Vấn đề này trở nên trầm trọng hơn do chúng mất khả năng sống sót và/hoặc hoạt động do xử lý, tạo thành, lưu trữ, ổn định trước khi phân phối, tạo bào tử của tế bào sinh dưỡng như biện pháp ổn định, vận chuyển và ứng dụng. Hơn nữa, một khi được ứng dụng, các sản phẩm sinh học có thể không phát triển vì bất kỳ lý do nào, bao gồm, ví dụ, mật độ tế bào ban đầu không đủ, không có khả năng cạnh tranh hiệu quả với hệ vi sinh vật hiện tại ở vị trí nhất định và được đưa vào đất và/hoặc các điều kiện môi trường khác trong đó vi sinh vật không thể phát triển hoặc thậm chí tồn tại.

Do đó, có nhu cầu cấp thiết để phát triển các phương pháp và nguyên liệu để sản xuất thuốc trừ sâu sinh học hiệu quả để kiểm soát tuyến trùng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các chế phẩm và phương pháp kiểm soát tuyến trùng. Ngoài ra, sáng chế đề xuất các phương pháp và các chế phẩm để ngăn ngừa thiệt hại cho cây trồng

từ tuyến trùng, nhờ đó tăng năng suất cây trồng. Hơn nữa, chế phẩm diệt côn trùng theo sáng chế sử dụng các chất không độc hại, chẳng hạn như vi sinh vật và các sản phẩm phụ của nuôi cấy vi sinh vật.

Trong một phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp ngăn ngừa gây hại của tuyến trùng và kiểm soát tuyến trùng bao gồm các bước: nuôi cấy vi sinh vật tạo ra sản phẩm phụ phát triển vi khuẩn và cho tiếp xúc với tuyến trùng, hoặc môi trường chứa chúng, với lượng hiệu quả vi sinh vật và/hoặc sản phẩm phụ phát triển vi khuẩn.

Trong một phương án, sản phẩm phụ phát triển vi khuẩn là chất hoạt động bề mặt sinh học. Theo một phương án, chất hoạt động bề mặt sinh học là glycolipit như rhamnolipit, sophorolipit (SLP), trehalosa lipit hoặc mannosylerythritol lipit (MEL). Trong các phương án ưu tiên, chất hoạt động bề mặt sinh học là SLP và/hoặc MEL.

Các chế phẩm diệt giun tròn gốc vi sinh vật của sáng chế có thể thu được thông qua các quá trình nuôi cấy từ quy mô nhỏ đến lớn. Các quy trình nuôi cấy này bao gồm nhưng không giới hạn ở nuôi cấy/lên men chìm, nuôi cấy bề mặt, lên men trạng thái rắn (solid state fermentation: SSF), và kết hợp của chúng. Thành phần chế phẩm diệt giun tròn có thể là, ví dụ, dịch lên men và/hoặc chất hoạt động bề mặt sinh học được tinh sạch.

Trong một số phương án, các vi sinh vật sản sinh chất hoạt động bề mặt sinh học trong chế phẩm có thể được nuôi cấy tại chỗ và sản xuất các chất hoạt động bề mặt sinh học sử dụng trực tiếp để kiểm soát tuyến trùng. Do đó, nồng độ cao chất hoạt động bề mặt sinh học và/hoặc vi sinh vật sản sinh chất hoạt động bề mặt sinh học tại nơi xử lý (ví dụ, đất) có thể đạt được một cách dễ dàng và liên tục.

Trong một phương án, hệ thống theo sáng chế bao gồm khía cạnh bổ sung cung cấp cho ứng dụng thực địa các sản phẩm gốc vi sinh vật. Các sản phẩm gốc vi sinh vật theo sáng chế có thể được ứng dụng, ví dụ, thông qua hệ thống tưới dưới dạng phun, xử lý hạt giống, cho bề mặt đất, trên bề mặt cây trồng và/hoặc trên sâu bệnh. Ứng dụng cơ học thông qua các dụng cụ thông thường hoặc ứng dụng robot thông qua máy bay không người lái trên không hoặc trên mặt đất cũng được sử dụng.

Chế phẩm diệt giun tròn có thể được sử dụng để bảo vệ thực vật, con người hoặc động vật bằng cách kiểm soát tuyến trùng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ thể hiện sự suy giảm khả năng vận động của tuyến trùng sau 3 ngày xử lý trong các điều kiện khác nhau: SD10 nồng độ 0,05% (v/v), 0,125% (v/v), 0,25% (v/v), và 0,5% (v/v), tương ứng; SD12 nồng độ 0,025% (v/v), 0,05% (v/v), 0,1% (v/v), và 0,2% (v/v), tương ứng; Nimitz® nồng độ 10 ppm (phần triệu) ai; và đối chứng không được xử lý, trong đó SD10 đề cập đến xử lý SLP, SD12 đề cập đến xử lý MEL;

Fig.2 là biểu đồ thể hiện tỷ lệ tử vong của tuyến trùng sau 3 ngày xử lý trong các điều kiện khác nhau: SD10 nồng độ 0,05% (v/v), 0,125% (v/v), 0,25% (v/v), và 0,5% (v/v), tương ứng; SD12 nồng độ 0,025% (v/v), 0,05% (v/v), 0,1% (v/v), và 0,2% (v/v), tương ứng; Nimitz® nồng độ 10 ppm ai; và đối chứng không được xử lý;

Fig.3 là biểu đồ thể hiện số lượng tuyến trùng sống sau 3, 14 và 23 ngày xử lý đất khác nhau trong các bình thử nghiệm tại phòng thí nghiệm bệnh lý học: SD10 nồng độ 0,25% (v/v), và 0,5% (v/v); SD12 nồng độ 0,1% (v/v), và 0,2% (v/v); SD10 (0,25% v/v) + SD12 (0,1% v/v); Nimitz® nồng độ 10 ppm pr; và đối chứng không được xử lý;

Fig.4 là biểu đồ thể hiện kiểm soát tuyến trùng sống (tức là, tuyến trùng chết) sau 3, 14 và 23 ngày xử lý đất khác nhau trong các bình thử nghiệm tại phòng thí nghiệm bệnh lý học: SD10 nồng độ 0,25% (v/v), và 0,5% (v/v); SD12 nồng độ 0,1% (v/v), và 0,2% (v/v); SD10 (0,25% v/v) + SD12 (0,1% v/v); Nimitz® nồng độ 10 ppm pr; và đối chứng không được xử lý;

Fig.5 là biểu đồ thể hiện số lượng tuyến trùng không vận động sau 3, 14 và 23 ngày xử lý đất khác nhau trong các bình thử nghiệm tại phòng thí nghiệm bệnh lý học: SD10 nồng độ 0,25% (v/v), và 0,5% (v/v); SD12 nồng độ 0,1% (v/v), và 0,2% (v/v); SD10 (0,25% v/v) + SD12 (0,1% v/v); Nimitz® nồng độ 10 ppm pr; và đối chứng không được xử lý;

Fig.6 là biểu đồ thể hiện số lượng tuyến trùng sống không vận động sau 3, 14 và 23 ngày xử lý đất khác nhau trong các bình thử nghiệm tại phòng thí nghiệm bệnh lý học: SD10 nồng độ 0,25% (v/v), và 0,5% (v/v); SD12 nồng độ 0,1% (v/v), và 0,2% (v/v); SD10 (0,25% v/v) + SD12 (0,1% v/v); Nimitz® nồng độ 10 ppm pr; và đối chứng không được xử lý;

Fig.7 là biểu đồ thể hiện tỷ lệ hình thành u sọ khi thu hoạch vi lô thí nghiệm đưa

chuột được xử lý với 5 phương pháp xử lý khác nhau: đối chứng không được xử lý; Nimitz® nồng độ 5 pt/a; xử lý đơn lẻ SD12 0,2% (ai/v); xử lý kép SD12 0,2% (ai/v); xử lý ba SD12 0,2% (ai/v);

Fig.8 là biểu đồ thể hiện số lượng tuyến trùng khi thu hoạch vi lô thí nghiệm đưa chuột được xử lý với 5 phương pháp xử lý khác nhau: đối chứng không được xử lý; Nimitz® nồng độ 5 pt/a; xử lý đơn lẻ SD12 0,2% (ai/v); xử lý kép SD12 0,2% (ai/v); xử lý ba SD12 0,2% (ai/v);

Fig.9 là biểu đồ thể hiện thiết lập mẫu đất để đánh giá hiệu quả của chất thu hút tuyến trùng, bao gồm các vị trí của vùng lây nhiễm tuyến trùng và vùng ứng dụng chất thu hút; và

Fig.10 là biểu đồ thể hiện tỷ lệ phần trăm lây nhiễm (của tổng số quần thể tuyến trùng) tại ba địa điểm khác nhau trong các ô để đánh giá chất thu hút tuyến trùng, trong đó “trung tâm” đề cập đến trung tâm của vùng lây nhiễm, “hấp dẫn” đề cập đến vùng hấp dẫn, và “không xử lý” đề cập đến tất cả các vùng nhỏ khác.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất nguyên liệu chế phẩm và phương pháp kiểm soát tuyến trùng. Sáng chế cũng đề xuất đến chế phẩm có thể được sử dụng làm thuốc trừ sâu để kiểm soát tuyến trùng. Sáng chế hơn nữa còn đề xuất các phương pháp để điều chế các chế phẩm này. Ngoài ra, sáng chế đề xuất các phương pháp và các chế phẩm để ngăn chặn thiệt hại cây trồng từ các tuyến trùng, từ đó dẫn đến tăng năng suất.

Các sản phẩm gốc vi sinh vật của sáng chế có thể được sử dụng trong các môi trường bao gồm nhưng không giới hạn ở các loại cây trồng, vật nuôi, lâm nghiệp, sân cỏ, đồng cỏ, sức khỏe con người và động vật.

Trong một phương án, chế phẩm kiểm soát tuyến trùng theo sáng chế chứa lượng hiệu quả của chất hoạt động bề mặt vi sinh vật và/hoặc vi sinh vật sản sinh chất hoạt động bề mặt sinh học.

Trong một phương án, phương pháp kiểm soát tuyến trùng bao gồm các bước để thu được chất hoạt động bề mặt vi sinh vật, và ứng dụng lượng hiệu quả của chất hoạt động bề mặt vi sinh vật vào các tuyến trùng hoặc vào vị trí của chúng.

Các chế phẩm theo sáng chế có thể thu được bằng cách, ví dụ, các quá trình nuôi

cây từ quy mô nhỏ đến quy mô lớn. Các quy trình nuôi cấy này bao gồm nhưng không giới hạn ở nuôi cấy/lên men chìm, nuôi cấy bề mặt, lên men trạng thái rắn (SSF), và kết hợp của chúng.

Sản phẩm của quá trình lên men chứa chất hoạt động bề mặt sinh học vi sinh vật có thể được sử dụng trực tiếp cho xử lý tuyến trùng mà không cần chiết xuất hoặc tinh sạch. Nếu cần thiết, chiết xuất và tinh sạch các chất hoạt động bề mặt sinh học có thể đạt được như mô tả trong sáng chế. Hơn nữa, phương pháp nuôi cấy theo sáng chế có thể tạo ra nồng độ cao vi sinh vật và nồng độ cao chất hoạt động bề mặt sinh học.

Trong các phương án nhất định, các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế làm giảm thiệt hại do tuyến trùng gây ra so với cây trồng không được xử lý ít nhất 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 70%, 80%, hoặc 90%.

Trong một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tăng năng suất thực vật hoặc cây trồng. Trong một số phương án nhất định, các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế làm tăng năng suất cây trồng ít nhất 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 70%, 80%, hoặc 90% so với cây trồng không được xử lý.

Trong một phương án, các phương pháp của sáng chế đã làm giảm số lượng trứng tuyến trùng trong rễ cây ít nhất 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 70%, 80%, hoặc 90% so với cây không được xử lý.

Trong một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tăng sản lượng hoặc kích thước của cây so với cây không được xử lý.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kiểm soát” được sử dụng để cập đến hoạt động được tạo ra bởi các chất hoạt động bề mặt sinh học hoặc vi sinh vật sản sinh chất hoạt động bề mặt sinh học có xu hướng tiêu diệt, vô hiệu hóa hoặc làm bất động sâu bệnh hoặc làm cho sâu bệnh không có khả năng gây hại.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất diệt giun tròn” có nghĩa là có khả năng kiểm soát tuyến trùng. Do đó, ví dụ, tiêu diệt tuyến trùng, giảm khả năng vận động của chúng và giảm số lượng trứng là tất cả các ví dụ về hoạt tính của chất diệt giun tròn.

Như được sử dụng ở đây, “chế phẩm gốc vi sinh vật” có nghĩa là chế phẩm bao gồm các thành phần được tạo ra do sự phát triển của vi sinh vật hoặc nuôi cấy tế bào khác. Do đó, chế phẩm gốc vi sinh vật có thể bao gồm chính các vi sinh vật và/hoặc sản

phẩm phụ cho sinh trưởng vi sinh vật. Các vi sinh vật có thể ở trạng thái sinh dưỡng, dạng bào tử, dạng sợi nấm, ở bất kỳ dạng mầm chồi nhân giống nào khác, hoặc hỗn hợp của chúng. Các vi sinh vật có thể là sinh vật phù du hoặc ở dạng màng sinh học, hoặc hỗn hợp của chúng. Các sản phẩm phụ cho sinh trưởng có thể là, ví dụ, các chất chuyển hóa, các thành phần màng tế bào, protein biểu hiện và/hoặc các thành phần tế bào khác. Các vi sinh vật có thể còn nguyên vẹn hoặc bị ly giải. Trong các phương án ưu tiên, các vi sinh vật có mặt trong dịch nuôi cấy của chế phẩm gốc vi sinh vật. Các tế bào có thể có mặt ở nồng độ, ví dụ, nồng độ 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , hoặc 1×10^{11} hoặc nhiều hơn các mầm chồi nhân giống trên mỗi mililit chế phẩm. Như được sử dụng ở đây, các mầm chồi nhân giống là bất kỳ phần nào của vi sinh vật mà từ đó sinh vật mới và/hoặc trưởng thành có thể phát triển bao gồm nhưng không giới hạn ở các tế bào, bào tử, sợi nấm, chồi và hạt.

Sáng chế còn đề xuất “các sản phẩm gốc vi sinh vật” là những sản phẩm sẽ được ứng dụng trong thực tế để đạt được kết quả mong muốn. Sản phẩm gốc vi sinh vật có thể chỉ đơn giản là chế phẩm gốc vi sinh vật được thu hoạch từ quá trình nuôi cấy bổ sung. Những thành phần bổ sung này có thể chứa, ví dụ, chất ổn định, chất đệm, các chất mang thích hợp như là nước, dung dịch muối hoặc bất kỳ chất mang thích hợp nào khác, các chất dinh dưỡng được bổ sung để hỗ trợ thêm cho sự phát triển vi sinh vật, các chất tăng trưởng không dinh dưỡng, như hormon thực vật và/hoặc các tác nhân tạo thuận lợi cho việc theo dõi các vi sinh vật và/hoặc thành phần trong môi trường mà nó được ứng dụng. Sản phẩm gốc vi sinh vật cũng có thể chứa hỗn hợp các chế phẩm gốc vi sinh vật. Sản phẩm gốc vi sinh vật cũng có thể chứa một hoặc nhiều thành phần của chế phẩm gốc vi sinh vật đã được xử lý theo một cách nào đó, nhưng không giới hạn ở lọc, ly tâm, ly giải, phun khô, tinh sạch và tương tự.

Vi sinh vật

Các chất hoạt động bề mặt sinh học vi sinh vật là các hợp chất được sản xuất bởi nhiều loại vi sinh vật như vi khuẩn, nấm và nấm men.

Trong một phương án, các vi sinh vật là vi khuẩn bao gồm vi khuẩn gram dương và gram âm. Những vi khuẩn này có thể bao gồm nhưng không giới hạn ở ví dụ như *Escherichia coli*, *Rhizobium* (ví dụ, *Rhizobium japonicum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium fredii*, *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii*, và *Rhizobium etli*),

Bradyrhizobium (ví dụ, *B. japonicum*, và *B. parasponia*), *Bacillus* (ví dụ, *B. subtilis*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. pumillus*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, và *B. amyloliquifaciens*), *Azobacter* (ví dụ, *A. vinelandii*, và *A. chroococcum*), *Arthrobacter* (ví dụ, *A. pascens*), *Agrobacterium* (ví dụ, *A. radiobacter*), *Pseudomonas* (ví dụ, *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* (Kluyver), *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. fragi*, và *P. syringae*), *Flavobacterium* spp.; *Azospirillum* (ví dụ, *A. brasiliensis*), *Azomonas*, *Derxia*, *Beijerinckia*, *Nocardia*, *Klebsiella*, *Clavibacter* (ví dụ, *C. xyli* subsp. *xyli* và *C. xyli* subsp. *cynodontis*), *Cyanobacteria*, *Pantoea* (ví dụ, *P. agglomerans*), *Sphingomonas* (ví dụ, *S. paucimobilis*), *Streptomyces* (ví dụ, *S. griseochromogenes*, *S. griseus*, *S. cacaoi*, *S. aureus*, và *S. kasugaensis*), *Streptoverticillium* (ví dụ, *S. rimofaciens*), *Ralslonia* (ví dụ, *R. eulophia*), *Rhodospirillum* (ví dụ, *R. rubrum*), *Xanthomonas* (ví dụ, *X. campestris*), *Erwinia* (ví dụ, *E. carotovora*), *Clostridium* (ví dụ, *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. acetobutyricum*, *C. beijerinckii*, *C. bravidaciens*, và *C. malacusomae*), *Rhodococcus*, *Campylobacter*, *Cornybacterium*) và kết hợp của chúng.

Trong một phương án khác, vi sinh vật là nấm men. Một số loài nấm men phù hợp để sản xuất theo sáng chế bao gồm nhưng không giới hạn ở *Saccharomyces* (ví dụ, *S. cerevisiae*, *S. bouldarii sequela* và *S. torula*), *Debaromyces*, *Issalchenkia*, *Candida* (*C. albicans*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. lipolytica*, và *C. torulopsis*), *Kluyveromyces* (ví dụ, *K. lactis*, *K. fragilis*), *Pichia* (ví dụ, *Pichia pastoris*), *Wickerhamomyces*, *Starmerella* (ví dụ, *Starmerella bombicola*), và/hoặc kết hợp của chúng.

Trong một phương án, nấm men là nấm men sát thủ. Như được sử dụng ở đây, “nấm men sát thủ” nghĩa là chủng nấm men được đặc trưng bằng cách tiết ra các protein hoặc glycoprotein độc hại mà chính chủng đó miễn dịch. Các ngoại độc tố do nấm men sát thủ tiết ra có khả năng tiêu diệt các chủng nấm men, nấm hoặc vi sinh vật khác. Ví dụ, vi sinh vật có thể bị kiểm soát bởi nấm men sát thủ bao gồm *Fusarium* và các loại nấm sợi khác. Ví dụ, nấm men sát thủ theo sáng chế là những loại có thể được sử dụng an toàn trong các ngành công nghiệp thực phẩm và lên men, ví dụ, bia, rượu vang, và sản xuất bánh mì; những nấm men sát thủ có thể được sử dụng để kiểm soát các vi sinh vật khác mà có thể làm nhiễm bẩn các quá trình sản xuất; những nấm men sát thủ có thể được sử dụng trong chế phẩm sinh học để bảo quản thực phẩm; hơn nữa chúng có thể được sử dụng để xử lý nhiễm nấm trên cả người và thực vật; và chúng có thể được sử

dụng trong công nghệ ADN tái tổ hợp. Các loại nấm men như vậy có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở *Wickerhamomyces*, *Pichia* (ví dụ, *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia kudrizzevii*) *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, như là *Hanseniaspora uvarum*, *Ustilago maydis*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Torulopsis*, *Ustilago*, *Williopsis*, *Zygosaccharomyces*, như là *Zygosaccharomyces bailii*, và một số nấm men khác.

Trong một phương án, vi sinh vật là nấm bao gồm nhưng không giới hạn ở *Mycorrhiza* (ví dụ, nấm cộng sinh với rễ vesicular-arbuscular mycorrhizae (VAM), arbuscular mycorrhizae (AM)), *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea*, *Thraustochytrium*, *Penicillium*, *Phythium*, *Entomophthora*, *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium venenatum*, *Aspergillus*, *Trichoderma* (ví dụ, *T. reesei*, *T. harzianum*, *T. viride* và *T. hamatum*), *Rhizopus* spp, nấm nội sinh (ví dụ, *Piriformis indica*) và kết hợp của chúng.

Trong một phương án khác, các vi sinh vật là nấm *Mycorrhizal* như *Glomus* spp. và *Acaulporpora* spp. Trong một phương án, vi sinh vật là nấm cộng sinh mycorrhizal (AMF).

Trong các phương án khác, các vi sinh vật để sản xuất SLP có thể là *Candida* sp., *Starmerella* sp., *Cryptococcus* sp., *Cyberlindnera samutprakarnensis* JP52 (T), *Pichia* sp., *Rhodotorula* sp., hoặc *Wickerhamiella* sp.

Trong các phương án khác nữa, các vi sinh vật để sản xuất MEL có thể là *Pseudozyma* sp., *Candida* sp., *Ustilago* sp., *Schizonella* sp., hoặc *Kurtzmanomyces* sp.

Trong phương án ưu tiên, các vi sinh vật là nấm men. Trong các phương án thực hiện, nấm men là *Starmerella*, *Pichia*, và/hoặc *Pseudozyma*. Cụ thể được ví dụ ở đây là, *Starmerella bombicola*, *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*) và *Pseudozyma aphidis*.

Chất hoạt động bề mặt sinh học

Các chất hoạt động bề mặt sinh học tạo thành lớp quan trọng của các chất chuyển hóa thứ cấp xảy ra ở nhiều vi sinh vật. Các chất hoạt động bề mặt sinh học có khả năng phân hủy sinh học và có thể được sản xuất dễ dàng với chi phí rẻ bằng cách sử dụng các sinh vật được chọn trên các cơ chất có thể tái tạo. Hầu hết các sinh vật sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học tạo ra chất hoạt động bề mặt sinh học để đáp ứng với sự hiện diện

nguồn hydrocacbon (ví dụ, dầu, đường, glyxerol, v.v.) trong môi trường nuôi cấy. Các thành phần môi trường khác cũng có thể ảnh hưởng đáng kể đến sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học. Ví dụ, việc sản xuất rhamnolipit của vi sinh vật *Pseudomonas aeruginosa* có thể được tăng lên nếu nitrat được sử dụng làm nguồn nitơ mà không phải amoni. Nồng độ sắt, magie, natri và kali; tỷ lệ cacbon:phospho; và khuấy trộn cũng có thể ảnh hưởng lớn đến sản xuất rhamnolipit.

Chất hoạt động bề mặt sinh học bao gồm glycolipit khối lượng phân tử thấp (GLs), lipopeptit (LPs), flavolipit (FL), phospholipit và các polyme có khối lượng phân tử cao như lipoprotein, phức hợp protein-lipopolysacarit. Nửa ưa chất béo phổ biến của phân tử chất hoạt động bề mặt sinh học là chuỗi hydrocacbon của axit béo, trong khi phần ưa nước được hình thành bởi các nhóm este hoặc rượu của lipit trung tính bởi nhóm cacboxylat của axit béo hoặc axit amin (hoặc peptit), axit hữu cơ trong trường hợp là flavolipit, hoặc trong trường hợp là glycolipit bởi cacbohyđrat.

Theo các phương án của sáng chế, chất hoạt động bề mặt sinh học có thể xâm nhập qua các mô sinh vật gây hại và có hiệu quả với hàm lượng ít hơn mà không cần sử dụng tá dược. Có thể thấy rằng ở nồng độ cao hơn nồng độ vi hạt tới hạn (nồng độ mixen), các chất hoạt động bề mặt sinh học có khả năng xâm nhập hiệu quả hơn vào các đối tượng được xử lý.

Sự phát triển của thuốc trừ sâu sinh học tự nhiên theo sáng chế có thể được sản xuất với số lượng lớn, thể hiện sự tiến bộ đáng kể trong kỹ thuật. Các loài gây hại có thể được kiểm soát bằng cách sử dụng các vi sinh vật sản sinh chất hoạt động bề mặt sinh học như một tác nhân kiểm soát sinh học hoặc bởi chính các chất hoạt động bề mặt sinh học. Ngoài ra, việc kiểm soát sinh vật gây hại có thể đạt được bằng cách sử dụng các cơ chất đặc hiệu để hỗ trợ sự phát triển của các sinh vật sản xuất chất hoạt động bề mặt cũng như sản xuất các chất trừ sâu hoạt động bề mặt. Hơn nữa, các chất hoạt động bề mặt sinh học tự nhiên có thể ức chế sự phát triển của các sinh vật cạnh tranh và tăng cường sự phát triển của các sinh vật sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học cụ thể.

Ngoài ra, các chất hoạt động bề mặt này có thể đóng vai trò quan trọng trong việc xử lý bệnh ở động vật và người. Động vật có thể được xử lý bằng cách, ví dụ, bằng cách nhúng hoặc tắm trong dung dịch chất hoạt động bề mặt sinh học, có hoặc không có khối phân tử vi sinh vật, và/hoặc có sự hiện diện của các hợp chất khác như đồng hoặc kẽm.

Phương pháp nuôi cấy vi sinh vật

Sáng chế đề xuất các phương pháp nuôi cấy vi sinh vật và sản xuất các chất hoạt động bề mặt sinh học và/hoặc các sản phẩm phụ khác sinh trưởng vi khuẩn. Các quy trình nuôi cấy này bao gồm nhưng không giới hạn ở nuôi cấy/lên men chìm, nuôi cấy bề mặt, lên men trạng thái rắn (SSF) và kết hợp của chúng.

Các hệ thống nuôi cấy vi sinh vật thường sử dụng quá trình lên men nuôi cấy chìm; tuy nhiên, nuôi cấy bề mặt và hệ thống kết hợp cũng có thể được sử dụng. Như được sử dụng ở đây “lên men” đề cập đến sự phát triển các tế bào, bào tử, sợi nấm và/hoặc các mầm chồi nhân giống vi sinh vật khác trong các điều kiện được kiểm soát. Nuôi cấy có thể là hiếu khí hoặc kỵ khí.

Bình nuôi cấy vi sinh vật được sử dụng theo sáng chế có thể là bất kỳ bình lên men hoặc thiết bị phản ứng sinh học nuôi cấy sử dụng trong công nghiệp. Quá trình nuôi cấy được thực hiện trong bình có thể là, ví dụ, hình nón hoặc hình ống. Trong một phương án, bình có thể tùy chọn có các điều khiển/cảm biến chức năng hoặc có thể được kết nối với các điều khiển/cảm biến chức năng để đo các yếu tố quan trọng trong quá trình nuôi cấy, như là độ pH, oxy, áp suất, nhiệt độ, công suất trục khuấy, độ ẩm, độ nhớt và/hoặc mật độ vi sinh vật và/hoặc nồng độ chất chuyển hóa.

Trong một phương án khác, bình cũng có thể theo dõi sự phát triển vi sinh vật bên trong bình (ví dụ, đo số lượng tế bào và các pha sinh trưởng). Ngoài ra, mẫu hàng ngày có thể được lấy từ bình và được đếm bằng các kỹ thuật được biết đến trong cùng lĩnh vực, như là kỹ thuật cấy đĩa pha loãng. Cấy pha loãng là kỹ thuật đơn giản được sử dụng để ước tính số lượng vi sinh vật trong mẫu. Kỹ thuật này cũng có thể cung cấp chỉ số theo đó các môi trường hoặc phương pháp xử lý khác nhau có thể được so sánh.

Trong một phương án, phương pháp này bao gồm bổ sung môi trường nuôi cấy bằng nguồn nitơ. Nguồn nitơ có thể là, ví dụ, kali nitrat, amoni nitrat, amoni sunfat, amoni phosphat, amoniac, ure và/hoặc amoni clorua. Những nguồn nitơ này có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp hai hoặc nhiều nguồn.

Phương pháp này có thể cung cấp oxy để phát triển nuôi cấy. Một phương án sử dụng dòng khí di chuyển chậm để loại bỏ không khí có nồng độ oxy thấp và đưa vào không khí bão hòa oxy. Không khí bão hòa oxy có thể là không khí xung quanh được bổ sung hàng ngày thông qua các cơ cấu bao gồm các cánh quạt để khuấy trộn cơ học

cho chất lỏng, và các thiết bị phun khí để cung cấp bọt khí cho chất lỏng để hòa tan oxy vào chất lỏng.

Phương pháp có thể còn bao gồm bổ sung môi trường nuôi cấy với nguồn cacbon. Nguồn cacbon thường là cacbohyđrat, như là glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, trehaloza, mannoza, manitol, và/hoặc mantoza; các axit hữu cơ như là axit axetic, axit fumaric, axit xitric, axit propionic, axit malic, axit malonic và/hoặc axit pyruvic; các rượu như là etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, isobutanol, và/hoặc glyxerol; chất béo và dầu như dầu đậu nành, dầu hạt cải, dầu dừa, dầu cám gạo, dầu ô liu, dầu ngô, dầu mè và/hoặc dầu hạt lanh; v.v.. Những nguồn cacbon này có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp hai hoặc nhiều nguồn.

Trong một phương án, các yếu tố tăng trưởng và chất dinh dưỡng vi lượng cho vi sinh vật có trong môi trường. Điều này đặc biệt được ưu tiên khi phát triển các vi sinh vật không có khả năng sản xuất tất cả các vitamin mà chúng cần. Các chất dinh dưỡng vô cơ bao gồm các nguyên tố vi lượng như sắt, kẽm, đồng, mangan, molybden và/hoặc coban cũng có thể được chứa trong môi trường.

Trong một phương án, muối vô cơ cũng có thể được chứa trong môi trường. Các muối vô cơ có thể sử dụng có thể là kali dihydrogen phosphat, đikali hydrophosphat, đinatri hydro phosphat, magie sunfat, magie clorua, sắt sunfat, sắt clorua, mangan sunfat, mangan clorua, kẽm sunfat, đồng clorua, canxi clorua, canxi cacbonat, và/hoặc natri cacbonat. Các muối vô cơ này có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp hai hoặc nhiều loại.

Trong một số phương án, phương pháp nuôi cấy có thể còn bao gồm bổ sung axit bổ sung và/hoặc chất kháng vi sinh vật trong môi trường lỏng trước và/hoặc trong quá trình nuôi cấy. Các chất kháng vi sinh vật hoặc thuốc kháng sinh được sử dụng để bảo vệ môi trường nuôi cấy khỏi nhiễm bẩn. Ngoài ra, các chất chống tạo bọt cũng có thể được thêm vào để ngăn ngừa sự hình thành và/hoặc tích tụ bọt khí được tạo ra trong quá trình nuôi cấy.

Độ pH của hỗn hợp cần phù hợp với vi sinh vật quan tâm. Hệ đệm và bộ điều chỉnh pH, như là cacbonat và phosphat, có thể được sử dụng để ổn định pH gần giá trị thích hợp. Khi các ion kim loại có mặt ở nồng độ cao, việc sử dụng chất tạo phức trong môi trường lỏng có thể cần thiết.

Phương pháp và thiết bị để nuôi cấy vi sinh vật và sản xuất các sản phẩm phụ phát triển vi khuẩn có thể được thực hiện theo quy trình mẻ, gần liên tục hoặc liên tục.

Các vi sinh vật có thể được phát triển ở dạng sinh vật phù du hoặc dưới dạng màng sinh học. Trong trường hợp màng sinh học, bình có thể có cơ chất mà vi sinh vật có thể được phát triển ở trạng thái màng sinh học. Hệ thống cũng có thể có, ví dụ, khả năng ứng dụng các kích thích (như bỏ qua căng thẳng) được khuyến khích và/hoặc cải thiện các đặc tính tăng trưởng của màng sinh học.

Trong một phương án, phương pháp nuôi cấy vi sinh vật được thực hiện ở khoảng 5°C đến khoảng 100°C, tốt hơn là 15 đến 60°C, tốt nhất là 25 đến 50°C. Trong một phương án khác, việc nuôi cấy có thể được thực hiện liên tục ở nhiệt độ không đổi. Trong một phương án khác nữa, việc nuôi cấy có thể bị tác động bởi thay đổi nhiệt độ.

Trong một phương án, các thiết bị được sử dụng trong phương pháp và quy trình nuôi cấy là vô trùng. Các thiết bị nuôi cấy như thiết bị phản ứng sinh học/bình có thể được tách rời, nhưng được kết nối với bộ phận khử trùng, ví dụ, nồi hấp. Thiết bị nuôi cấy cũng có thể có bộ phận khử trùng để khử trùng tại chỗ trước khi bắt đầu cấy giống. Không khí có thể được khử trùng bằng các phương pháp được biết trong kỹ thuật tương ứng. Ví dụ, không khí xung quanh có thể đi qua ít nhất bộ lọc trước khi được đưa vào bình. Trong các phương án khác, môi trường có thể được tiệt trùng hoặc tùy chọn, không tăng nhiệt độ, trong đó việc sử dụng hoạt độ nước thấp và pH thấp có thể được sử dụng để kiểm soát sự phát triển vi sinh vật.

Hàm lượng sinh khối dịch lên men có thể là, ví dụ từ 5 g/l đến 180 g/l hoặc nhiều hơn. Trong một phương án, hàm lượng chất rắn dịch nuôi cấy là từ 10 g/l đến 150 g/l.

Trong một phương án, phương pháp sản xuất chất chuyển hóa vi sinh vật theo sáng chế bao gồm các bước: 1) trộn các hạt kỵ nước và ưa nước để tạo thành dạng hỗn hợp chất rắn tạo hình matrix; 2) kết nối dạng hỗn hợp chất rắn tạo hình matrix với môi trường được cấy vi sinh vật quan tâm, từ đó tạo ra matrix của các vi sinh phản ứng; và 3) phát triển vi sinh vật nói trên trong các vi sinh phản ứng.

Sản phẩm phụ phát triển vi khuẩn được sản xuất bằng các vi sinh vật quan tâm có thể được giữ lại trong các vi sinh vật hoặc được tiết vào môi trường lỏng. Trong phương án khác, phương pháp sản xuất sản phẩm phụ phát triển vi khuẩn có thể còn bao gồm các bước cô đặc và tinh sạch sản phẩm phụ phát triển vi khuẩn được quan tâm. Trong

phương án khác, môi trường lỏng có thể chứa các hợp chất để ổn định hoạt động của sản phẩm phụ phát triển vi khuẩn.

Trong một phương án, tất cả các thành phần nuôi cấy vi sinh vật được loại bỏ sau khi hoàn thành việc nuôi cấy (ví dụ, khi đạt được mật độ tế bào mong muốn hoặc mật độ của chất chuyển hóa được chỉ định trong dịch nuôi cấy). Trong quy trình nuôi cấy theo mẻ này, mẻ mới hoàn toàn được bắt đầu sau khi thu hoạch mẻ đầu tiên.

Trong phương án khác, chỉ một phần sản phẩm lên men được loại bỏ bất cứ lúc nào. Trong phương án này, sinh khối các tế bào sống vẫn còn trong bình dưới dạng chế phẩm cho mẻ nuôi cấy mới. Thành phần được loại bỏ có thể là dịch nuôi cấy không có tế bào hoặc chứa các tế bào. Theo cách này, hệ thống gần như liên tục được tạo ra.

Trong một phương án, các vi sinh vật được nuôi cấy trong vòng 100, 50, 25, 10, 5, 1 hoặc ít hơn 1 dặm (1.609 m) tại đó sản phẩm gốc vi sinh vật được sử dụng.

Điều chế các sản phẩm gốc vi sinh vật

Một sản phẩm gốc vi sinh vật của sáng chế đơn giản là dịch nuôi cấy lên men có chứa vi sinh vật và/hoặc các chất chuyển hóa của vi sinh vật (như chất hoạt động bề mặt sinh học) được tạo bởi vi sinh vật và/hoặc bất kỳ chất dinh dưỡng còn lại nào. Sản phẩm của quá trình lên men có thể được sử dụng trực tiếp mà không cần chiết xuất, phân lập hoặc tinh sạch. Nếu muốn, chiết xuất, phân lập và/hoặc tinh sạch có thể dễ dàng đạt được bằng các phương pháp hoặc kỹ thuật tiêu chuẩn được mô tả trong tài liệu này.

Các vi sinh vật trong sản phẩm gốc vi sinh vật có thể ở dạng hoạt động hoặc không hoạt động, dạng tế bào, dạng bào tử và/hoặc dạng sợi nấm. Các sản phẩm gốc vi sinh vật có thể được sử dụng mà không cần chất ổn định, bảo quản và lưu trữ. Hơn nữa, việc sử dụng trực tiếp các sản phẩm gốc vi sinh vật này giúp duy trì khả năng sống sót cao các vi sinh vật, giảm khả năng lây nhiễm từ các tác nhân bên ngoài và các vi sinh vật không mong muốn, và duy trì hoạt động các sản phẩm phụ phát triển vi khuẩn.

Các vi khuẩn và/hoặc dịch nuôi cấy (bao gồm các lớp hoặc mảnh rời rạc) do sự phát triển vi sinh vật có thể được loại bỏ khỏi bình tăng trưởng và di chuyển qua, ví dụ, đường ống để sử dụng ngay lập tức.

Trong các phương án khác, thành phần (vi sinh vật, dịch nuôi cấy, hoặc vi sinh vật và dịch nuôi cấy) có thể được đặt trong các thùng chứa có kích thước phù hợp, có tính

đến, ví dụ, mục đích sử dụng, phương pháp ứng dụng được thiết kế, kích thước bể lên men, và bất kỳ phương thức vận chuyển từ cơ sở nuôi cấy vi sinh vật đến địa điểm sử dụng. Do đó, các thùng chứa có thành phần gốc vi sinh vật được đặt có thể có, ví dụ, từ 1 galông (3,785 l) đến 1,000 galông (3.785 l) trở lên. Trong các phương án khác, các thùng chứa là 2 galông (7,571 l), 5 galông (18,927 l), 25 galông (94,635 l) hoặc lớn hơn.

Như được sử dụng ở đây “dịch nuôi cấy” bao gồm toàn bộ dịch nuôi cấy hoặc các mảnh của toàn bộ dịch nuôi cấy.

Khi thu hoạch thành phần gốc vi sinh vật từ các bình nuôi cấy, các thành phần tiếp theo có thể được bổ sung như sản phẩm được thu hoạch được đặt vào thùng chứa và/hoặc đường ống (hoặc được vận chuyển để sử dụng). Các chất phụ gia có thể là, ví dụ, chất đệm, chất mang, các chế phẩm gốc vi sinh vật khác được sản xuất tại cùng cơ sở hoặc các cơ sở khác nhau, chất điều chỉnh độ nhớt, chất bảo quản, chất điều chỉnh độ pH, chất dinh dưỡng cho sự phát triển vi sinh vật, chất dinh dưỡng cho sự phát triển của thực vật, chất theo dõi, thuốc diệt cỏ, thức ăn chăn nuôi, thực phẩm và các thành phần khác dành riêng cho mục đích sử dụng.

Hơn nữa, theo sáng chế, sản phẩm gốc vi sinh vật có thể chứa dịch nuôi cấy trong đó các vi sinh vật được nuôi cấy. Sản phẩm có thể, ví dụ, ít nhất, theo khối lượng, 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% hoặc 100% dịch nuôi cấy. Lượng sinh khối trong sản phẩm, tính theo khối lượng, có thể, ví dụ, bất kỳ từ 0% đến 100% bao gồm tất cả các tỷ lệ phần trăm giữa 0% và 100%.

Tùy chọn, sản phẩm có thể được lưu trữ trước khi sử dụng. Thời gian lưu trữ ngắn là tốt nhất. Do đó, thời gian lưu trữ có thể dưới 60 ngày, 45 ngày, 30 ngày, 20 ngày, 15 ngày, 10 ngày, 7 ngày, 5 ngày, 3 ngày, 2 ngày, 1 ngày hoặc 12 giờ. Trong phương án ưu tiên, nếu các tế bào sống có mặt trong sản phẩm, sản phẩm được bảo quản ở nhiệt độ mát, như dưới 20°C, 15°C, 10°C hoặc 5°C. Mặt khác, chế phẩm chất hoạt động bề mặt sinh học thường có thể được lưu trữ trong thời gian dài hơn và ở nhiệt độ môi trường.

Trong một phương án, các sản phẩm nuôi cấy có thể được điều chế dưới dạng sản phẩm sinh khối khô sấy phun. Sinh khối có thể được phân tách bằng các phương pháp đã biết, chẳng hạn như ly tâm, lọc, tách, khử, kết hợp giữa tách và khử, siêu lọc hoặc vi lọc. Sản phẩm sinh khối có thể được tách ra khỏi môi trường nuôi cấy và sấy phun.

Các sản phẩm gốc vi sinh vật có thể được tạo thành theo nhiều cách khác nhau,

bao gồm các sản phẩm dạng lỏng, rắn, dạng hạt, bụi hoặc giải phóng chậm đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực mang lại hiệu quả cho sáng chế.

Đối với các ứng dụng cho người hoặc động vật, các công thức có thể được điều chế ở dạng lỏng, bột nhão, thuốc mỡ, thuốc đạn, viên nang hoặc viên nén, và được sử dụng tương tự như thuốc được sử dụng trong ngành dược phẩm. Các công thức có thể được đóng gói sử dụng các thành phần đã được biết đến trong ngành dược phẩm. Vỏ bọc bảo vệ các thành phần khỏi các phản ứng không mong muốn và giúp các thành phần chịu được các điều kiện bất lợi trong môi trường hoặc đối tượng được xử lý hoặc cơ thể, ví dụ, dạ dày.

Các công thức rắn của sáng chế có thể có các hình dạng và hình dáng khác nhau như hình trụ, thanh, khối, viên nang, viên nén, thuốc viên, viên đạn, dải, que, v.v.. Các công thức rắn cũng có thể được nghiền, tạo hạt, hoặc nghiền thành bột. Nguyên liệu dạng hạt hoặc dạng bột có thể được ép thành viên hoặc được sử dụng để làm đầy viên nang hoặc vỏ gelatin đã được sản xuất sẵn. Các công thức bán rắn có thể được chuẩn bị trong các chế phẩm ở dạng bột nhão, sáp, gel hoặc kem.

Các chế phẩm rắn hoặc bán rắn của sáng chế có thể được phủ bằng các hợp chất phủ màng được sử dụng trong ngành dược phẩm như polyetylen glycol, gelatin, sorbitol, gôm, đường hoặc rượu polyvinyl. Điều này đặc biệt cần thiết cho viên nén hoặc viên nang được sử dụng trong các công thức thuốc trừ sâu. Lớp phủ màng có thể bảo vệ người xử lý khỏi tiếp xúc trực tiếp với các thành phần hoạt chất trong các công thức. Ngoài ra, chất gây đắng như denatonium benzoat hoặc quassin cũng có thể được kết hợp trong các công thức thuốc trừ sâu, lớp phủ hoặc cả hai.

Các chế phẩm của sáng chế cũng có thể được điều chế trong các công thức dạng bột và cho vào các viên nang gelatin được sản xuất trước.

Nồng độ của các thành phần trong công thức và tỷ lệ ứng dụng của các chế phẩm có thể thay đổi trong phạm vi rộng tùy thuộc vào loại sâu bệnh, cây trồng hoặc khu vực được xử lý hoặc phương pháp ứng dụng.

Trong các phương án ưu tiên, chế phẩm kiểm soát tuyến trùng theo sáng chế bao gồm lượng hiệu quả của chất hoạt động bề mặt sinh học vi sinh vật.

Trong một phương án, chất hoạt động bề mặt sinh học vi sinh vật là glycolipit

chẳng hạn như rhamnolipit, sophorolipit (SLP), trehaloza lipit và/hoặc mannosylerythrithol lipit (MEL).

Trong một phương án, chế phẩm kiểm soát tuyến trùng theo sáng chế bao gồm lượng hiệu quả chất hoạt động bề mặt sinh học vi sinh vật duy nhất và/hoặc vi sinh vật duy nhất sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học. Trong phương án khác, chế phẩm kiểm soát tuyến trùng có thể chứa hỗn hợp các chất hoạt động bề mặt sinh học vi sinh vật và/hoặc hỗn hợp các vi sinh vật sản xuất các chất hoạt động bề mặt sinh học.

Trong một phương án, chế phẩm kiểm soát tuyến trùng bao gồm SLP. SLP có thể ở dạng tinh khiết hoặc trong hỗn hợp các sản phẩm lên men. Tốt nhất là chế phẩm chứa các thành phần hoạt động chẳng hạn như SLP ở nồng độ 0,01 đến 90% khối lượng (wt%), tốt hơn là 0,1 đến 50% khối lượng, và tốt nhất là 0,1 đến 20% khối lượng. Trong phương án khác, SLP tinh khiết có thể được kết hợp với chất mang được chấp nhận, trong đó SLP có thể được có mặt ở nồng độ 0,001 đến 50% (v/v), tốt hơn là 0,01 đến 20% (v/v), tốt nhất là 0,02 đến 5% (v/v).

Trong một phương án khác, chế phẩm kiểm soát tuyến trùng bao gồm MEL. MEL có thể ở dạng tinh khiết hoặc trong hỗn hợp các sản phẩm lên men. Tốt nhất là chế phẩm chứa các thành phần hoạt động chẳng hạn như MEL ở nồng độ 0,01 đến 90% khối lượng (wt%), tốt hơn là 0,1 đến 50% khối lượng và tốt nhất là 0,1 đến 20% khối lượng. Trong một phương án khác MEL tinh khiết có thể được kết hợp với chất mang được chấp nhận, trong đó MEL có thể được có mặt ở nồng độ 0,0001 đến 50% (v/v), tốt hơn là 0,005 đến 20% (v/v), tốt nhất là 0,001 đến 5% (v/v).

Trong một phương án khác, chế phẩm kiểm soát tuyến trùng bao gồm dạng hỗn hợp của SLP và MEL. SLP và MEL có thể được trộn ở bất kỳ tỷ lệ nào miễn là chế phẩm có chứa các thành phần hoạt động, sự kết hợp giữa SLP và MEL ở nồng độ 0,01 đến 90% khối lượng (wt%), tốt hơn là 0,1 đến 50% khối lượng, và tốt nhất là 0,1 đến 20% khối lượng. Trong một phương án khác, SLP và MEL tinh khiết có thể được kết hợp với chất mang được chấp nhận, trong đó SLP có thể được có mặt ở nồng độ 0,0001 đến 50% (v/v), tốt hơn là 0,005 đến 20% (v/v), tốt nhất là 0,001 đến 5% (v/v).

Trong phương án khác nữa, chế phẩm bao gồm SLP và/hoặc MEL kết hợp với chủng vi sinh vật tạo ra SLP và/hoặc MEL, như là, *Starmerella*, *Wickerhamomyces anomalus* hoặc loài *Pseudozyma*.

Các chất hoạt động bề mặt sinh học có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp với các thành phần hoạt động hoặc không hoạt động được chấp nhận khác. Các thành phần này có thể là, ví dụ thành phần dầu như dầu quế, dầu đinh hương, dầu hạt bông, dầu tỏi hoặc dầu hương thảo; chất hoạt động bề mặt tự nhiên khác như Yucca hoặc Quillaja saponin; hoặc thành phần có thể là aldehyt như aldehyt xinamic. Các loại dầu khác có thể được sử dụng làm thành phần thuốc trừ sâu hoặc tá dược bao gồm: dầu hạnh nhân, dầu long não, dầu hạt cải, dầu thầu dầu, dầu tuyết tùng, dầu sả, dầu chanh, dầu dừa, dầu ngô, dầu bạch đàn, dầu cá, dầu cây phong lữ, lexithin, dầu cỏ chanh, dầu hạt lanh, dầu khoáng, dầu bạc hà, dầu ô liu, dầu thông, dầu hạt cải, dầu cây rum, dầu cây xô thơm, dầu hạt mè, dầu cam ngọt, dầu húng tây, dầu thực vật và dầu cây lộc đề.

Các thành phần có thể chấp nhận khác có thể là, ví dụ, các chất thu hút tuyến trùng, chẳng hạn như các chất hòa tan và khí được tạo ra bởi rễ của cây chủ hoặc bởi các vi sinh vật ở rễ. Một ví dụ về chất thu hút tuyến trùng theo sáng chế là rễ cây nữ lang (*Valeriana officianalis*). Cụ thể là, các giải pháp bao gồm chiết xuất rễ cây nữ lang, cũng như bất kỳ hợp chất hoặc sản phẩm phụ nào khác liên quan đến rễ cây nữ lang, có thể được sử dụng như chất thu hút theo các thành phần và phương pháp của sáng chế.

Các chất phụ gia phù hợp khác, có thể có trong các công thức theo sáng chế, bao gồm các cơ chất thường được sử dụng cho các chế phẩm đó. Ví dụ về các chất phụ gia này bao gồm tá dược, chất hoạt động bề mặt, chất nhũ hóa, chất dinh dưỡng thực vật, chất độn, chất làm dẻo, chất bôi trơn, chất nhuộm màu, chất tạo màu, chất đăng, chất đệm, chất kiểm soát độ hòa tan, chất điều chỉnh độ pH, chất bảo quản, chất ổn định và tác nhân chống tia cực tím. Các chất làm đặc hoặc làm cứng cũng có thể được kết hợp để tăng độ cứng của các công thức và làm cho chúng đủ mạnh để chống lại áp lực hoặc lực trong một số ứng dụng như đất, gốc cây hoặc thuốc tiêm cho cây.

Trong một phương án, chế phẩm có thể còn bao gồm các chất đệm bao gồm các axit hữu cơ và axit amin hoặc muối của chúng. Các chất đệm thích hợp bao gồm xitrat, gluconat, tartarat, malat, axetat, lactat, oxalat, aspartat, malonat, glucoheptonat, pyruvat, galactarat, glucarat, tartronat, glutamat, glyxin, lysin, glutamin, methionin, xystein, arginin và hỗn hợp của chúng. Axit phosphor và phospho hoặc muối của chúng cũng có thể được sử dụng. Chất đệm tổng hợp thích hợp được sử dụng nhưng tốt hơn là sử dụng chất đệm tự nhiên như axit hữu cơ và axit amin hoặc muối của chúng được liệt kê ở trên.

Trong phương án khác, các chất điều chỉnh độ pH bao gồm kali hydroxit, amoni hydroxit, kali cacbonat hoặc bicarbonat, axit hydrocloric, axit nitric, axit sulfuric hoặc hỗn hợp.

Trong một phương án, các thành phần bổ sung như natri bicarbonat hoặc cacbonat, natri sulfat, natri phosphat, natri biphosphat, có thể được chứa trong công thức.

Trong một phương án, các chế phẩm có thể bao gồm một hoặc nhiều hợp chất hóa học có hoạt tính diệt khuẩn. Chúng bao gồm các loại thuốc diệt giun tròn kháng sinh như abamectin; các thuốc diệt giun tròn cacbamat như là benomyl, cacbofuran, cacbosulfan, và cleothocard; các thuốc diệt giun tròn oxim cacbamat như là alanycarb, aldycarb, aldoxycarb, oxamyl; các thuốc diệt giun tròn organophosphoro như là điamidafos, fenamiphos, fosthietan, phosphamidon, cadusafos, chlorpyrifos, điclofenthion, dimethoat, ethoprophos, fensulfothion, fosthiaZat, heterophos, isamidofos, isazofos, methomyl, phorat, phosphocarb, terbufos, thiodicarb, thionazin, triazophos, imicyafos, và mecarphon. Các hợp chất khác với hoạt tính của thuốc diệt giun tròn như là axetoprol, benclorbutaz, chloropicrin, dazomet, DB CP, DCIP, 1,2-đicloropropan, 1,3-đicloropropen, furfural, iometan, metam, metyl bromua, metyl isothiocyanat và xilenol.

Trong một phương án, các chế phẩm có thể còn bao gồm lượng thuốc trừ sâu hiệu quả. Các loại thuốc trừ sâu phù hợp bao gồm nhưng không giới hạn ở các loại thuốc trừ sâu không độc hại, neonicotinoid như là 1-(6-chloro-3-pyridylmetyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamin (imidacloprid); 3-(6-chloro-3-pyridylmetyl)-1,3-thiazolidin-2-ylidenecyanamid (thiacloprid); 1-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmetyl)-3-metyl-2-nitroguanidin (Clothianidin); nitenpyr; N¹-[(6-chloro-3-pyridyl) metyl] - N²-cyano-N¹-metylacetamidin (acetamiprid); 3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmetyl)-5-metyl-1,3,5-oxadiazinan-4-yliden (nitro) amin (thiamethoxam); và 1-metyl-2-nitro-3-(tetrahydro-3-furylmetyl) guanidine (dinotefuran).

Ứng dụng các sản phẩm gốc vi sinh vật

Trong khía cạnh khác, sáng chế bao gồm phương pháp, hệ thống và thiết bị để ứng dụng các sản phẩm gốc vi sinh vật.

Trong một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện sức khỏe của cây trồng và/hoặc tăng năng suất cây trồng bằng cách ứng dụng chế phẩm được nêu trong

sáng chế này vào đất, hạt giống hoặc các bộ phận của cây. Trong phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tăng năng suất mùa vụ hoặc cây trồng bao gồm nhiều ứng dụng của chế phẩm được mô tả bên trên.

Hơn nữa, phương pháp này có thể kiểm soát tuyến trùng một cách hiệu quả và các bệnh tương ứng do sâu bệnh gây ra trong khi tăng năng suất đạt được và tránh các tác dụng phụ và chi phí bổ sung.

Trong một phương án, chế phẩm có thể được áp dụng cho cây đã nảy mầm và/hoặc đang phát triển bao gồm cả rễ, thân và lá. Chế phẩm cũng có thể được ứng dụng như là xử lý hạt giống. Việc sử dụng như phương pháp xử lý hạt giống có ích vì ứng dụng có thể đạt được một cách dễ dàng, và lượng sử dụng để xử lý có thể giảm đi, làm giảm thêm độc tính tiềm tàng, nếu có.

Trong một phương án, các vi sinh vật sản sinh chất hoạt động bề mặt sinh học và/hoặc chất hoạt động bề mặt sinh học có thể được bổ sung vào đất, môi trường trồng trọt, thực vật, môi trường nước hoặc bất kỳ khu vực nào được xử lý để ngăn ngừa thiệt hại do sâu bệnh. Các vi sinh vật có thể phát triển tại chỗ và sản xuất các chất hoạt động bề mặt tại chỗ để kiểm soát tuyến trùng. Ngoài ra, các sinh vật sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học tự nhiên được ứng dụng tại khu vực ứng dụng sẽ có thể phát triển và sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học. Do đó, nồng độ cao của chất hoạt động bề mặt và vi sinh vật sản sinh chất hoạt động bề mặt sinh học tại nơi xử lý (ví dụ, đất) có thể đạt được một cách dễ dàng và liên tục.

Các chất giúp tăng cường sự phát triển vi sinh vật và sản xuất các chất hoạt động bề mặt sinh học cũng có thể được bổ sung vào thành phần và/hoặc nơi xử lý để hỗ trợ sự phát triển của các sinh vật sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học cũng như sản xuất các chất hoạt động bề mặt sinh học mong muốn tại chỗ để đạt được mục đích của sáng chế. Những chất này bao gồm nhưng không giới hạn ở cacbon, hoặc các chất hữu cơ như dầu, glyxerol, đường hoặc các chất dinh dưỡng khác. Ví dụ, các vi sinh vật sản sinh chất hoạt động bề mặt sinh học có thể phát triển trên cơ chất để tạo ra chất hoạt động bề mặt sinh học tại chỗ và kiểm soát tuyến trùng. Các vi sinh vật sản sinh chất hoạt động bề mặt sinh học tự nhiên tại vị trí ứng dụng (đất, hệ thủy sinh, bộ phận thực vật, v.v.) sẽ tạo ra chất hoạt động bề mặt sinh học trong khi sử dụng cơ chất cacbon. Trong quá trình này, chất hoạt động bề mặt sinh học sẽ tiêu diệt hoặc làm tê liệt các loài gây hại trong

khu vực đích. Theo sáng chế, không cần thiết phải cấy truyền trước vào vị trí đích hoặc hỗn hợp cơ chất cacbon với các vi sinh vật sản sinh chất hoạt động bề mặt sinh học.

Cơ chất cacbon có thể bao gồm nhưng không giới hạn ở các nguồn cacbon hữu cơ như dầu tự nhiên hoặc tổng hợp bao gồm cả dầu chiên đã qua sử dụng; dầu béo; lipid; sáp (tự nhiên hoặc parafin); các axit béo như lauric; myristic, v.v.; axit alcohol béo như rượu lauryl; este lưỡng tính của axit béo với glyxerol như glyxeryl monolaurat; este glycol của axit béo như polyetylen monostearat; các amin axit béo như lauryl amin; axit amit béo; hexan; glyxerol; glucoza; v.v.. Tốt nhất là sử dụng cơ chất cacbon không hòa tan trong nước để khuyến khích sản xuất các chất hoạt động bề mặt sinh học.

Một phương án liên quan đến cố định hoặc thay đổi cơ chất cacbon với lượng thích hợp chất hoạt động bề mặt sinh học đặc hiệu để bắt đầu quá trình nhũ hóa và ức chế hoặc làm giảm sự phát triển các sinh vật cạnh tranh khác đối với sinh vật sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học và kiểm soát tuyến trùng. *Pseudomonas syringae* và *Bacillus subtilis*, ví dụ, sản xuất một loạt các chất hoạt động bề mặt lipopeptit được gọi là poren. Những poren lipopeptit này bao gồm pseudomyxin, syringomyxin, tabtoxin, phaseolotoxin và surfactin. Một số lipopeptit có khả năng tạo lỗ trên màng tế bào, tế bào và mô.

Pseudomyxin có thể được ứng dụng như là xử lý trước khi trồng để kiểm soát tuyến trùng trong sản xuất cây trồng. Nếu muốn khuyến khích sự phát triển của *Bacillus subtilis*, một lượng nhỏ chất hoạt động bề mặt sinh học surfactin được bổ sung vào môi trường cơ chất cacbon để hỗ trợ thiết lập quần thể *B. subtilis* và sản xuất surfactin tại chỗ nhiều hơn.

Trong một phương án, chế phẩm có thể được áp dụng bằng cách phun, đổ, nhúng, dưới dạng chất lỏng cô đặc hoặc pha loãng, dung dịch, huyền phù, bột và tương tự, có chứa nồng độ chất hoạt động phù hợp nhất cho mục đích cụ thể. Chúng có thể được ứng dụng như trên hoặc hoàn nguyên trước khi sử dụng. Ví dụ, chúng có thể được ứng dụng bằng cách tiêm trực tiếp vào cây hoặc đổ vào rễ.

Trong một phương án, chế phẩm theo sáng chế có thể được ứng dụng nồng độ khoảng 0,0001 pao/mẫu Anh (0,0453 g/4.046,85 m²) đến khoảng 10 pao/mẫu Anh, khoảng 0,001 pao/mẫu Anh đến khoảng 5 pao/mẫu Anh, khoảng 0,01 pao/mẫu Anh đến khoảng 1 pao/mẫu Anh, khoảng 0,01 pao/mẫu Anh đến khoảng 0,1 pao/mẫu Anh, hoặc

khoảng 0,01 pao/mẫu Anh đến khoảng 0,05 pao/mẫu Anh.

Trong một phương án, chế phẩm theo sáng chế được ứng dụng cho cây trồng hoặc mùa vụ từ khoảng 1 đến khoảng 100 ngày, khoảng 2 đến khoảng 50 ngày, khoảng 10 đến khoảng 40 ngày, khoảng 20 đến khoảng 30 ngày sau khi áp dụng ban đầu vào đất hoặc hạt giống.

Trong các phương án cụ thể, các chế phẩm có thể, ví dụ, được đưa vào hệ thống tưới, được phun từ bình đeo hoặc các thiết bị tương tự, được ứng dụng bởi thiết bị robot trên mặt đất hoặc trên không như máy bay không người lái và/hoặc được ứng dụng vào hạt giống.

Ứng dụng vào hạt giống có thể bằng, ví dụ, lớp phủ hạt giống hoặc bằng cách ứng dụng các thành phần vào đất cùng lúc với việc gieo hạt giống. Điều này có thể được tự động hóa, ví dụ, cung cấp thiết bị hoặc hệ thống tưới ứng dụng chế phẩm gốc vi sinh vật cùng với, và/hoặc liền kề, hạt giống tại hoặc gần thời điểm gieo hạt. Do đó, chế phẩm gốc vi sinh vật có thể được ứng dụng trong, ví dụ, 5, 4, 3, 2 hoặc 1 ngày trước hoặc sau thời gian trồng hoặc đồng thời với việc gieo hạt.

Trong một số phương án nhất định, các chế phẩm được sản xuất ở đây được ứng dụng cho bề mặt đất mà không cần kết hợp cơ học. Hiệu quả của việc sử dụng đất có thể được hoạt hóa bằng nước mưa, phun nước, ngập nước hoặc tưới nhỏ giọt, và sau đó được truyền cho, ví dụ, các sâu bệnh đích để giảm số lượng xuống ngưỡng chấp nhận được hoặc tới rễ cây trồng tác động bởi hệ vi sinh vật ở rễ hoặc tạo điều kiện cho sự hấp thu của sản phẩm vi sinh vào hệ thống mạch của cây trồng hoặc thực vật mà sản phẩm vi sinh được ứng dụng. Trong phương án ví dụ, các chế phẩm được cung cấp ở đây có thể được ứng dụng một cách hiệu quả thông qua hệ thống tưới theo trục trung tâm hoặc bằng cách phun trên rãnh hạt giống.

Tham chiếu ở đây sử dụng thành phần “trên hoặc gần” sâu bệnh hoặc thực vật, hoặc đến “môi trường” của sâu bệnh hoặc thực vật, có nghĩa là sử dụng sao cho thành phần đủ tiếp xúc với sâu bệnh hoặc thực vật để đạt được kết quả mong muốn (ví dụ, tiêu diệt sâu bệnh, tăng năng suất, ngăn ngừa thiệt hại cây, điều hòa gen và/hoặc hormon, v.v.). Khoảng cách thường có thể nằm trong, ví dụ, 10, 5, 3, 2 hoặc 1 ft (30,48 cm) hoặc nhỏ hơn đối với sâu bệnh, cây trồng, cỏ dại hoặc mục tiêu mong muốn khác.

Sản phẩm gốc vi sinh vật cũng có thể được ứng dụng để thúc đẩy sự xâm lấn của

rễ và/hoặc bầu rễ cũng như hệ thống mạch cây nhằm tăng cường sức khỏe và sức sống của thực vật. Do đó, các vi khuẩn cố định chất dinh dưỡng như rhizohium và/hoặc mycorrhizae có thể biết đến như các nội sinh khác (đã có trong đất), cũng như ngoại sinh, vi sinh vật hoặc sản phẩm phụ của chúng, chống lại sâu bệnh, bệnh, hoặc mất khác thúc đẩy tăng trưởng cây trồng, sức khỏe và/hoặc năng suất. Sản phẩm gốc vi sinh vật cũng có thể hỗ trợ hệ thống mạch thực vật, ví dụ, xâm nhập và xâm chiếm hệ thống mạch và đóng góp các chất chuyển hóa, và các chất dinh dưỡng quan trọng đối với sức khỏe và năng suất của thực vật hoặc các chất chuyển hóa có đặc tính chống sâu bệnh.

Ngoài ra, phương pháp không đòi hỏi thiết bị phức tạp hoặc tiêu thụ năng lượng cao. Các vi sinh vật quan tâm có thể được nuôi cấy tại chỗ ở quy mô nhỏ hoặc lớn và được sử dụng, thậm chí còn được trộn lẫn với môi trường của chúng. Tương tự, các chất chuyển hóa vi sinh vật cũng có thể được sản xuất với số lượng lớn tại nơi cần thiết.

Hơn nữa, các sản phẩm gốc vi sinh vật có thể được sản xuất ở các địa điểm ở xa. Trong một phương án, các sản phẩm gốc vi sinh vật có thể được sử dụng làm nguồn dinh dưỡng cho con người và/hoặc phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh.

Sâu bệnh mục tiêu

Trong các phương án ưu tiên của sáng chế, nhưng không giới hạn ở tuyến trùng được kiểm soát được chọn từ:

(1) tuyến trùng là tuyến trùng gây bệnh thực vật, nhưng không giới hạn ở tuyến trùng rễ (*Meloidogyne* spp.) ở lúa (ví dụ, *M. incognita*, *M. javanica* hoặc *M. graminicola*), ở đậu tương (ví dụ, *M. incognita* hoặc *M. arenaria*), ở cây bông (ví dụ, *M. incognita*), ở khoai tây (ví dụ, *M. chitwoodi* hoặc *M. hapla*), ở cà chua (ví dụ, *M. chitwoodi*), ở thuốc lá (ví dụ, *M. incognita*, *M. javanica* hoặc *M. arenaria*) và ở ngô (ví dụ, *M. incognita*); tuyến trùng nang (*Heterodera* spp.), ở lúa (ví dụ, *H. oryzae*), ở đậu tương (ví dụ, *H. glycines*), và ở ngô (ví dụ, *H. zae*); tuyến trùng nang (*Globodera* spp.) ở khoai tây (ví dụ, *G. pallida* hoặc *G. rostochiensis*); tuyến trùng Reniform (*Rotylenchulus* spp.) ở cây bông (ví dụ, *R. reniformis*); tuyến trùng tổn thương rễ (*Pratylenchus* spp.) ở chuối (ví dụ, *P. coffeae* hoặc *P. goodeyi*); tuyến trùng Burrowing (*Radopholus* spp.) ở chuối (ví dụ, *R. similis*); và các tuyến trùng gây hại lúa khác như tuyến trùng rễ lúa (*Hirschmaniella* spp., ví dụ, *H. oryzae*);

(2) tuyến trùng có khả năng gây bệnh cho người như, nhưng không giới hạn ở

Enterobius vermicularis, giun kim gây bệnh đường ruột; giun đũa *lumbricoides*, giun tròn ruột lớn gây ra bệnh giun đũa; *Necator* và *Ancylostoma*, hai loại giun móc gây bệnh giun đũa; *Trichuris trichiura*, giun đũa gây bệnh giun tóc; *Strongyloides stercoralis* gây ra bệnh giun lươn; và *Trichonella spirae* gây ra bệnh giun xoắn; *Brugia Malayi* và *Wuchereria bancrofti* gây bệnh liên quan đến nhiễm giun được gọi là bệnh giun chỉ bạch huyết và biểu hiện chung là bệnh chân voi và *Onchocerca volvulus* gây bệnh mù lòa đường sông;

(3) tuyến trùng có khả năng gây bệnh cho động vật như nhưng không giới hạn ở chó (giun móc, ví dụ như *Ancylostoma caninum* hoặc *Uncinaria stenocephala*, *Ascarids*, ví dụ, *Toxocara canis* hoặc *Toxascaris leonina*, hoặc Whipworms, ví dụ, *Trichuris vulpis*), ở mèo (giun móc, ví dụ, *Ancylostoma tubaeforme*, *Ascarids*, ví dụ, *Toxocara cati*), cá (giun cá trích hoặc giun cá tuyết, ví dụ, *Anisakid*, hoặc sán dây, ví dụ, *Diphyllobothrium*), cừu (giun kim, ví dụ, *Haemonchus contortus*) và gia súc (giun đường ruột, ví dụ, *Ostertagia ostertagi*, *Cooperia oncophora*).

(4) tuyến trùng gây hại không mong muốn đối với cơ chất hoặc nguyên liệu, như là tuyến trùng tấn công thực phẩm, hạt giống, gỗ, sơn, nhựa, quần áo, v.v.. Ví dụ về tuyến trùng này bao gồm nhưng không giới hạn ở *Meloidogyne* spp. (ví dụ, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. graminicola*, *M. chitwoodi* hoặc *M. hapla*); *Heterodera* spp. (ví dụ, *H. oryzae*, *H. glycines*, *H. zae* hoặc *H. schachtii*); *Globodera* spp. (ví dụ, *G. pallida* hoặc *G. rostochiensis*); *Ditylenchus* spp. (ví dụ, *D. dipsaci*, *D. destructor* hoặc *D. angustus*); *Belonolaimus* spp.; *Rotylenchulus* spp. (ví dụ, *R. reniformis*); *Pratylenchus* spp. (ví dụ, *P. coffeae*, *P. goodeyi* hoặc *P. zae*); *Radopholus* spp. (ví dụ, *R. similis*); *Hirschmaniella* spp. (ví dụ, *H. oryzae*); *Aphelenchoides* spp. (ví dụ, *A. besseyi*); *Criconemoides* spp.; *Longidorus* spp.; *Helicotylenchus* spp.; *Hoplolaimus* spp.; *Xiphinema* spp.; *Paratrichodorus* spp. (ví dụ, *P. nhỏ*); *Tylenchorhynchus* spp;

(5) tuyến trùng truyền virus (ví dụ, *Longidorus macrosoma*: truyền virus đốm vòng nâu hoại tử, *Xiphinema americanum*: truyền virus đốm vòng thuốc lá, *Paratrichodorus teres*: truyền virus đậu nâu đầu mùa, hoặc *Trichodorus similis*: truyền virus gây bệnh trên cây thuốc lá).

Các loài tuyến trùng gây hại cụ thể bao gồm:

Dracunculus medinensis, giun tròn gây bệnh *Dracunculzheim* (bệnh giun Guinea);

tuyến trùng *Loa loa* (giun mắt châu Phi), *Mansonella streptocerca* và *Onchocerca volvulus* gây ra bệnh giun chỉ da; *Mansonella perstans* và *Mansonella ozzardi* gây ra bệnh viêm da cơ thể; *Trichinella* bao gồm *T. pseudospirurus* (lây nhiễm cho động vật có vú và chim trên toàn thế giới), *T. nativa* (lây nhiễm gấu Bắc Cực), *T. nelsoni* (lây nhiễm động vật ăn thịt và xác thối châu Phi), và *T. britovi* (lây nhiễm cho động vật ăn thịt ở châu Âu và Tây Á) *Trichinellosis*; *Angiostrongylus cantonensis* (giun phổi chuột) là nguyên nhân phổ biến nhất của viêm màng não bạch cầu ở người; *Angiostrongylus costaricensis* gây ra bệnh đau thắt ngực (hoặc ruột); *Toxocara* gây bệnh giun đũa chó ở người; *Gnathostoma spinigerum* và hiếm khi *G. herpidum* gây ra bệnh *Gnathostomiasis*; và *Anisakis simplex*, hoặc *Pseudoterranova decipiens* gây ra Anisakiasis.

Trong các phương án cụ thể, các phương pháp và các chế phẩm của sáng chế được sử dụng để kiểm soát tuyến trùng gây bọ rầy (Meloidogyne incognita), tuyến trùng chích (Belonolaimus longicaudatus), tuyến trùng nang đậu tương (Heterodera glycines), tuyến trùng gây tổn thương (Pratylenchus sp.), tuyến trùng gây thối rễ (Xiphinema sp.) và/hoặc tuyến trùng gây bệnh trên cam quýt (Tylenchulus semipenetrans).

Cây trồng mục tiêu

Cây trồng có thể hưởng lợi từ việc ứng dụng các sản phẩm và phương pháp của sáng chế bao gồm: cây trồng theo hàng (ví dụ, ngô, đậu nành, cao lương, đậu phộng, khoai tây, v.v.), cây trồng trên ruộng (ví dụ, cỏ linh lăng, lúa mì, ngũ cốc, v.v.), cây thân gỗ (ví dụ, quả óc chó, hạnh nhân, quả hồ đào, cây phỉ, quả hồ trăn, v.v.), cây có múi (ví dụ, cam, chanh, bưởi, v.v.), cây lấy quả (ví dụ, táo, lê, v.v.), cây thân cỏ, cây cảnh trang trí (ví dụ, hoa, dây leo, v.v.), rau (ví dụ, cà chua, cà rốt, v.v.), cây thân leo (ví dụ, nho, dâu tây, quả việt quất, dâu đen, v.v.), cây lâm nghiệp (ví dụ, thông, vân sam, bạch đàn, cây dương, v.v.), đồng cỏ (bất kỳ hỗn hợp cây trồng nào được sử dụng để hỗ trợ chăn thả gia súc).

Lợi ích có thể dưới dạng, ví dụ, tăng năng suất, chất lượng, khả năng kháng sâu bệnh và bệnh dịch, giảm căng thẳng (ví dụ, từ mặn, hạn hán, nhiệt, v.v.) và cải thiện việc sử dụng nước.

Các cây trồng khác có thể hưởng lợi từ các sản phẩm và phương pháp của sáng chế bao gồm tất cả các cây trồng thuộc liên họ Viridiplantae, đặc biệt là các cây một lá

mầm và cây hai lá mầm bao gồm cây cỏ hoặc cây họ đậu, cây cảnh, cây lương thực, cây thân gỗ hoặc cây bụi được chọn từ cây họ đậu *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Abelmoschus* spp., *Agave silalana*, *Agropyron* spp., *Agrostis stolonifera*, *Allium* spp., *Amrosthus* spp., *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, *Annona* spp., *Apium graveolens*, *Arachis* spp., *Artocarpus* spp., *Asparagus officinalis*, *Avena* spp. (ví dụ, *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida*), *Averrhoa carambola*, *Bambusa* sp., *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsea*, *Beta vulgaris*, *Brassica* spp. (ví dụ, *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [họ cây cải dầu, cây cải dầu và củ cải]), *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis sativa*, *Capsicum* spp., *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, *Carya* spp., *Carthamus tinctorius*, *Castanea* spp., *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*, *Cinnamomum* spp., *Citrullus lanatus*, *Citrus* spp., *Cocos* spp., *Coffea* spp., *Colocasia esculenta*, *Cola* spp., *Corchorus* sp., *Coriandrum sativum*, *Corylus* spp., *Crataegus* spp., *Crocus sativus*, *Cucurbita* spp., *Cucumis* spp., *Cynara* spp., *Daucus carota*, *Desmodium* spp., *Dimocarpus longan*, *Dioscorea* spp., *Diospyros* spp., *Echinochloa* spp., *Elaeis* (ví dụ, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*), *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Erianthus* sp., *Eriobotrya japonica*, *Eucalyptus* sp., *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum* spp., *Fagus* spp., *Festuca arundinacea*, *Ficus carica*, *Fortunella* spp., *Fragaria* spp., *Ginkgo biloba*, *Glycine* spp. (ví dụ, *Glycine max*, *Soja hispida* hoặc *Soja max*), *Gossypium hirsutum*, *Helianthus* spp. (ví dụ, *Helianthus annuus*), *Hemerocallis Fulva*, *Hibiscus* spp., *Hordeum* spp. (ví dụ, *Hordeum Vulgare*), *Ipomoea batatas*, *Juglans* spp., *Lactuca sativa*, *Lathyrus* spp., *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, *Lotus* spp., *Luffa acutangular*, *Lupinus* spp., *Luzula sylvatica*, *Lycopersicon* spp. (ví dụ, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme*), *Macrotyloma* spp., *Malus* spp., *Malpighia emarginata*, *Mammea americana*, *Mangifera indica*, *Manihot* spp., *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, *Melilotus* spp., *Mentha* spp., *Miscanthus sinensis*, *Momordica* spp., *Morus nigra*, *Musa* spp., *Nicotiana* spp., *Olea* spp., *Opuntia* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp. (ví dụ, *Oryza sativa*, *Oryza latifolia*), *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca sativa*, *Pennisetum* sp., *Persea* spp., *Petroselinum crispum*, *Phalaris arundinacea*, *Phaseolus* spp., *Phleum pratense*, *Phoenix* spp., *Phragmites australi*, *Physalis* spp., *Pinus* spp., *Pistacia vera*, *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus* spp., *Prosopis* spp., *Prunus* spp., *Psidium* spp., *Punica granatum*, *Pyrus Communis*, *Quercus*

spp., *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes* spp., *Ricinus Communis*, *Rubus* spp., *Saccharum* spp., *Salix* sp., *Sambucus* spp., *Secale cereale*, *Sesamum* spp., *Sinapis* sp., *Solanum* spp. (ví dụ, *Solanum tuberosum*, *Solanum integrifolium* hoặc *Solanum lycopersicum*), *Sorghum bicolor*, *Spinacia* spp., *Syzygium* spp., *Tagetes* spp., *Tamarindus indica*, *Theobroma cacao*, *Trifolium* spp., *Tripsacum dactyloides*, *Triticosecale rimpai*, *Triticum* spp. (ví dụ, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum*, *Triticum monococcum* hoặc *Triticum Vulgare*), *Tropaeolum minus*, *Tropaeolum majus*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vigna* spp., *Viola odorata*, *Vitis* spp., *Zea mays*, *Zizania palustris*, *Ziziphus* spp., trong số những cây trồng khác.

Các ví dụ khác nữa về các loại cây trồng được quan tâm bao gồm nhưng không giới hạn ở ngô (*Zea mays*), *Brassica* sp. (ví dụ, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), đặc biệt là những loài *Brassica* sử dụng như nguồn dầu hạt, cỏ linh lăng (*Medicago sativa*), lúa (*Oryza sativa*), lúa mạch đen (*Secale cereale*), cây cao lương (*Sorghum bicolor*, *Sorghum Vulgare*), kê (ví dụ, kê ngọc trai (*Pennisetum glaucum*), kê proso (*Panicum miliaceum*), kê đuôi cáo (*Setaria italica*), kê ngón tay (*Eleusine coracana*)), hướng dương (*Helianthus* spp.), cây rum (*Carthamus tinctorius*), lúa mì (*Triticum aestivum*), đậu tương (*Glycine max*), thuốc lá (*Nicotiana tabacum*), khoai tây (*Solanum tuberosum*), đậu phộng (*Arachis hypogaea*), cây bông (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), khoai lang (*Ipomoea batatas*), sắn (*Manihot esculenta*), cà phê (*Coffea* spp.), dừa (*Cocos nucifera*), dứa (*Ananas comosus*), cây có múi (*Citrus* spp.), ca cao (*Theobroma cacao*), trà (*Camellia sinensis*), chuối (*Musa* spp.), bơ (*Persea americana*), cây sung (*Ficus casica*), ổi (*Psidium guajava*), xoài (*Mangifera indica*), ô liu (*Olea europaea*), đu đủ (*Carica papaya*), hạt điều (*Anacardium occidentale*), mắc ca (*Macadamia integrifolia*), hạnh nhân (*Prunus amygdalus*), củ cải đường (*Beta vulgaris*), mía (*Saccharum* spp.), yến mạch, lúa mạch, rau xanh, cây trang trí và cây lá kim.

Các loại rau bao gồm cà chua (*Lycopersicon esculentum*), rau diếp (ví dụ, *Lactuca sativa*), đậu xanh (*Phaseolus Vulgaris*), đậu lima (*Phaseolus limensis*), đậu Hà Lan (*Lathyrus* spp.), và các giống cây thuộc chi *Cucumis* như dưa chuột (*C. sativus*), dưa đỏ (*C. cantalupensis*) và dưa xạ hương (*C. melo*). Cây trang trí bao gồm hoa đỗ quyên (*Rhododendron* spp.), hoa cẩm tú cầu (*Macrophylla hydrangea*), hoa dâm bụt (*Hibiscus rosasanensis*), hoa hồng (*Rosa* spp.), hoa tulip (*Tulipa* spp.), hoa thủy tiên (*Narcissus*

spp.), dạ yến thảo (*Petunia hybrida*), cẩm chướng (*Dianthus caryophyllus*), trạng nguyên (*Euphorbia pulcherrima*) và hoa cúc. Các loài cây lá kim có thể được sử dụng trong các phương án bao gồm, ví dụ, các loại thông như cây thông quế (*Pinus taeda*), thông nhím (*Pinus elliotii*), thông ponderosa (*Pinus ponderosa*), thông lodgepole (*Pinus contorta*), thông Monterey (*Pinus radiata*); linh sam Douglas (*Pseudotsuga menziesii*); cây độc cần bờ Tây (*Tsuga canadensis*); vân sam Sitka (*Picea glauca*); gỗ đỏ (*Sequoia sempervirens*); cây tùng như tùng trắng (*Abies amabilis*) và tùng balsam (*Abies balsamea*); và các loại tuyết tùng như tuyết tùng đỏ phương Tây (*Thuja plicata*) và tuyết tùng vàng Alaska (*Chamaedaphne nootkatensis*). Cây trồng của các phương án bao gồm cây trồng theo vụ (ví dụ, ngô, cỏ linh lăng, hướng dương, cây họ cải bắp, đậu tương, bông, nghệ tây, đậu phộng, cao lương, lúa mì, kê, thuốc lá, v.v.), chẳng hạn như ngô và cây đậu tương.

Cây cỏ bao gồm nhưng không giới hạn ở cỏ xanh một năm (*Poa annua*); cỏ đại một năm (*Lolium multiflorum*); cỏ xanh Canada (*Poa néna*); cây cỏ roi nhỏ (*Festuca rubra*); cỏ uốn cong (*Agrostis tenuis*); cỏ leo uốn cong (*Agrostis palustris*); cỏ lúa mì mào (*Agropyron Sahorum*); cỏ lúa mì luồng (*Agropyron cristatum*); cây roi nhỏ cứng (*Festuca longifolia*); cỏ xanh Kentucky (*Poa pratensis*); cỏ vườn cây ăn quả (*Dactylis glomates*); cỏ đại lâu năm (*Lolium perenne*); cây roi nhỏ màu đỏ (*Festuca rubra*); cỏ ngọn đỏ (*Agrostis alba*); cỏ xanh cứng (*Poa trivialis*); cừu roi nhỏ (*Festuca ovine*); cỏ dứa mịn (*Bromus inermis*); cây roi nhỏ cao (*Festuca arundinacea*); cỏ đuôi mèo (*Phleum pretense*); cỏ nhung uốn cong (*Agrostis canine*); cây cỏ rủ weeping alkaligrass (*Puccinellia distans*); cỏ lúa mì phương Tây (*Agropyron smithii*); cỏ Bermuda (*Cynodon spp.*); cỏ St. Augustine (*Stenotaphrum secundatum*); cỏ zoysia (*Zoysia spp.*); cỏ Bahia (*Paspalum notatum*); cỏ thảm (*Axonopus affinis*); cỏ rết (*Eremochloa ophiuroides*); cỏ kikuyu (*Pennisetum clandestinum*); cỏ bờ biển paspalum (*Paspalum vaginatum*); cỏ gramma màu xanh (*Bouteloua gracilis*); cỏ trâu (*Buchloe dactyloids*); cỏ sideoats gramma (*Bouteloua curtipendula*).

Các cây trồng khác bao gồm cần sa (ví dụ, *sativa*, *indica* và *ruderalis*) và cây gai dầu công nghiệp.

Cây trồng quan tâm bao gồm các cây trồng cung cấp hạt được quan tâm, cây hạt dầu và cây họ đậu. Hạt quan tâm bao gồm hạt ngũ cốc, chẳng hạn như ngô, lúa mì, lúa mạch, lúa, cao lương, lúa mạch đen, kê, v.v.. Cây hạt dầu bao gồm bông, đậu tương, nghệ tây, hướng dương, cây họ bắp cải, ngô, cỏ linh lăng, cỏ, dừa, hạt lanh, thầu dầu, ô

liu v.v.. Cây họ đậu bao gồm đậu và đậu Hà Lan. Đậu bao gồm đậu guar, đậu châu châu, đậu nành, đậu tương, đậu vừng, đậu đũa, đậu xanh, đậu lima, đậu tằm, đậu lăng, đậu xanh, v.v..

Tất cả các cây và bộ phận cây có thể được xử lý theo sáng chế. Trong trường hợp này, cây trồng được hiểu là có nghĩa là tất cả các loài thực vật và quần thể thực vật, chẳng hạn như thực vật hoang dã mong muốn và không mong muốn (bao gồm cả cây trồng tự nhiên). Cây trồng có thể là cây có thể thu được bằng phương pháp nhân giống và tối ưu hóa phương pháp truyền thống hoặc bằng phương pháp công nghệ sinh học và tái tổ hợp, hoặc kết hợp các phương pháp này, bao gồm cả cây chuyển gen và giống cây trồng.

Các bộ phận của cây được hiểu là tất cả các bộ phận trên và dưới mặt đất và các cơ quan của cây như chồi, lá, hoa và rễ, ví dụ có thể được đề cập là lá, gai, cuống, thân, hoa, thân quả, quả và hạt, cũng như rễ, củ và thân rễ. Các bộ phận của cây cũng bao gồm nguyên liệu cây trồng và nguyên liệu nhân giống sinh dưỡng và sinh sản, ví dụ giâm cành, củ, thân rễ, cành và hạt.

Ví dụ thực hiện của sáng chế

Cần hiểu rằng các ví dụ và phương án được mô tả trong tài liệu này chỉ nhằm mục đích minh họa và các sửa đổi hoặc thay đổi nhỏ của chúng sẽ được đề xuất bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực và được đưa vào nguyên lý và nội dung của sáng chế này.

Ví dụ 1: Lên men *S.bombicola* để sản xuất sophorolipit (SLP) trong thiết bị phản ứng sinh học phân phối 110 lít (L).

Thiết bị phản ứng sinh học di động, kiểu lực đẩy không khí, đóng kín hoàn toàn được vận hành bởi thiết bị điều khiển lập trình (PLC) với bộ lọc nước, bộ điều khiển nhiệt độ và máy thổi khí trên bình được sử dụng. Thiết bị phản ứng sinh học có thể tích hoạt động 90 L khi nuôi cấy *Starmerella bombicola* để sản xuất SLP.

Trong các phương án ưu tiên, các chất dinh dưỡng để sản xuất SLP là glucoza, ure, chiết xuất nấm men, dầu củ cải, magie sunfat và kali phosphat.

Thiết bị phản ứng sinh học được cấy truyền 8 L chất lỏng nuôi cấy trong bình. Thời gian của chu trình nuôi cấy để sản xuất SLP là 7-8 ngày, ở nhiệt độ 25°C và pH

3,5, với việc lấy mẫu được thực hiện hai lần một ngày.

Nồng độ cuối cùng của SLP là khoảng 10% thể tích nuôi cấy, trong trường hợp này là khoảng 9 L sản phẩm, chứa 300 - 400 g SLP trên mỗi lít.

Ví dụ 2: Lên men *S.bombicola* để sản xuất SLP trong thiết bị phản ứng sinh học di động 14 L

Thiết bị phản ứng sinh học này là bình thủy tinh có vỏ bọc có thể hấp được với ống dẫn khí và cánh khuấy. Thiết bị được trang bị đầu dò oxy hòa tan (dissolved oxygen: DO), pH, nhiệt độ, và đầu thăm dò bọt; và có trạm điều khiển tích hợp với giao diện màn hình cảm ứng màu, máy bơm lắp sẵn, bộ điều khiển lưu lượng khí và bộ điều khiển pH/DO/bọt/cấp độ. Thể tích làm việc của thiết bị phản ứng sinh học là 10 lít.

Môi trường dinh dưỡng chứa glucoza, chiết xuất nấm men, ure, và dầu thực vật. Chất cấy có thể là nuôi cấy *Starmerella bombicola* từ 1 đến 2 ngày với khoảng 5-10% tổng khối lượng nuôi. Thời gian nuôi cấy và thu hoạch sản phẩm có sẵn tiếp tục trong 5-14 ngày. Sản phẩm sophorolipit cuối cùng có thể đạt 1-2 kg cho mỗi chu kỳ.

Ví dụ 3: Lên men nấm men *Wickerhamomyces* và/hoặc *Pichia* để sản xuất SLP trong thiết bị phản ứng sinh học phân phối 450 L

Thiết bị phản ứng sinh học không khí di động được vận hành bởi PLC với bộ lọc nước, bộ điều khiển nhiệt độ, và máy thổi khí để có sục đủ khí. Quá trình có thể được thực hiện như quy trình nuôi cấy hàng loạt. Thiết bị phản ứng sinh học có thể tích hoạt động 400 L khi nuôi cấy *Wickerhamomyces* hoặc *Pichia* để sản xuất SLP.

Trong các phương án ưu tiên, các chất dinh dưỡng để sản xuất SLP là glucoza, ure, chiết xuất nấm men, dầu củ cải, magie sunfat và kali phosphat.

Chất cấy vào thiết bị phản ứng sinh học này đòi hỏi phải có tới 5% môi trường nhân giống dạng lỏng của thể tích nuôi cấy. Thời gian của chu kỳ nuôi cấy là 7 ngày, ở nhiệt độ 25°C và pH 3,5, với việc lấy mẫu được thực hiện hai lần một ngày.

Nồng độ cuối cùng của SLP là khoảng 20-25% thể tích nuôi cấy, trong trường hợp này lớn hơn 90 L của các mẫu sản phẩm.

Ví dụ 4: Lên men nấm men *Wickerhamomyces* và/hoặc *Pichia* để sản xuất tế bào hoặc protein đơn bào trong thiết bị phản ứng sinh học phân phối 900 L

Thiết bị phản ứng sinh học di động được chia thành hai bể được vận hành bởi lực đẩy không khí trung tâm giúp trộn hai bể đồng thời được sử dụng. Thiết bị phản ứng sinh học có thể tích làm việc 600 L khi nuôi cấy *Wickerhamomyces* và/hoặc *Pichia* để sản xuất tế bào.

Trong phương án ưu tiên, các chất dinh dưỡng để sản xuất tế bào là glucoza hoặc đường bột, ure, chiết xuất nấm men, magie sulfat và kali phosphat.

Thiết bị phản ứng sinh học được cấy với 2% môi trường nhân giống. Quá trình lên men tiếp tục trong 48-72 giờ mà không ổn định pH và nhiệt độ từ 26 đến 32°C.

Nồng độ cuối cùng của các tế bào sẽ là 100 g khối lượng ướt trên mỗi lít. Nồng độ sinh khối ướt có thể đạt 90 kg mỗi chu kỳ với nồng độ protein lên tới 45 kg.

Ví dụ 5: Lên men nấm men *Wickerhamomyces* và/hoặc *Pichia* để sản xuất tế bào hoặc protein đơn bào trong thiết bị phản ứng sinh học phân phối 200 L

Thiết bị phản ứng sinh học di động được chia thành hai bể vuông có 2 vòng để trao đổi chất giữa chúng được sử dụng. Thiết bị phản ứng sinh học có thể tích hoạt động 2000 L khi nuôi cấy *Wickerhamomyces* và/hoặc *Pichia* để sản xuất tế bào.

Trong phương án ưu tiên, các chất dinh dưỡng để sản xuất tế bào là glucoza hoặc đường bột, ure, chiết xuất nấm men, magie sulfat và kali phosphat.

Thiết bị phản ứng sinh học được cấy với 2% môi trường nhân giống. Quá trình lên men tiếp tục trong 48-72 giờ mà không ổn định pH và nhiệt độ từ 26 đến 32°C.

Nồng độ cuối cùng của các tế bào sẽ là 100 g khối lượng ướt trên mỗi lít. Nồng độ sinh khối ướt có thể đạt tới 200 kg mỗi chu kỳ với nồng độ protein lên tới 100 kg.

Ví dụ 6: Lên men *Pseudozyma aphidis* để sản xuất mannosylerythritol lipit (MEL) trong thiết bị phản ứng sinh học phân phối 14 L cầm tay

Đây là bình thủy tinh có vỏ bọc có thể hấp được bằng hơi nước và cánh khuấy Rushton. Nó được trang bị đầu dò DO, pH, nhiệt độ và bọt. Thiết bị có trạm điều khiển tích hợp với giao diện màn hình cảm ứng màu, máy bơm lắp sẵn, bộ điều khiển lưu lượng khí và bộ điều khiển bọt/pH/DO/cấp độ. Thể tích làm việc của thiết bị phản ứng sinh học là 10 lít.

Thành phần môi trường dinh dưỡng: Natri nitrat, kali phosphat, magie sunfat, chiết

xuất nấm men, và dầu thực vật. Chất cấy có thể là nuôi cấy *Pseudozyma aphidis* từ 1 đến 2 ngày tuổi, chiếm khoảng 5-10% tổng khối lượng nuôi. Thời gian nuôi cấy và thu hoạch mẫu: 9-15 ngày. Sản lượng MEL cuối cùng: 800 -1.000 g.

Ví dụ 7: Sử dụng SLP để làm giảm trứng của tuyến trùng gây bệnh bướu rễ trên cây cà chua

Starmerella bombicola được nuôi cấy như mô tả ở trên. Vào cuối quá trình nuôi cấy lên men, dịch nuôi cấy lắng xuống và hầu hết SLP tách ra thành lớp màu nâu sẫm (nồng độ khoảng 500 gm/L). Lớp màu nâu này chủ yếu chứa SLP và một số tế bào. Lớp được thu hoạch và độ pH được điều chỉnh thành pH 7,0, dung dịch đó sau đó được pha loãng với nước để đạt được nồng độ mong muốn.

Ngày 1. Hạt giống cà chua (Moneymaker) nảy mầm

Ngày 14. Chuẩn bị cát/đất sét nung (tỷ lệ 1:1) với 1% phân bón (osmocote), trồng cây cà chua giống 2 tuần.

Ngày 28. Gây mầm vi sinh vật bằng cách tưới ướt đất trồng cây 4 tuần tuổi. Với mỗi chậu vuông 10 cm x 10 cm, tưới 80 - 100 ml đủ để làm ướt đất.

Ngày 32. 4 ngày sau khi gây mầm vi sinh vật, cho trứng tuyến trùng gây bệnh bướu rễ (Root-Knot Nematode: RKN) (4.000 trứng cho mỗi chậu) cho mỗi cây.

Ngày 76. Sau 6 tuần cho trứng RKN vào, thu hoạch cây.

Sau khi thu hoạch, cây được rửa dưới vòi nước để loại bỏ cát/đất sét nung bám trên gốc. Khối lượng tươi của rễ được ghi lại. Sau đó, rễ được cắt thành miếng nhỏ và đặt trong túi giữ nhiệt nhỏ bằng nhựa. Sau khi thêm 200 ml thuốc tẩy trắng 5%, túi được ủ và lắc nhẹ trong 15 phút. Sau đó, trứng được đếm ba lần trong 10 μ l dưới kính hiển vi soi nổi. Tổng số trứng trên mỗi rễ đã được tính toán. Cuối cùng, số lượng trứng trong mỗi gram sinh khối rễ đã được tính toán.

SLP 0,25% cũng cho thấy hoạt động chống lại tuyến trùng gây bướu rễ (RNK) với việc giảm khoảng 52% trứng.

Ví dụ 8: So sánh khả năng kiểm soát của tuyến trùng gây bướu rễ, vết chích và gây tổn thương của SLP, MEL và NIMITZ®.

Nimitz® là chất hóa học mới diệt giun tròn đầu tiên được phát triển trong hơn 20

năm. Nimitz® gây ra hoạt động diệt côn trùng không hồi phục và tác dụng nhanh chóng ngay sau khi ứng dụng. Trong vòng một giờ sau khi tiếp xúc, tuyến trùng ngừng ăn và nhanh chóng bị tê liệt. Trong vòng 24 đến 48 giờ, tỷ lệ tử vong của tuyến trùng xảy ra thay vì tuyến trùng tạm thời không vận động, như đã được quan sát với các chất organophosphat và các thuốc diệt giun tròn carbamat.

Pseudozyma aphidis được nuôi cấy như mô tả ở trên. Vào cuối quá trình lên men, toàn bộ môi trường nuôi cấy đã được sử dụng, vì MEL rất khó tách mà không sử dụng bất kỳ dung môi nào. MEL sau đó được pha loãng với nước đến nồng độ mong muốn ngay trước khi sử dụng.

Starmerella bombicola được nuôi cấy như mô tả ở trên. Vào cuối quá trình nuôi cấy lên men, dịch nuôi cấy lắng xuống và hầu hết SLP tách ra thành lớp màu nâu sẫm (nồng độ khoảng 500 gm/L). Lớp màu nâu này chủ yếu chứa SLP và một số tế bào. Lớp được thu hoạch và độ pH được điều chỉnh đến độ pH 7,0. Dung dịch sau đó được pha loãng với nước để đạt được nồng độ mong muốn.

Các xét nghiệm sinh học sau đây đã được tiến hành: Đổ đầy các bản kính lõm với lượng sản phẩm thử nghiệm thích hợp. Thêm quần thể đã biết tuyến trùng non đích vào dung dịch có chứa thuốc diệt giun tròn. Duy trì các bản kính lõm ở nhiệt độ phòng. Tỷ lệ tử vong của tuyến trùng có thể được đánh giá bằng cách đếm số lượng tuyến trùng ở 24, 48 và 72 giờ. Tỷ lệ tử vong được tính là: $[\text{trung bình số con non chết khi xử lý} / \text{tổng số con non khi xử lý}] \times 100$,

A. Tuyến trùng gây bướu rễ

Tỷ lệ tử vong của tuyến trùng gây bướu rễ (*Meloidogyne incognita*) (nghĩa là có bao nhiêu tuyến trùng bị giết) và thiếu vận động (nghĩa là có bao nhiêu tuyến trùng bị bệnh chết) được xác định sau 3 ngày xử lý SLP (SD10) hoặc MEL (SD12) ở các nồng độ khác nhau và được so sánh với việc xử lý Nimitz® và đối chứng không được xử lý (tham chiếu trên Fig.1 và Fig.2). Tỷ lệ tử vong được tính bằng số lượng tuyến trùng chết/tổng số tuyến trùng trước khi thử nghiệm. Tỷ lệ tuyến trùng không vận động được tính bằng số lượng tuyến trùng không vận động/số lượng tuyến trùng sống. Do đó, khả năng vận động được tính bằng tỷ lệ phần trăm của các tuyến trùng không bị giết nhưng được xác định là không vận động.

Mức MEL cao (0,1% v/v) là phương pháp xử lý hiệu quả nhất trong thử nghiệm.

Nó hiệu quả hơn đáng kể so với Nimitz® liên quan đến tỷ lệ tử vong. Phản ứng liều lượng rõ ràng đã được quan sát. Kết quả cũng cho thấy SLP có hiệu quả tương đương với Nimitz® về tỷ lệ tử vong và thiểu vận động của tuyến trùng gây bướu rễ.

B. Tuyến trùng chích

Tỷ lệ tử vong và giảm vận động của tuyến trùng (*Belonolaimus longicaudatus*) được xác định sau 3 ngày xử lý SLP hoặc MEL ở các nồng độ khác nhau và so với xử lý bằng Nimitz® và đối chứng không được xử lý (tham chiếu trên Fig.1 và Fig.2).

Kết quả cho thấy cả SLP và MEL đều làm tăng tỷ lệ tử vong của tuyến trùng và tỷ lệ giảm vận động theo cách phụ thuộc liều lượng. Nồng độ MEL cao (0,1% hoặc 0,2% v/v) là phương pháp xử lý hiệu quả nhất trong thử nghiệm. Chúng có hiệu quả tương đương với Nimitz® về tỷ lệ tử vong và hiệu quả hơn Nimitz® về tỷ lệ giảm vận động.

C. Tuyến trùng gây tổn thương

Tỷ lệ tử vong và giảm vận động của tuyến trùng (*Pratylenchus sp.*) được xác định sau 3 ngày xử lý SLP hoặc MEL ở các nồng độ khác nhau và so sánh với xử lý bằng Nimitz® và đối chứng không được xử lý (tham chiếu trên Fig.1 và Fig.2).

Kết quả cho thấy cả SLP và MEL đều làm tăng tỷ lệ tử vong của tuyến trùng và tỷ lệ giảm vận động theo cách phụ thuộc liều lượng. MEL hiệu quả hơn SLP và có thể so sánh với Nimitz® trong thử nghiệm.

Ví dụ 9: Đánh giá các phương pháp xử lý khác nhau để chống lại tuyến trùng gây bướu rễ Southern trong phòng thí nghiệm bệnh lý học thu nhỏ.

Xử lý SLP (SD10) và xử lý MEL (SD12) ứng dụng trực tiếp cho đất bị nhiễm tuyến trùng đã được thử nghiệm ở hai tỷ lệ, độc lập hoặc cùng nhau, và so sánh với Nimitz® và đối chứng không được xử lý để làm giảm mật độ tuyến trùng gây bướu rễ Southern. Việc đếm được thực hiện tại ba thời điểm khác nhau sau khi xử lý.

Sáu lần lặp lại của 7 phương pháp xử lý đã được tiến hành trong lọ thủy tinh chứa 350 cm³ đất cát 99%. Các lọ được gây mầm 70 con tuyến trùng gây bướu rễ trưởng thành Southern (*Meloidogyne incognita*). Một ứng dụng xử lý đã được thực hiện ngay sau khi gây mầm tuyến trùng, trong đó 85 ml chất xử lý được đổ bằng tay vào mỗi lọ. Hỗn hợp xử lý được điều chế theo Bảng 1 (bên dưới). Số lượng tuyến trùng sống và chết được đếm vào ngày 3, ngày 14 và ngày 23 sau xử lý. Số lượng tuyến trùng không vận

động, tính theo tỷ lệ phần trăm của tổng số sinh vật sống, cũng được lập bảng.

Bảng 1. Điều chế hỗn hợp để xử lý

Số TT	Tên xử lý	Loại quy cách	Tỷ lệ	Đơn vị tỷ lệ	Lượng sản phẩm để đo
1	SD10	L	0,25	% v/v	2,5 ml/mx
2	SD10	L	0,5	% v/v	4,999 ml/mx
3	SD12	L	0,1	% v/v	0,9999 ml/mx
4	SD12	L	0,2	% v/v	2,0 ml/mx
5	SD10 + SD12	L	0,25	% v/v	2,5 ml/mx
		L	0,1	% v/v	0,9999 ml/mx
6	Nimitz®	L	10	ppm pr	9,999 ul/mx
7	Đối chứng không được xử lý				

Không gian xử lý: 6; thể tích phun: 85 mL/mẫu; lô đất: 4 x 20 ft.; thể tích hỗn hợp: 1 L (thể tích hỗn hợp được tính toán 0 L).

Kết quả

Kết quả thử nghiệm trong lọ đối với sản phẩm SD10 và SD12 cho thấy đáp ứng liều dương tính đối với hoạt động chống lại tuyến trùng gây bướu rễ Southern. SD10 và SD12 được ứng dụng cùng nhau ở nồng độ thấp không hiệu quả bằng sản phẩm hoạt động độc lập ở tỷ lệ cao hơn. Nimitz® cung cấp sự kiểm soát vượt trội.

Fig.3 và bảng 2 (bên dưới) thể hiện số lượng tuyến trùng sống đối với mỗi lần xử lý. Fig.4 và Bảng 3 (bên dưới) thể hiện kiểm soát tuyến trùng sống (nghĩa là tỷ lệ tử vong của tuyến trùng) cho mỗi lần xử lý.

Bảng 2. Số lượng giun tròn sống

Số TT	Tên xử lý	Tỷ lệ	Đơn vị tỷ lệ	Mã ứng dụng	Số lượng đếm trước		3 DA-A		14 DA-A		23 DA-A	
1	SD10	0,25	% v/v	A	77,00	a	52,00	a	38,17	a	13,50	ab
2	SD10	0,5	% v/v	A	77,00	a	47,67	a	36,67	a	11,50	b
3	SD12	0,1	% v/v	A	77,00	a	46,33	a	36,00	a	11,83	b
4	SD12	0,2	% v/v	A	77,00	a	48,50	a	33,33	a	8,17	c
5	SD10 + SD12	0,25	% v/v	A	77,00	a	46,00	a	36,50	a	11,83	b
		0,1	% v/v	A								
6	Nimitz®	10	ppm pr	A	77,00	a	16,00	b	4,17	b	1,67	d
7	Đối chứng không được xử lý				77,00	a	50,50	a	39,83	a	15,33	a

Bảng 3. Kiểm soát tuyến trùng sống sót (%)

Số TT	Tên xử lý	Tỷ lệ	Đơn vị tỷ lệ	Mã ứng dụng	3 DA-A		14 DA-A		23 DA-A	
1	SD10	0,25	% v/v	A	1,84	bc	9,09%	bc	15,56	cd
2	SD10	0,5	% v/v	A	8,29	bc	8,03%	bc	25,72	c
3	SD12	0,1	% v/v	A	8,84	bc	9,24%	bc	22,18	c
4	SD12	0,2	% v/v	A	9,39	b	18,64%	b	44,88	b
5	SD10 + SD12	0,25 0,1	% v/v % v/v	A A	10,88	b	11,40%	bc	20,90	c
6	Nimitz®	10	ppm pr	A	68,24	a	89,94%	a	89,77	a
7	Đối chứng không được xử lý				0,00	c	0,00%	c	0,00	d

Có sự kiểm soát cao hơn đáng kể được ghi nhận ngay từ ngày thứ 3 (3 DA-A) trong các lọ được xử lý bằng Nimitz® (10 ppm). Đối với cả SD10 và SD12, có các đáp ứng liều lượng đáng kể được quan sát trong mỗi lọ ở 23 DA-A, với các mẫu được xử lý có tỷ lệ xử lý cao hơn có số lượng tuyến trùng thấp hơn so với các mẫu có tỷ lệ thấp hơn. Khi cả SD10 và SD12 được ứng dụng kết hợp ở tỷ lệ thấp, tỷ lệ tử vong của tuyến trùng không tăng đáng kể đến mức quan sát được trong các phương pháp xử lý với tỷ lệ cao hơn.

Fig.5 và Bảng 4 (bên dưới) thể hiện số lượng tuyến trùng không vận động. Fig.6 và Bảng 5 (bên dưới) thể hiện số lượng tuyến trùng sống nhưng không vận động (%).

Bảng 4. Số lượng tuyến trùng không vận động

Số TT	Tên xử lý	Tỷ lệ	Đơn vị tỷ lệ	Mã ứng dụng	3 DA-A		14 DA-A		23 DA-A	
1	SD10	0,25	% v/v	A	3,33	c	4,67	bc	2,50	ab
2	SD10	0,5	% v/v	A	5,17	bc	4,67	bc	3,17	a
3	SD12	0,1	% v/v	A	7,33	b	4,67	bc	1,50	bc
4	SD12	0,2	% v/v	A	11,83	a	6,67	a	2,00	abc
5	SD10 + SD12	0,25 0,1	% v/v % v/v	A A	10,00	a	6,33	ab	3,17	a
6	Nimitz®	10	ppm pr	A	4,67	c	2,50	d	0,67	c
7	Đối chứng không được xử lý				2,83	c	3,33	cd	1,83	abc

Bảng 5. Số lượng tuyến trùng sống nhưng không vận động (%)

Số	Tên xử lý	Tỷ lệ	Đơn vị tỷ lệ	Mã ứng dụng	3 DA-A	14 DA-A	23 DA-A
----	-----------	-------	--------------	-------------	--------	---------	---------

TT										
1	SD10	0,25	% v/v	A	6,39	e	12,86	b	18,80	a
2	SD10	0,5	% v/v	A	11,18	de	12,55	b	28,61	a
3	SD12	0,1	% v/v	A	15,78	cd	13,51	b	13,16	a
4	SD12	0,2	% v/v	A	25,03	ab	20,85	b	22,59	a
5	SD10 + SD12	0,25 0,1	% v/v % v/v	A A	22,00	bc	17,89	b	27,85	a
6	Nimitz®	10	ppm pr	A	30,55	a	43,06	a	36,67	a
7	Đối chứng không được xử lý				5,91	e	8,54	b	13,01	a

Số lượng tuyến trùng không vận động là thấp nhất trong các mẫu được xử lý bằng Nimitz®. Ở 3 DA-A có tỷ lệ cao hơn tuyến trùng không vận động như tỷ lệ của SD10 hoặc SD12 được tăng lên, cho thấy hoạt động sớm của thuốc trừ sâu không dẫn đến tử vong ngay lập tức. Đến 14 DA-A, tỷ lệ tuyến trùng sống không vận động không khác nhau về mặt thống kê, trong số các lọ được xử lý SD.

Ví dụ 10: Sử dụng MEL như thuốc diệt giun tròn trong hệ thống trồng cây dưa chuột

Mảnh đất nhỏ ở ngoài trời thuộc Thonotosassa, Florida, Mỹ được sử dụng để nghiên cứu phương pháp xử lý tuyến trùng MEL cho cây dưa chuột so với Nimitz® và đối chứng không được xử lý. Sáu nhóm được xử lý khác nhau, mỗi nhóm gồm 8 cây đã được nghiên cứu. Đối với các nhóm được xử lý SD12 (0,2% ai/v), xử lý được ứng dụng cho đất một lần, hai lần hoặc ba lần. Cả số lượng tuyến trùng và tỷ lệ hình thành bấu rễ được thu thập sau khi thu hoạch. Sức sống, năng suất và khối lượng của cây cũng được đo.

Cây được xử lý bằng Nimitz® (5 pt/a) được trồng trong đất được xử lý 7 ngày trước khi trồng (xử lý hóa học gây độc quá mức để được ứng dụng trong mùa sinh trưởng). Đối với tất cả các cây được xử lý SD12, ứng dụng lần đầu SD12 vào đất (60 mL cho mỗi cây) xảy ra tại thời điểm trồng. Đối với các cây được xử lý kép và xử lý ba lần với SD12, ứng dụng lần thứ hai 60 mL diễn ra sau hai tuần xử lý đầu tiên. Đối với cây được xử lý ba lần với SD12, ứng dụng lần thứ ba 60 mL xảy ra sau lần xử lý đầu tiên bốn tuần.

Số lượng tuyến trùng và tỷ lệ hình thành bấu rễ được thu thập ở tất cả các nhóm trong 31 ngày sau lần xử lý với SD12 lần cuối cùng. Sức sống thực vật (0-10 chỉ số/thang

đo), năng suất (lbs.) và khối lượng (lbs.) được đo vào ngày hôm sau.

Kết quả

Tỷ lệ đáp ứng đã được quan sát thấy trong tỷ lệ hình thành bướu rế (Fig.7 và Bảng 6 (bên dưới)) và số lượng tuyến trùng sau xử lý (Fig.8 và Bảng 7 (bên dưới)). SD12 thực hiện theo tiêu chuẩn thương mại. Không có sự khác biệt đáng kể giữa các phương pháp xử lý với SD12 và Nimitz®, nhưng sự khác biệt đáng kể đã được quan sát giữa các phương pháp xử lý với SD12 và đối chứng không được xử lý. Sức sống, năng suất và khối lượng của cây khi thu hoạch được thể hiện trong Bảng 8 dưới đây.

Bảng 6. Tỷ lệ hình thành bướu rế (1-10 chỉ số/thang đo)

Số TT	Tên xử lý	Tỷ lệ	Đơn vị tỷ lệ	Mã ứng dụng	Tỷ lệ hình thành bướu rế	
1	Đối chứng không được xử lý				2,9	a
2	Nimitz®	5	pt/a	A	1,1	b
3	SD12 x 1	0,2	% ai/v	B	1,1	b
4	SD12 x 2	0,2	% ai/v	BC	0,7	b
5	SD12 x 3	0,2	% ai/v	BCD	0,3	b

Giá trị sai khác nhỏ nhất có ý nghĩa (LSD) ($P=0,05$) = 0,88; SD = 0,86; CV = 69,39; (Bartlett's X^2) = 11,754; P (Bartlett's X^2) = 0,019*; lặp lại F = 3,712; xác suất lặp lại (F) = 0,0061; Xử lý F = 11,133; xác suất xử lý (F) = 0,0001.

Bảng 7. Số lượng của tuyến trùng

Số TT	Tên xử lý	Tỷ lệ	Đơn vị tỷ lệ	Mã ứng dụng	Số lượng tuyến trùng	
1	Đối chứng không được xử lý				59	a
2	Nimitz®	5	pt/a	A	27	b
3	SD12 x 1	0,2	% ai/v	B	20	b
4	SD12 x 2	0,2	% ai/v	BC	18	b
5	SD12 x 3	0,2	% ai/v	BCD	9	b

LSD ($P=0,05$) = 17,33; SD = 16,3; CV = 63,88; Bartlett's X^2 = 17,263; P (Bartlett's X^2) = 0,002*; lặp lại F = 2,774; xác suất lặp lại (F) = 0,0261; xử lý F = 10,44; xác suất xử lý (F) = 0,0001.

Bảng 8. Số đo sức sống của cây (0-10), khối lượng (lbs.) và khối lượng (lbs.) khi

thu hoạch cây.

Số TT	Tên xử lý	Tỷ lệ	Đơn vị tỷ lệ	Mã ứng dụng	Sức sống		NĂng suất		Khối lượng	
1	Đối chứng không được xử lý				6,2	b	2,188	a	1,131	a
2	Nimitz®	5	pt/a	A	8,0	a	3,063	a	1,550	a
3	SD12 x 1	0,2	% ai/v	B	8,1	a	2,438	a	1,288	a
4	SD12 x 2	0,2	% ai/v	BC	8,4	a	2,638	a	1,263	a
5	SD12 x 3	0,2	% ai/v	BCD	8,2	a	3,281	a	1,425	a

Ví dụ 11: Đánh giá của hiệu quả thu hút tuyến trùng

Số lượng và tỷ lệ nhiễm của tuyến trùng gây bướu rễ Southern được lấy trong bốn buồng kín 11,6 in x 7,6 in (29,464 cm x 19.304 cm). Các buồng kín có chứa đất cát mịn có nguyên liệu hấp dẫn. Trước khi thực hiện, chiết xuất từ rễ cây nữ lang có sẵn được pha trộn với nước, glycerin thực vật và rượu ngũ cốc 20% để tạo ra chất thu hút.

Mỗi ô được cấy với tuyến trùng trong vùng có đường kính 2 cm. 10 ml chất thu hút tuyến trùng đã được bổ sung vào trong vùng 3 cm (chiều cao) x 1 cm (chiều rộng), 2 cm từ vùng gây mầm (tham chiếu trên Fig.9).

Số lượng tuyến trùng và tỷ lệ nhiễm đã được thực hiện ở ba địa điểm, 3 ngày sau xử lý và 8 ngày sau xử lý. Ba địa điểm được thử nghiệm bao gồm trung tâm vùng gây mầm, vùng thu hút và khu vực chưa được xử lý.

Kết quả

Kết quả được tổng hợp như thể hiện trên Fig.10 và trong Bảng 9 (bên dưới). Việc di chuyển sang khu vực thu hút hoặc không được xử lý có sự khác biệt đáng kể so với khu vực gây mầm tuyến trùng theo tỷ lệ phần trăm của tổng số lượng. Tại các địa điểm lấy mẫu 24 và 48 giờ, đếm được nhiều tuyến trùng trong vùng thu hút hơn các khu vực chưa được xử lý là hơn 14%; tuy nhiên, khu vực trung tâm nơi tuyến trùng được gây mầm chứa nhiều tuyến trùng nhất.

Bảng 9. Số lượng tuyến trùng và phần trăm lây nhiễm trong đánh giá thu hút

Số TT	Vùng xử lý	Tỷ lệ	Đơn vị tỷ lệ	Tổng số				Sâu bộ %			
				3 DA-A		8 DA-A		3 DA-A		8 DA-A	
1	Trung tâm			63,50	a	22,50	a	62,17	a	76,52	a

2	Hấp dẫn được xử lý	10	mL/mẫu	27,50	b	6,00	b	28,67	b	18,66	b
3	Đối chứng không được xử lý			8,75	b	1,75	b	9,16	c	4,82	c

Tất cả các patent, các đơn patent, các đơn tạm thời, và các công bố được đề cập hoặc trích dẫn ở đây đều được kết hợp bằng cách tham chiếu toàn bộ, bao gồm tất cả các hình vẽ và bảng trong phạm vi phù hợp với nội dung mô tả của sáng chế.

Phân mô tả ở đây về bất kỳ khía cạnh hoặc phương án nào của sáng chế sử dụng các thuật ngữ như “gồm có”, “có”, “bao gồm” hoặc “chứa” với tham chiếu đến một yếu tố hoặc các yếu tố nhằm cung cấp sự hỗ trợ cho khía cạnh hoặc phương án tương tự của sáng chế mà “bao gồm”, “thực chất bao gồm”, “chủ yếu bao gồm” yếu tố hoặc các yếu tố cụ thể, trừ khi có quy định khác theo ngữ cảnh.

Chỉ dẫn tham chiếu:

Đơn sáng chế này hưởng quyền ưu tiên đối với đơn xin cấp patent tạm thời Hoa Kỳ số 62/422,918, được nộp vào ngày 16 tháng 11 năm 2016, được kết hợp bằng cách tham chiếu toàn bộ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp kiểm soát tuyến trùng, trong đó phương pháp này bao gồm điều chế chế phẩm diệt giun tròn bằng cách nuôi cấy vi sinh vật *Pseudozyma aphidis* trong đó vi sinh vật *Pseudozyma aphidis* sản sinh chất hoạt động bề mặt sinh học mannosylerythritol lipit (MEL); nuôi cấy vi sinh vật *Starmerella bombicola* trong đó vi sinh vật *Starmerella bombicola* sản sinh chất hoạt động bề mặt sinh học sophorolipit (SLP); và trộn *Pseudozyma aphidis* được nuôi cấy và MEL với *Starmerella bombicola* được nuôi cấy và SLP,

trong đó chế phẩm diệt giun tròn chứa vi sinh vật *Pseudozyma aphidis*, MEL, dịch nuôi cấy có vi sinh vật *Pseudozyma aphidis* được nuôi cấy trong đó, cũng như vi sinh vật *Starmerella bombicola*, SLP, dịch nuôi cấy có vi sinh vật *Starmerella bombicola* được nuôi cấy trong đó, và

phương pháp còn bao gồm việc ứng dụng thành phần diệt giun tròn cho tuyến trùng và/hoặc môi trường của chúng.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này được sử dụng để kiểm soát một hoặc nhiều tuyến trùng gồm *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne incognita*, *Belonolaimus longicaudatus*, *Heterodera glycines*, *Pratylenchus sp.*, *Xiphinema sp.*, và *Tylenchulus semipenetrans*.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này được sử dụng để kiểm soát tuyến trùng gây hại trên cây trồng.

4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó cây trồng được lựa chọn từ cà chua, đậu tương, ngô, cam quýt và cỏ.

5. Phương pháp theo điểm 3, trong đó chế phẩm được ứng dụng làm xử lý hạt giống.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chế phẩm được áp dụng vào đất.

7. Phương pháp kiểm soát tuyến trùng trong đó phương pháp bao gồm ứng dụng cho tuyến trùng, và/hoặc môi trường của tuyến trùng, chế phẩm chủ yếu bao gồm vi sinh vật *Pseudozyma aphidis* và dịch nuôi cấy có vi sinh vật được nuôi cấy trong đó, trong đó dịch nuôi cấy chứa mannosylerythritol lipit (MEL); và vi sinh vật *Starmerella bombicola* và dịch nuôi cấy có vi sinh vật được nuôi cấy trong đó, trong đó dịch nuôi cấy *Starmerella bombicola* chứa sophorolipit (SLP).

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó phương pháp này được sử dụng để kiểm soát tuyến trùng được lựa chọn từ tuyến trùng gây bướu rễ, tuyến trùng chích, tuyến trùng nang đậu tương, tuyến trùng gây tổn thương, tuyến trùng gây thối rễ, và tuyến trùng gây bệnh trên cam quýt.

Tỷ lệ tử vong của tuyến trùng được xử lý qua các nghiên cứu

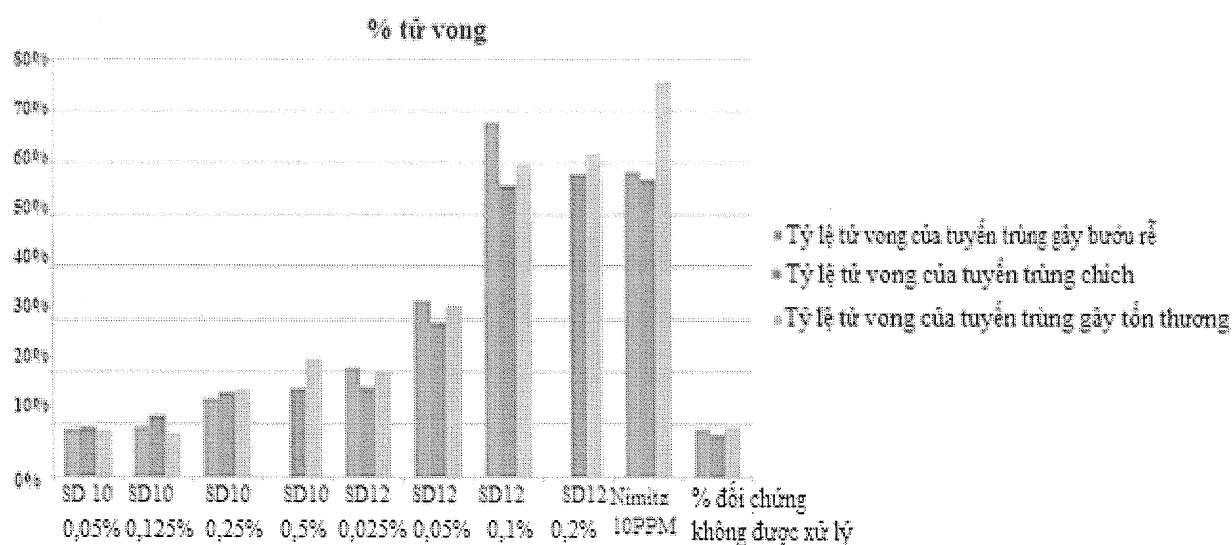


Fig.1

Tỷ lệ tử vong của tuyến trùng được xử lý qua các nghiên cứu

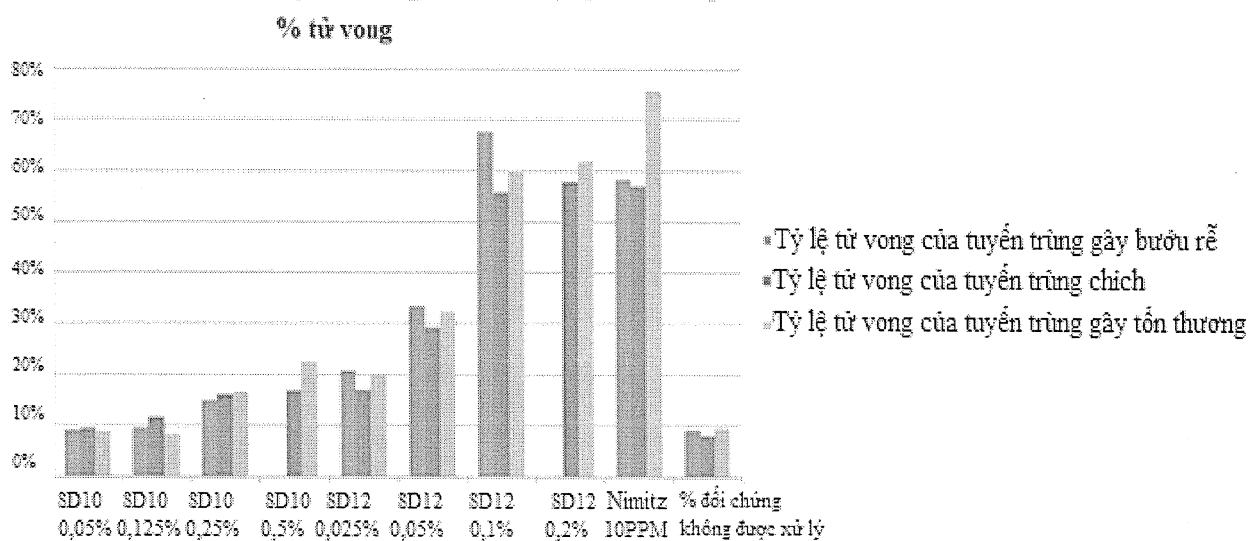


Fig.2

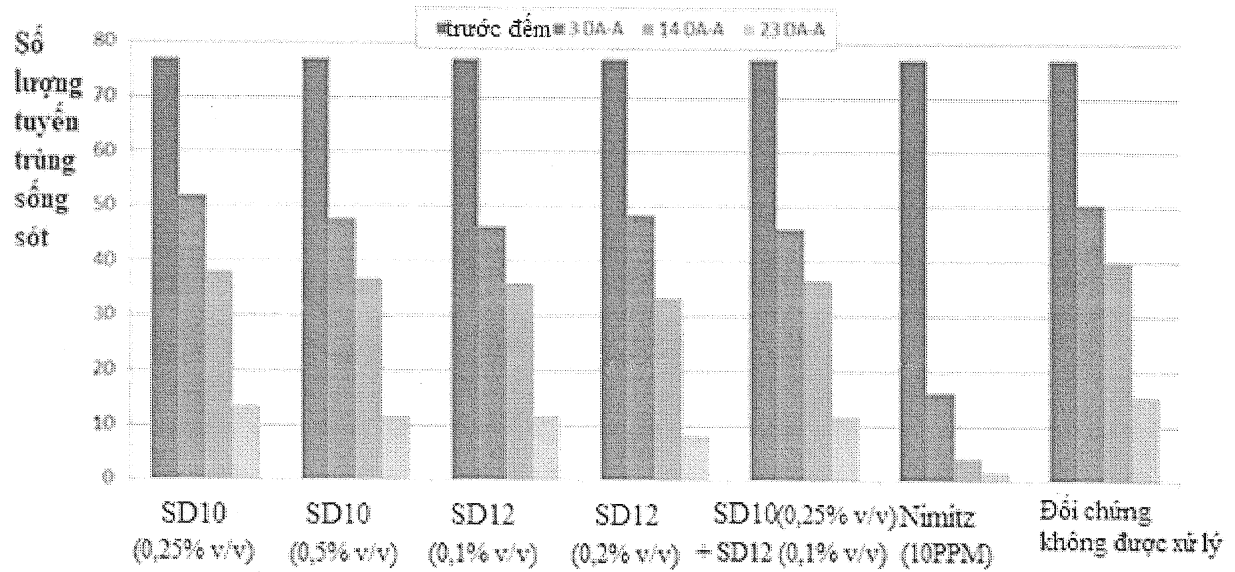


Fig.3

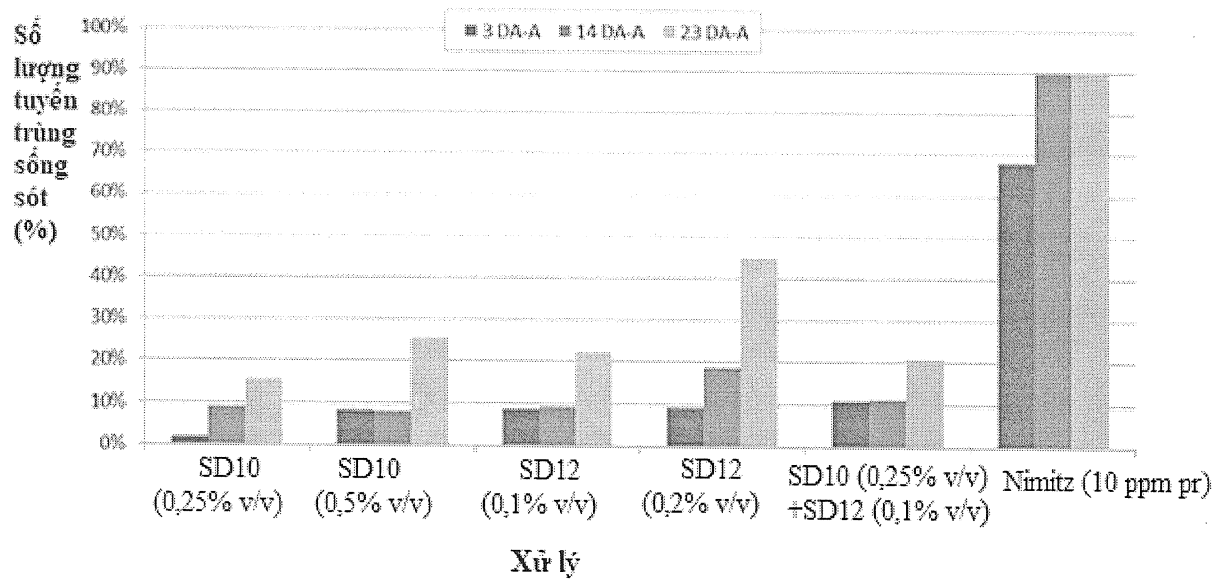


Fig.4

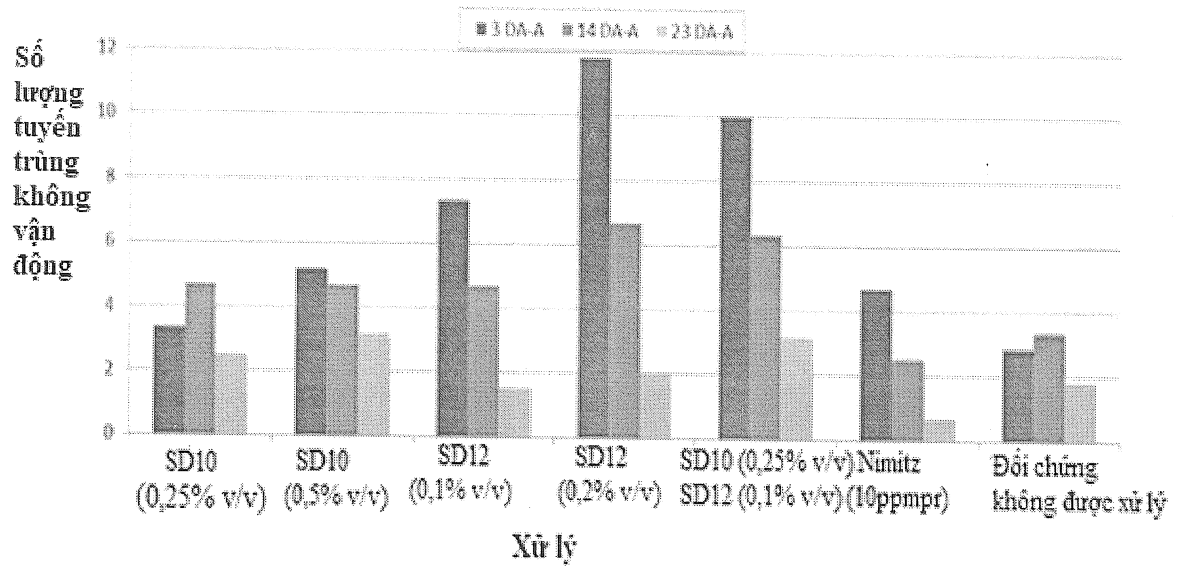


Fig.5

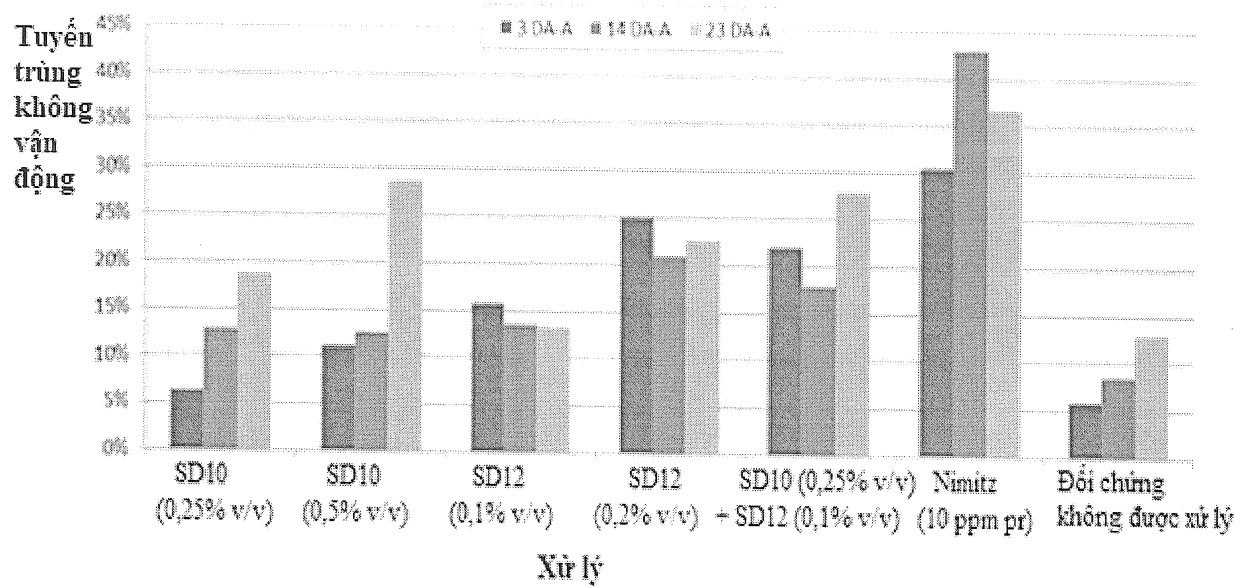


Fig.6

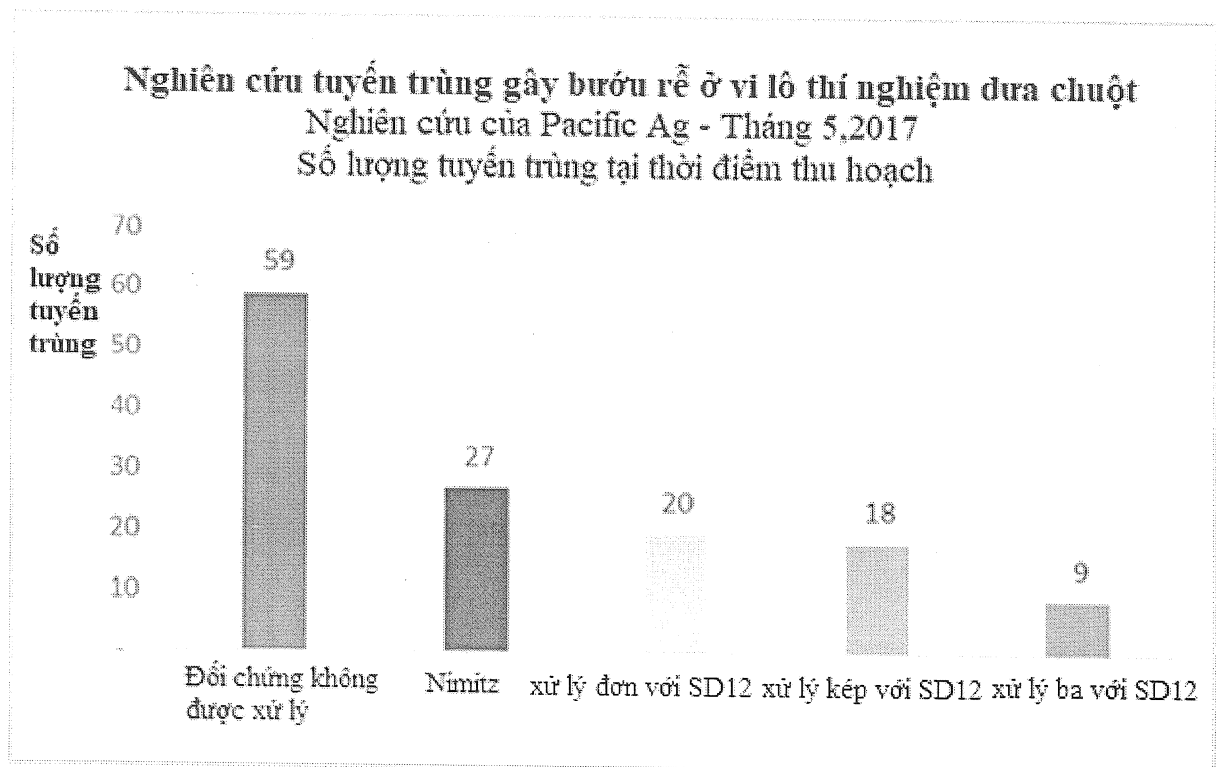


Fig.7

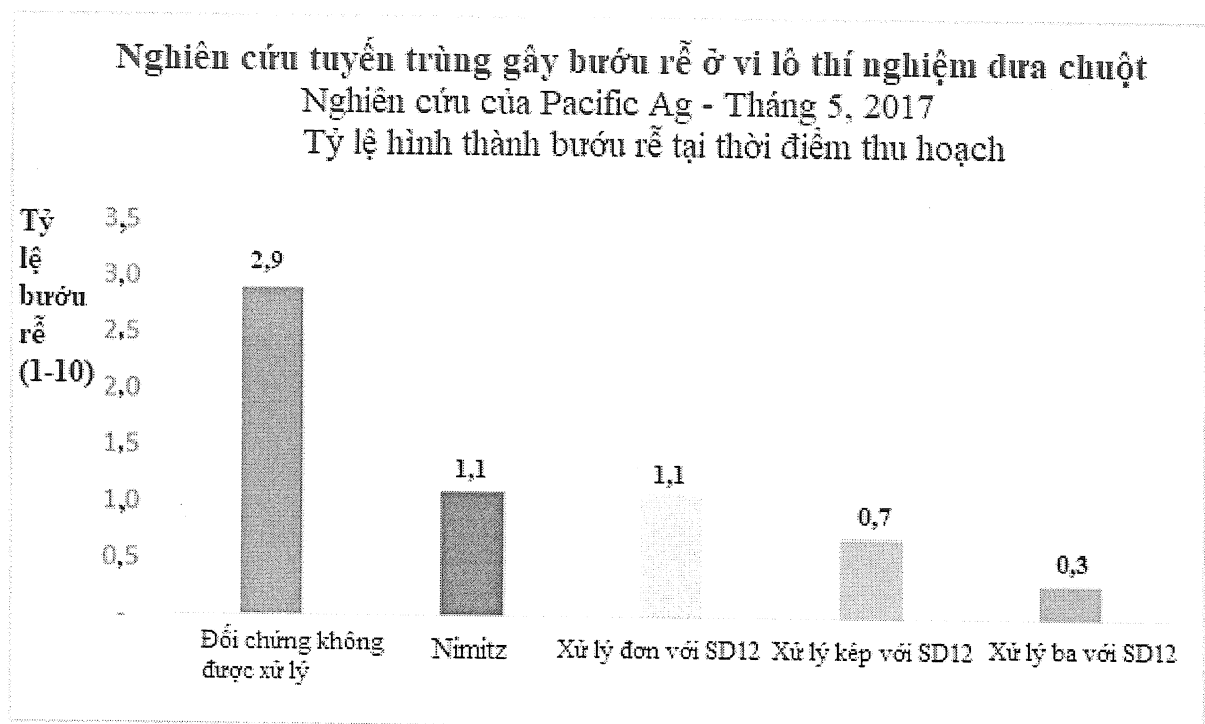


Fig.8

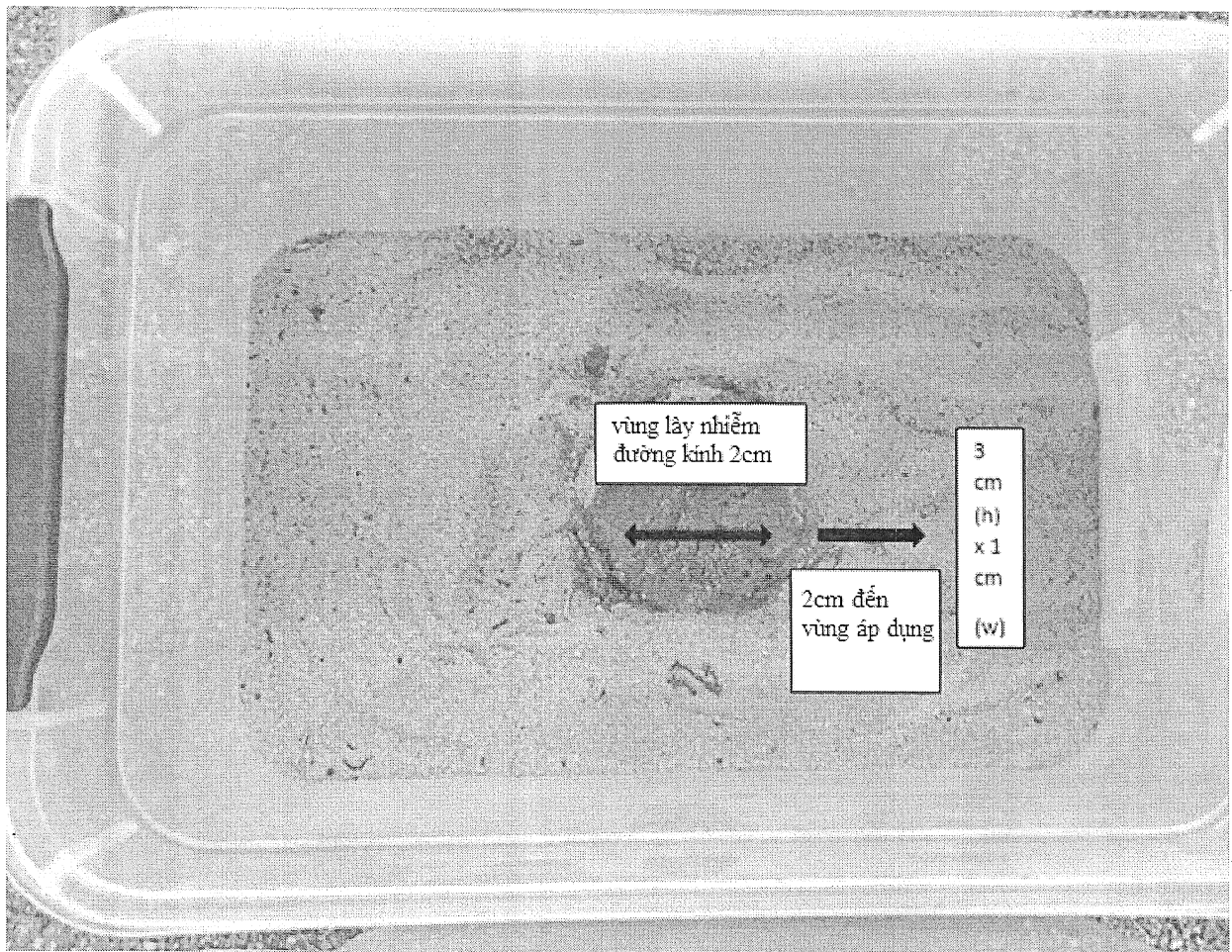


Fig. 9

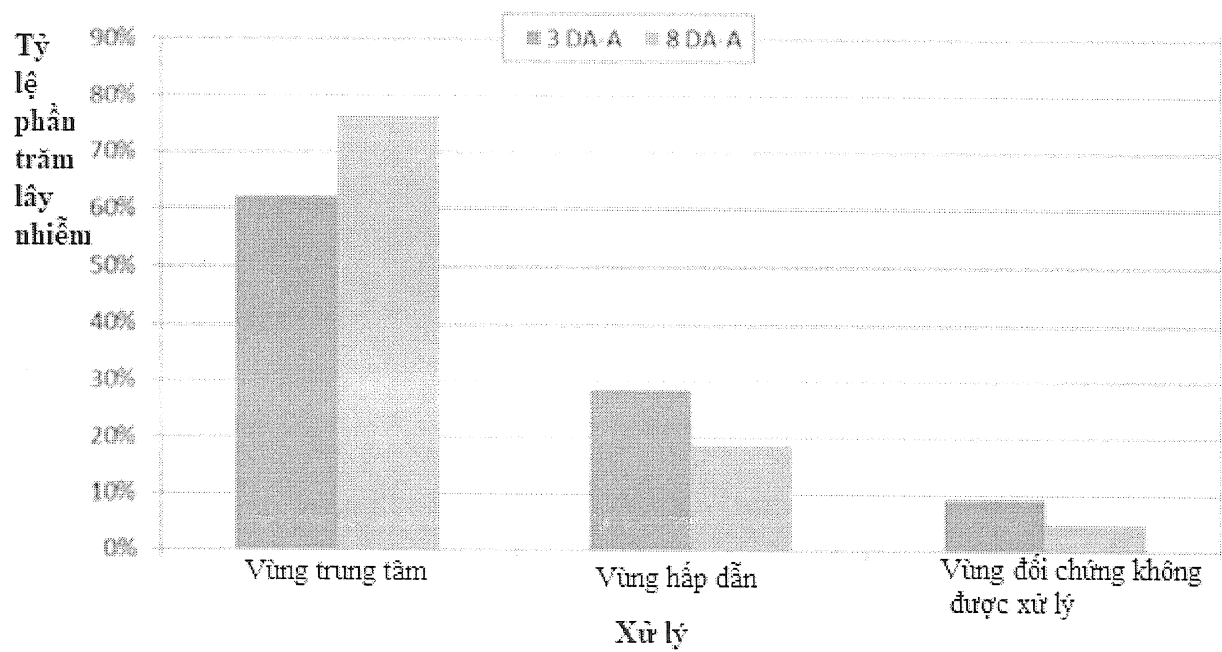


Fig.10