

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201991199** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.11.29

(22) Дата подачи заявки
2017.11.16

(51) Int. Cl. **A01N 63/04** (2006.01)
A01M 17/00 (2006.01)
A01C 1/06 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)

(54) МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ БОРЬБЫ С НЕМАТОДАМИ

(31) **62/422,918**

(32) **2016.11.16**

(33) **US**

(86) **PCT/US2017/062056**

(87) **WO 2018/094075 2018.05.24**

(71) Заявитель:
**ЛОКУС АГРИКАЛЧЕР АйПи
КОМПАНИ, ЭлЭлСи (US)**

(72) Изобретатель:
**Фармер Шон, Зорнер Пол С., Алибек
Кен, Милованович Майя, Мазумдер
Шармистха, Диксон Тайлер, Фотш
Алекс (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении представлены материалы и способ борьбы с вредителями, в частности с нематодами. В изобретении также представлена композиция, содержащая биосурфактанты в качестве пестицидов.

Результаты гибели нематод



A1

201991199

201991199

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-557244ЕА/032

МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ БОРЬБЫ С НЕМАТОДАМИ

Ссылка на родственную заявку

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/422,918, поданной 16 ноября 2016 года, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Для того, чтобы повысить урожаи и защитить сельскохозяйственные культуры от патогенов, вредителей и болезни, фермеры в значительной степени полагаются на использование синтетических химических веществ и химических удобрений; однако при чрезмерном или неправильном применении эти вещества могут попадать в поверхностные воды, вымываться в грунтовые воды и испаряться в воздух. В качестве источников загрязнения воздуха и воды эти вещества подвергают все более тщательному анализу, делая их ответственное использование экологическим и коммерческим императивом. Даже при правильном применении чрезмерная зависимость и долгосрочное использование определенных химических удобрений и пестицидов может вредно изменять экосистему почвы, уменьшать устойчивость к стрессам, увеличивать устойчивость вредителей и мешать росту и жизнеспособности растений и животных.

Нематоды относятся к классу круглых червей или нитчатых червей типа Нематоды. Примерами в этом классе являются цистообразующие нематоды рода *Heterodera* (например, *H. glycines*, *H. avenae* и *H. schachtii*) и *Globodera* (например, *G. rostochiensis* и *G. pallida*), вызывающие тупоконечность корней нематоды рода *Trichodorus*, луковичные и стеблевые нематоды рода *Ditylenchus*, картофельная нематода, *Heterodera rostochiensis*, галловые нематоды рода *Meloidogyne* (например, *M. javanica*, *M. hapla*, *M. arenaria* и *M. incognita*), корневые нематоды рода *Pratylenchus* (например, *P. goodeyi*, *P. penetrans*, *P. bractrvurus*, *P. zaeae*, *P. coffeae*, *P. bractrvurus* и *P. thornei*), цитрусовые нематоды рода *Tylenchulus* и жалящие нематоды рода *Belonolaimus*.

Известно, что нематоды заражают как растения, так и животных. Этих микроскопических червей можно найти почти в каждом типе окружающей среды. Находясь в почве, нематоды питаются корнями растений, вызывая значительное повреждение структуры корней и неправильное развитие растений. Повреждение обычно проявляется в виде роста галлов, корневых узлов и других аномалий. Образование галлов приводит к уменьшению размера корней и неэффективности корневой системы, что, в свою очередь, серьезно влияет на другие части растения. В результате ослабленное растение становится уязвимым для атак других патогенов. Без правильной обработки растение погибает. Каждый год нематоды наносят ущерб в миллионы долларов газонным травам, декоративным растениям и продовольственным сельскохозяйственным культурам.

Галловые нематоды (виды *Meloidogyne*) являются одним из трех наиболее экономически вредных видов паразитирующих на растениях нематод садовых и полевых сельскохозяйственных культур. Галловые нематоды распространены по всему миру и являются облигатными паразитами корней тысяч видов растений, включая однодольные и двудольные, травянистые и древесные растения. Овощные культуры, выращиваемые в теплом климате, могут нести серьезные потери от галловых нематод, и их часто подвергают регулярной обработке химическими нематоцидами. Повреждение галловыми нематодами приводит к плохому росту, снижению качества и урожая сельскохозяйственной культуры и уменьшению устойчивости к другим стрессам (например, засухе, другим болезням). Высокий уровень повреждения может приводить к полной потере урожая. Например, приблизительно 1,5 миллиарда долларов в год теряется только от соевых цистообразующих нематод.

Обычные нематоциды, используемые для борьбы с нематодами, вносят в посевную борозду при посеве. Из-за токсичности по отношению к находящимся поблизости животным, таким как птицы, нанесение сверху жидких токсичных соединений при круговом движении, таких как Nemasur, Temik, Furadan, Dazinat и Мосар, потеряло свою популярность.

С 1960-х годов производители используют бромистый метил для

эффективного обезвреживания полей перед посевом, в основном для борьбы с нематодами, а также для борьбы с болезнями и сорняками; однако, поскольку это токсичное соединение используют в газообразной форме, больше чем половина вводимого в почву количества может в конечном итоге оказаться в атмосфере и способствовать истончению озонового слоя. В 2005 году в развитых странах бромистый метил был запрещен по монреальскому протоколу, который является международным договором, подписанным в 1987 году для защиты стратосферного озонового слоя.

На фоне запрета договор допускает ограниченное использование бромистого метила для клубники, миндаля и других сельскохозяйственных культур, для которых нет альтернативы как для эффективной, так и доступной борьбы с нематодами, болезнями и сорняками. Степень разрешенного использования уменьшается с каждым годом и вероятнее всего скоро закончится. Таким образом, поиск альтернативы бромистому метилу является приоритетом для производителей и регулирующих органов; однако ни один продукт не обеспечивает широкий спектр действия, предлагаемого бромистым метилом.

Создание нормативных предписаний, регулирующих доступность и использование химических веществ, а также потребительский спрос на не содержащие остатков, стабильно выращиваемые пищевые продукты влияют на отрасль и порождают эволюцию мысли о том, как решать множество проблем. Хотя массовая ликвидация химических веществ в настоящее время невозможна, фермеры все больше используют биологические меры в качестве жизнеспособных компонентов программ комплексного управления питательными веществами и комплексной борьбы с вредителями.

Из-за недостатков основных подходов, описанных выше, возрастает потребность в более безопасных пестицидах и альтернативных стратегиях борьбы с вредителями. В частности, в последние годы биологическая борьба с нематодами вызывает большой интерес. В этом методе в качестве пестицидов используют биологические средства, такие как живые микроорганизмы, биопродукты, полученные из этих микроорганизмов, и их комбинации. Эти биологические пестициды обладают важными

преимуществами над другими обычными пестицидами. Например, они менее вредны по сравнению с обычными химическими пестицидами. Они более эффективны и специфичны, и они часто быстро биологически разлагаются, что приводит к меньшему загрязнению окружающей среды.

Использование биопестицидов и других биологических средств было в значительной степени ограничено трудностями производства, транспортировки, применения, ценообразования и эффективности. Например, многие микроорганизмы трудно выращивать, а впоследствии с пользой применять в достаточных количествах в сельскохозяйственных и лесохозяйственных производственных системах. Эта проблема усугубляется потерей жизнеспособности и/или активности из-за обработки, получения готовых форм, хранения, стабилизации перед распределением, спорообразованием вегетативных клеток в качестве средства стабилизации, транспортировки и применения. Кроме того, после применения биологические продукты могут не развиваться по ряду причин, включая, например, недостаточную первоначальную плотность клеток, неспособность эффективно конкурировать с существующей микрофлорой в конкретном месте и попадание в почву и/или другие условия окружающей среды, в которых микроорганизм не может процветать или даже выживать.

Поэтому существует острая необходимость в разработке способов и материалов для получения эффективных биопестицидов для борьбы с нематодами.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

В заявленном изобретении предоставлены композиции и способы борьбы с нематодами. Кроме того, в заявленном изобретении предоставлены способы и композиции для предотвращения повреждения сельскохозяйственных культур нематодами, что приводит к увеличению урожайности. Предпочтительно, в пестицидах согласно заявленному изобретению используют нетоксичные вещества, такие как микроорганизмы и побочные продукты культивирования микроорганизмов.

Согласно одному варианту осуществления в заявленном изобретении предоставлены способы предотвращения повреждения

сельскохозяйственных культур нематодами и борьбы с нематодами, включающие стадии: культивирования микроорганизмов, которые продуцируют побочный продукт выращивания микроорганизмов, и приведение нематод или окружающей их среды в контакт с эффективным количеством микроорганизмов и/или побочным продуктом выращивания микроорганизмов.

Согласно одному варианту осуществления побочным продуктом выращивания микроорганизмов является биосурфактант. Согласно одному варианту осуществления биосурфактант представляет собой гликолипид, такой как рамнолипид, софоролипид (SLP), трегалозный липид или маннозилэритритоловый липид (MEL). Согласно особенно предпочтительным вариантам осуществления биосурфактант представляет собой SLP и/или MEL.

Микробная нематоцидная композиция согласно заявленному изобретению может быть получена посредством процессов культивирования в диапазоне от небольшого до крупномасштабного. Эти процессы культивирования включают, но без ограничения, глубинное культивирование/ферментацию, поверхностное культивирование, твердофазную ферментацию (SSF) и их комбинации. Нематоцидная композиция может представлять собой, например, ферментативный бульон и/или очищенные биосурфактанты.

Согласно некоторым вариантам осуществления продуцирующие биосурфактанты микроорганизмы в композиции можно выращивать на месте и получать биосурфактанты для прямого использования для борьбы с нематодами. Следовательно, можно легко и непрерывно получать высокую концентрацию биосурфактанта и/или продуцирующих биосурфактанты микроорганизмов в месте обработки (например, в почве).

Согласно одному варианту осуществления система согласно заявленному изобретению содержит дополнительный аспект предоставления продуктов на основе микроорганизмов для полевого применения. Продукты на основе микроорганизмов согласно заявленному изобретению можно применять, например, через оросительную систему, в виде спрея, в виде обработки семян, на поверхности почвы, на поверхности растений и/или на поверхности вредителей. Также облегчается механическое применение с помощью

обычных орудий или роботизированное применение с помощью «беспилотников» наземного или воздушного базирования.

Нематоцидную композицию можно использовать для защиты растений, людей или животных путем борьбы с нематодами.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлено снижение подвижности нематод через 3 дня после обработки в разных условиях: SD10 по 0,05% (о/о), 0,125% (о/о), 0,25% (о/о) и 0,5% (о/о), соответственно; SD12 по 0,025% (о/о), 0,05% (о/о), 0,1% (о/о) и 0,2% (о/о), соответственно; Nimitz® по 10 ч/млн аи; и контроль без обработки. SD10 относится к обработке SLP. SD12 относится к обработке MEL.

На фиг. 2 представлен показатель гибели нематод через 3 дня после обработки в разных условиях: SD10 по 0,05% (о/о), 0,125% (о/о), 0,25% (о/о) и 0,5% (о/о), соответственно; SD12 по 0,025% (о/о), 0,05% (о/о), 0,1% (о/о) и 0,2% (о/о), соответственно; Nimitz® по 10 ч/млн аи; и контроль без обработки.

На фиг. 3 представлено количество живых нематод через 3, 14 и 23 дня после разных обработок почвы в тестах в сосудах в фитопатологической лаборатории: SD10 по 0,25% (о/о) и 0,5% (о/о); SD12 по 0,1% (о/о) и 0,2% (о/о); SD10 (0,25% о/о)+SD12 (0,1% о/о); Nimitz® по 10 ч/млн пр; и контроль без обработки.

На фиг. 4 представлен контроль живых нематод (т.е. Гибель нематод) через 3, 14 и 23 дня после разных обработок почвы в тестах в сосудах в фитопатологической лаборатории: SD10 по 0,25% (о/о) и 0,5% (о/о); SD12 по 0,1% (о/о) и 0,2% (о/о); SD10 (0,25% о/о)+SD12 (0,1% о/о); Nimitz® по 10 ч/млн пр; и контроль без обработки.

На фиг. 5 представлено количество неподвижных нематод через 3, 14 и 23 дня после разных обработок почвы в тестах в сосудах в фитопатологической лаборатории: SD10 по 0,25% (о/о) и 0,5% (о/о); SD12 по 0,1% (о/о) и 0,2% (о/о); SD10 (0,25% о/о)+SD12 (0,1% о/о); Nimitz® по 10 ч/млн пр; и контроль без обработки.

На фиг. 6 представлено количество неподвижных живых нематод через 3, 14 и 23 дня после разных обработок почвы в тестах в сосудах в фитопатологической лаборатории: SD10 по 0,25% (о/о) и

0,5% (о/о); SD12 по 0,1% (о/о) и 0,2% (о/о); SD10 (0,25% о/о)+SD12 (0,1% о/о); Nimitz® по 10 ч/млн пр; и контроль без обработки.

На фиг. 7 представлен показатель образования галлов при уборке для микроделянки огурцов, обработанных 5 разными видами обработки: контроль без обработки; Nimitz® по 5 pt/a; SD12 0,2% (аи/о) единственная обработка; SD12 0,2% (аи/о) двойная обработка; SD12 0,2% (аи/о) тройная обработка.

На фиг. 8 представлено количество нематод при уборке для микроделянки огурцов, обработанных 5 разными видами обработки: контроль без обработки; Nimitz® по 5 pt/a; SD12 0,2% (аи/о) единственная обработка; SD12 0,2% (аи/о) двойная обработка; SD12 0,2% (аи/о) тройная обработка.

На фиг. 9 представлена организация делянки для оценки эффективности приманки нематод, включая местоположения зоны заражения нематодами и зоны применения приманки.

На фиг. 10 представлено заражение в процентах (от общей популяции нематод на делянке) в трех разных местах на делянках для оценки приманки нематод. «Центр» относится к центру зоны заражения, «приманка» относится к зоне приманки, а «без обработки» относится ко всем другим зонам делянки.

Подробное раскрытие

В заявленном изобретении предоставлены материалы и способы борьбы с нематодами. В заявленном изобретении также предоставлена композиция, которую можно использовать в качестве пестицидов для борьбы с нематодами. В заявленном изобретении дополнительно предоставлены способы получения таких композиций. Кроме того, в заявленном изобретении предоставлены способы и композиции для предотвращения повреждения сельскохозяйственных культур нематодами, что приводит в результате к увеличению урожая.

Продукты на основе микроорганизмов согласно заявленному изобретению можно использовать в области, в том числе, но без ограничения, сельскохозяйственных культур, домашнего скота, лесного хозяйства, управления газонами, пастбищ и здоровья людей

и животных.

Согласно одному варианту осуществления композиция для борьбы с нематодами согласно заявленному изобретению содержит эффективное количество продуцируемого микроорганизмами биосурфактанта и/или микроорганизмы, продуцирующие такой биосурфактант.

Согласно одному варианту осуществления способ борьбы с нематодами включает стадии получения продуцируемого микроорганизмами биосурфактанта и нанесения эффективного количества продуцируемого микроорганизмами биосурфактанта на нематоды или в место их нахождения.

Композиция согласно заявленному изобретению может быть получена, например, с помощью методов культивирования в диапазоне от небольшого до крупномасштабного. Эти методы культивирования включают, но без ограничения, глубинное культивирование/ферментацию, поверхностное культивирование, твердофазную ферментацию (SSF) и их комбинацию.

Продукт ферментации, содержащий продуцируемый микроорганизмами биосурфактант, можно использовать непосредственно для обработок против нематод без экстракции или очистки. При необходимости экстракция и очистка биосурфактантов может быть выполнена, как описано в настоящем документе. Предпочтительно, в способе культивирования согласно изобретению можно получать высокую концентрацию микроорганизмов и высокую концентрацию биосурфактанта.

Согласно определенным вариантам осуществления способы и композиции согласно заявленному изобретению уменьшают повреждение, вызываемое нематодами, по сравнению с необработанным растением, приблизительно на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 70%, 80% или 90% или более.

Согласно одному варианту осуществления в заявленном изобретении предоставлен способ увеличения урожаев сельскохозяйственных культур или растений. Согласно определенным вариантам осуществления способы и композиции согласно заявленному изобретению увеличивают урожай сельскохозяйственной культуры приблизительно на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 70%,

80% или 90% или более по сравнению с необработанным растением.

Согласно одному варианту осуществления способы согласно заявленному изобретению уменьшают количество яиц нематод в корнях растения приблизительно на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 70%, 80% или 90% или более по сравнению с необработанным растением.

Согласно другому варианту осуществления в заявленном изобретении предоставлен способ увеличения массы или размера растения относительно необработанного растения.

Выбранные Определения

В рамках настоящего изобретения термин «борьба», используемый в отношении активности, получаемой биосурфактантами или продуцирующими биосурфактанты микроорганизмами, распространяется на действие уничтожения, обезвреживания или иммобилизации вредителей или иным образом делающий вредителей по существу неспособными причинить вред.

В рамках настоящего изобретения «нематоцидный» означает обладающий способностью борьбы с нематодами. Таким образом, например, уничтожение нематод, уменьшение их подвижности и уменьшение количества яиц – все это примеры нематоцидной активности.

В рамках настоящего изобретения ссылка на «микробную композицию» означает композицию, которая содержит компоненты, которые были получены в результате выращивания микроорганизмов или других клеточных культур. Таким образом, микробная композиция может содержать сами микроорганизмы и/или побочные продукты выращивания микроорганизмов. Микроорганизмы могут быть в вегетативном состоянии, в форме спор, в форме мицелия, в любой другой форме пропагул или их смесей. Микроорганизмы могут быть в форме планктона или биопленки или смеси и того и другого. Побочными продуктами роста могут быть, например, метаболиты, компоненты клеточной мембраны, экспрессированные белки и/или другие клеточные компоненты. Микроорганизмы могут быть целыми или лизированными. Согласно предпочтительным вариантам осуществления микроорганизмы присутствуют в микробной композиции вместе с бульоном, в котором они были выращены. Клетки могут

присутствовать, например, в концентрации 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} или 1×10^{11} или более пропагул на миллилитр композиции. В рамках настоящего изобретения пропaгула представляет собой любую часть микроорганизма, из которой может развиться новый и/или зрелый организм, включая, но без ограничения, клетки, споры, мицелий, почки и семена.

В заявленном изобретении дополнительно предоставлены «продукты на основе микроорганизмов», которые представляют собой продукты, которые необходимо применять на практике для получения требуемого результата. Продуктом на основе микроорганизмов может быть просто микробная композиция, собираемая в процессе культивирования микроорганизмов. Альтернативно, продукт на основе микроорганизмов может содержать дополнительные добавленные ингредиенты. Эти дополнительные ингредиенты могут включать, например, стабилизаторы, буферы, подходящие носители, такие как вода, растворы солей или любой другой подходящий носитель, добавленные питательные вещества для поддержки дальнейшего роста микроорганизмов, усилители роста, не являющиеся питательными веществами, такие как растительные гормоны и/или средства, которые облегчают отслеживание микроорганизмов и/или композиций в среде, в которой они применяются. Продукт на основе микроорганизмов также может содержать смеси микробных композиций. Продукт на основе микроорганизмов также может содержать один или более компонентов микробной композиции, которые были обработаны каким-либо образом, таким как, но без ограничения, фильтрация, центрифугирование, лизирование, сушка, очистка и тому подобное.

Микроорганизмы

Микробные биосурфактанты представляют собой соединения, продуцируемые различными микроорганизмами, такими как бактерии, грибы и дрожжи.

Согласно одному варианту осуществления микроорганизмы представляют собой бактерии, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии. Эти бактерии могут включать, но без ограничения, например, *Escherichia coli*, *Rhizobium* (например,

Rhizobium japonicum, *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium fredii*, *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* и *Rhizobium etli*), *Bradyrhizobium* (например, *B. japonicum*, и *B. parasponia*), *Bacillus* (например, *B. subtilis*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. pumillus*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* и *B. amyloliquifaciens*), *Azobacter* (например, *A. vinelandii* и *A. chroococcum*), *Arthrobacter* (например, *A. pascens*), *Agrobacterium* (например, *A. radiobacter*), *Pseudomonas* (например, *P. chlororaphis* подвид *aureofaciens* (Kluyver), *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. fragi* и *P. syringae*), виды *Flavobacterium*; *Azospirillum* (например, *A. brasiliensis*), *Azomonas*, *Derxia*, *Beijerinckia*, *Nocardia*, *Klebsiella*, *Clavibacter* (например, *C. xyli* подвиды *xyli* и *C. xyli* подвид *cynodontis*), *Cyanobacteria*, *Pantoea* (например, *P. agglomerans*), *Sphingomonas* (например, *S. paucimobilis*), *Streptomyces* (например, *S. griseochromogenes*, *S. griseus*, *S. cacaoi*, *S. aureus* и *S. kasugaensis*), *Streptoverticillium* (например, *S. rimofaciens*), *Ralstonia* (например, *R. eulophi*), *Rhodospirillum* (например, *R. rubrum*), *Xanthomonas* (например, *X. campestris*), *Erwinia* (например, *E. carotovora*), *Clostridium* (например, *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. acetobutyricum*, *C. beijerinckii*, *C. bravidaciens* и *C. malacosomae*), *Rhodococcus*, *Campylobacter*, *Corynebacterium* и их комбинации.

Согласно другому варианту осуществления микроорганизм представляет собой дрожжи. Ряд видов дрожжей являются подходящими для продуцирования согласно настоящему изобретению, включая, но без ограничения, *Saccharomyces* (например, *S. cerevisiae*, *S. boulardii* sequela и *S. torula*), *Debaromyces*, *Issalchenkia*, *Candida* (*C. albicans*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. lipolytica* и *C. torulopsis*), *Kluyveromyces* (например, *K. lactis*, *K. fragilis*), *Pichia* (например, *Pichia pastoris*), *Wickerhamomyces*, *Starmerella* (например, *Starmerella bombicola*) и/или их комбинации.

Согласно одному варианту осуществления дрожжи представляют собой дрожжи-киллеры. В рамках настоящего изобретения «дрожжи-киллеры» означает штамм дрожжей, отличающийся секрецией

токсичных белков или гликопротеинов, для которых сам штамм является иммунным. Экзотоксины, выделяемые дрожжами-киллерами, способны уничтожать другие штаммы дрожжей, грибов или бактерий. Например, микроорганизмы, которые можно регулировать с помощью дрожжей-киллеров, включают *Fusarium* и другие нитчатые грибы. Примерами дрожжей-киллеров согласно настоящему изобретению являются дрожжи-киллеры, которые можно безопасно использовать в пищевой промышленности и в ферментации, например, при производстве пива, вина и хлеба; дрожжи-киллеры, которые можно использовать для борьбы с другими микроорганизмами, которые могут загрязнять такие производственные процессы; дрожжи-киллеры, которые можно использовать для биоконтроля за сохранностью пищевых продуктов; дрожжи-киллеры, которые можно использовать для лечения грибковых инфекций у людей и растений; и дрожжи-киллеры, которые можно использовать в технологии рекомбинантных ДНК. Такие дрожжи могут включать, но без ограничения, *Wickerhamomyces*, *Pichia* (например, *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia kudrizvzevii*) *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, такие как *Hanseniaspora uvarum*, *Ustilago maydis*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Torulopsis*, *Ustilago*, *Williopsis*, *Zygosaccharomyces*, такие как *Zygosaccharomyces bailii* и другие.

Согласно одному варианту осуществления микроорганизмы представляют собой грибы, включая, но без ограничения, *Mycorrhiza* (например, везикулярно-арбускулярную микоризу (VAM), арбускулярную микоризу (AM)), *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea*, *Thraustochytrium*, *Penicillium*, *Phythium*, *Entomophthora*, *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium venenatum*, *Aspergillus*, *Trichoderma* (например, *T. reesei*, *T. harzianum*, *T. viride* и *T. hamatum*), *Rhizopus* spp, эндофитные грибы (например, *Piriformis indica*) и их комбинации.

Согласно дополнительному варианту осуществления микроорганизмы представляют собой микоризные грибы, такие как виды *Glomus* и виды *Acaulospora*. Согласно одному варианту осуществления микроорганизмы представляют собой арбускулярные микоризные грибы (AMF).

Согласно конкретным вариантам осуществления микроорганизмами для продуцирования SLP могут быть вид *Candida*, вид *Starmerella*, вид *Cryptococcus*, *Cyberlindnera samutprakarnensis* JP52 (T), вид *Pichia*, вид *Rhodotorula* или вид *Wickerhamiella*.

Согласно дополнительным конкретным вариантам осуществления микроорганизмами для продуцирования MEL могут быть вид *Pseudozyma*, вид *Candida*, вид *Ustilago*, вид *Schizonella*, вид или *Kurtzmanomyces*.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления микроорганизмами являются дрожжи. Согласно конкретным вариантам осуществления дрожжи представляют собой *Starmerella*, *Pichia* и/или *Pseudozyma*. Конкретно в настоящем документе в виде примера приведены *Starmerella bombicola*, *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*) и *Pseudozyma aphidis*.

Биосурфактанты

Биосурфактанты образуют важный класс вторичных метаболитов, которые встречаются во многих микроорганизмах. Биосурфактанты являются биоразлагаемыми, и их можно легко и дешево получать с использованием выбранных организмов на возобновляемых субстратах. Большинство продуцирующих биосурфактанты организмов продуцируют биосурфактанты в ответ на присутствие в питательных средах источника углеводов (например, масел, сахара, глицерина и т.д.). Другие компоненты среды также могут значительно влиять на выработку биосурфактантов. Например, выработка рамнолипидов бактериями *Pseudomonas aeruginosa* может быть увеличена, если вместо аммония в качестве источника азота использовать нитрат. Также на выработку рамнолипида в значительной степени может влиять концентрация железа, магния, натрия и калия; соотношение углерод:фосфор; и взбалтывание.

Биосурфактанты включают низкомолекулярные гликолипиды (GL), липопептиды (LPs), флаволипиды (FLs), фосфолипиды и высокомолекулярные полимеры, такие как липопротейны, комплексы липополисахарид-белок и комплексы полисахарид-белок-жирная кислота. Обычным липофильным фрагментом молекулы биосурфактанта является углеводородная цепь жирной кислоты, тогда как

гидрофильная часть образована сложноэфирными или спиртовыми группами нейтральных липидов, карбоксилатной группой жирных кислот или аминокислот (или пептидов), органической кислотой в случае флаволипидов или в случае гликолипидов углеводами.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения биосурфактант способен проникать через ткани вредителей и эффективен в меньших количествах без использования адъювантов. Было обнаружено, что при концентрациях выше критической концентрации мицелл биосурфактанты способны более эффективно проникать в обработанные объекты.

Разработка природных биопестицидов согласно заявленному изобретению, которые могут быть получены в больших количествах, представляет собой значительный прогресс в данной области. В качестве биоконтролирующих агентов для борьбы с вредителями можно использовать либо продуцирующие биосурфактанты организмы, либо сами биосурфактанты. Кроме того, борьбу с вредителями можно осуществлять путем использования специфических субстратов для поддержки роста продуцирующих биосурфактант организмов, а также для производства пестицидных средств в виде биосурфактантов. Преимущественно, природные биосурфактанты способны ингибировать рост конкурирующих организмов и усиливать рост специфических продуцирующих биосурфактант организмов.

Кроме того, эти биосурфактанты могут играть важную роль в лечении заболеваний животных и человека. Животных можно лечить, например, погружением или купанием в растворе биосурфактанта отдельно, с микробной клеточной массой или без нее и/или в присутствии других соединений, таких как медь или цинк.

Способы Культивирования Микроорганизмов

В заявленном изобретении предоставлены способы культивирования микроорганизмов и производства биосурфактантов и/или других побочных продуктов выращивания микроорганизмов. Эти способы культивирования включают, но без ограничения, глубинное культивирование/ферментацию, поверхностное культивирование, твердофазную ферментацию (SSF) и их комбинацию.

В системах культивирования микроорганизмов обычно используют глубинную ферментацию культуры; однако также можно

использовать поверхностное культивирование и гибридные системы. В рамках настоящего изобретения «ферментация» относится к росту клеток, спор, мицелия и/или других пропaгул микроорганизмов в регулируемых условиях. Рост может быть аэробным или анаэробным.

Сосудом для выращивания микроорганизмов, используемых согласно заявленному изобретению, может быть любой ферментер или биореактор для промышленного использования. Процесс культивирования проходит в сосуде, который может быть, например, коническим или трубчатым. Согласно одному варианту осуществления сосуд необязательно может иметь функциональные элементы управления/датчики или может быть соединен с функциональными элементами управления/датчиками для измерения важных факторов в процессе культивирования, таких как pH, кислород, давление, температура, мощность на валу мешалки, влажность, вязкость и/или плотность микроорганизмов и/или концентрация метаболитов.

Согласно дополнительному варианту осуществления сосуд также может быть способен контролировать рост микроорганизмов внутри сосуда (например, измерение количества клеток и фаз роста). Альтернативно, из сосуда ежедневно можно брать пробу и подвергать обсчету с помощью известных в данной области методик, таких как методика посева разведением. Посев методом разведения – это простая методика, используемая для оценки количества бактерий в пробе. Методика также может обеспечить индекс, по которому можно сравнивать разные окружающие условия или обработки.

Согласно одному варианту осуществления способ включает дополнение культивирования источником азота. Источником азота может быть, например, нитрат калия, нитрат аммония, сульфат аммония, фосфат аммония, аммиак, мочеви́на и/или хлорид аммония. Эти источники азота можно использовать независимо или в комбинации двух или более.

Способ может обеспечить оксигенацию для растущей культуры. В одном варианте осуществления используется медленное движение воздуха для удаления воздуха с низким содержанием кислорода и введения насыщенного кислородом воздуха. Насыщенный кислородом воздух может быть окружающим воздухом, ежедневно пополняемым

через механизмы, включающие в себя рабочие колеса для механического перемешивания жидкости и воздушные распылители для подачи пузырьков газа в жидкость для растворения кислорода в жидкости.

Способ может дополнительно включать дополнение культивирования источником углерода. Источником углерода обычно является углевод, такой как глюкоза, сахароза, лактоза, фруктоза, трегалоза, манноза, маннит и/или мальтоза; органические кислоты, такие как уксусная кислота, фумаровая кислота, лимонная кислота, пропионовая кислота, яблочная кислота, малоновая кислота и/или пировиноградная кислота; спирты, такие как этанол, пропанол, бутанол, пентанол, гексанол, изобутанол и/или глицерин; жиры и масла, такие как соевое масло, масло канолы, кокосовое масло, масло рисовых отрубей, оливковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и/или льняное масло; и т.п. Эти источники углерода можно использовать независимо или в комбинации двух или более.

Согласно одному варианту осуществления в среду включены факторы роста и микроэлементы для микроорганизмов. Это особенно предпочтительно при выращивании микроорганизмов, которые не способны вырабатывать все необходимые им витамины. Также в среду можно включить неорганические питательные вещества, включая микроэлементы, такие как железо, цинк, медь, марганец, молибден и/или кобальт.

Согласно одному варианту осуществления также можно включить неорганические соли. Пригодными неорганическими солями могут быть дигидрофосфат калия, гидрофосфат дикалия, гидрофосфат динатрия, сульфат магния, хлорид магния, сульфат железа, хлорид железа, сульфат марганца, хлорид марганца, сульфат цинка, хлорид свинца, сульфат меди, хлорид кальция, карбонат кальция, и/или карбонат натрия. Эти неорганические соли можно использовать независимо или в комбинации двух или более.

Согласно некоторым вариантам осуществления способ культивирования может дополнительно включать добавление в жидкую среду дополнительных кислот и/или противомикробных препаратов до и/или во время процесса культивирования. Для защиты культуры от

заражения используют антимикробные средства или антибиотики. Кроме того, также можно добавить противопенные средства для предотвращения образования и/или накопления пены, когда во время культивирования образуется газ.

pH смеси должен соответствовать интересующему микроорганизму. Для стабилизации pH вблизи предпочтительного значения можно использовать буферы и регуляторы pH, такие как карбонаты и фосфаты. Когда ионы металлов присутствуют в высоких концентрациях, может потребоваться использование хелатирующего агента в жидкой среде.

Способ и оборудование для культивирования микроорганизмов и получения побочных продуктов микроорганизмов могут быть выполнены в виде периодического, квазинепрерывного или непрерывного процессов.

Микроорганизмы можно выращивать в виде планктона или в виде биопленки. В случае биопленки в сосуде может быть субстрат, на котором можно выращивать микроорганизмы в состоянии биопленки. Система также может иметь, например, способность применять стимулы (такие как напряжение сдвига), которые стимулируют и/или улучшают характеристики роста биопленки.

Согласно одному варианту осуществления способ культивирования микроорганизмов осуществляют от приблизительно 5° до приблизительно 100°C, предпочтительно от 15 до 60°C, более предпочтительно от 25 до 50°C. Согласно дополнительному варианту осуществления культивирование можно проводить непрерывно при постоянной температуре. Согласно другому варианту осуществления культивирование можно подвергать изменению температуры.

Согласно одному варианту осуществления оборудование, используемое в способе и процесс культивирования, является стерильным. Оборудование для культивирования, такое как реактор/сосуд, может быть отделено от стерилизационного устройства, например, от автоклава, но подключено к нему. Оборудование для культивирования также может иметь стерилизационный блок, который стерилизует на месте перед началом посева. Воздух можно стерилизовать известными в данной

области способами. Например, прежде чем попасть в сосуд окружающий воздух может проходить по меньшей мере через один фильтр. Согласно другим вариантам осуществления среда может быть пастеризована или, необязательно, вообще не нагреваться, где для управления ростом бактерий можно задействовать использование воды с низкой активностью и низким pH.

Содержание биомассы в питательном бульоне может составлять, например, от 5 до 180 г/л или более. Согласно одному варианту осуществления содержание твердых веществ в бульоне составляет от 10 до 150 г/л.

Согласно одному варианту осуществления способ получения микробного метаболита согласно заявленному изобретению включает стадии: 1) смешивания гидрофобных и гидрофильных частиц с образованием твердого вещества, образующего матрицу; 2) введения указанного твердого вещества, образующего матрицу, в контакт со средой, засеянной интересующим микроорганизмом, тем самым создавая матрицу микрореакторов; и 3) выращивания указанного микроорганизма в указанных микрореакторах.

Побочный продукт роста микроорганизмов, продуцируемый интересующими микроорганизмами, может удерживаться в микроорганизмах или секретироваться в жидкую среду. Согласно другому варианту осуществления способ получения побочного продукта выращивания микроорганизмов может дополнительно включать стадии концентрирования и очистки побочного продукта выращивания представляющих интерес микроорганизмов. Согласно дополнительному варианту осуществления жидкая среда может содержать соединения, которые стабилизируют активность побочного продукта выращивания микроорганизмов.

Согласно одному варианту осуществления всю композицию для культивирования микроорганизмов удаляют после завершения культивирования (например, после, например, достижения желаемой плотности клеток или плотности указанного метаболита в бульоне). В этой методике по партиям после сбора первой партии начинается совершенно новая партия.

Согласно другому варианту осуществления одновременно удаляют только часть продукта ферментации. Согласно этому

варианту осуществления биомасса с жизнеспособными клетками остается в сосуде в качестве инокулянта для новой партии культивирования. Композиция, которая удаляется, может представлять собой бесклеточный бульон или содержать клетки. Таким образом, создается квазинепрерывная система.

Согласно одному варианту осуществления микроорганизмы культивируют в пределах 100, 50, 25, 10, 5, 1 или менее миль от места, где будет использоваться продукт на основе микроорганизмов.

Получение продуктов на основе микроорганизмов

Одним из продуктов на основе микроорганизмов согласно заявленному изобретению является просто ферментативный бульон, содержащий микроорганизмы и/или метаболиты микроорганизмов (такие как биосурфактанты), продуцируемые микроорганизмами, и/или любые остаточные питательные вещества. Продукт ферментации можно использовать непосредственно без экстракции, выделения или очистки. При необходимости экстракцию, выделение и/или очистку можно легко проводить с использованием стандартных способов или методик, описанных в настоящем документе и/или в литературе.

Микроорганизмы в продукте на основе микроорганизмов могут быть в активной или неактивной форме, в форме клеток, в форме спор и/или в форме мицелия. Продукты на основе микроорганизмов можно использовать без дальнейшей стабилизации, консервации и хранения. Преимущественно, при прямом использовании этих продуктов на основе микроорганизмов сохраняется высокая жизнеспособность микроорганизмов, уменьшается возможность заражения инородными средствами и нежелательными микроорганизмами и сохраняется активность побочных продуктов выращивания микроорганизмов.

Микроорганизмы и/или бульон (включая отдельные слои или фракции), получающиеся в результате выращивания микроорганизмов, можно удалить из ростового сосуда и перенести, например, посредством трубки для немедленного использования.

Согласно другим вариантам осуществления композицию (микроорганизмы, бульон или микроорганизмы и бульон) можно поместить в контейнеры подходящего размера, учитывая, например,

предполагаемое использование, предполагаемый способ применения, размер резервуара для ферментации и любой способ транспортировки из установки выращивания микроорганизмов в место использования. Таким образом, контейнеры, в которые помещают микробную композицию, могут составлять, например, от 1 галлона до 1000 галлонов или более. Согласно другим вариантам осуществления контейнеры составляют 2 галлона, 5 галлонов, 25 галлонов или более.

В рамках настоящего изобретения «бульон» включает в себя весь бульон или фракции всего бульона.

После сбора микробной композиции из ростовых сосудов можно добавить дополнительные компоненты, когда собранный продукт помещают в контейнеры и/или доставляют по трубам (или иным образом транспортируют для использования). Добавки могут представлять собой, например, буферы, носители, другие микробные композиции, полученные в той же самой или иной установке, модификаторы вязкости, консерванты, модификаторы pH, питательные вещества для выращивания микроорганизмов, питательные вещества для выращивания растений, средства отслеживания, пестициды, гербициды, корма для животных, пищевые продукты и другие ингредиенты, специально предназначенные для использования по назначению.

Предпочтительно, в соответствии с заявленным изобретением продукт на основе микроорганизмов может содержать бульон, в котором выращивали микроорганизмы. Продукт может составлять, например, по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% или 100% по массе бульона. Массовое количество биомассы в продукте может составлять, например, приблизительно от 0% до 100%, включая все процентные значения между ними.

Необязательно, продукт можно хранить до использования. Время хранения предпочтительно короткое. Таким образом, время хранения может составлять менее чем 60 дней, 45 дней, 30 дней, 20 дней, 15 дней, 10 дней, 7 дней, 5 дней, 3 дня, 2 дня, 1 день или 12 часов. Согласно предпочтительному варианту осуществления, если в продукте присутствуют живые клетки, продукт хранят при

холодной температуре, такой как, например, менее чем 20°C, 15°C, 10°C или 5°C. С другой стороны, композицию биосурфактанта обычно можно хранить в течение более длительных периодов времени и при температуре окружающей среды.

Согласно одному варианту осуществления продукты культивирования можно получать в виде продукта биомассы, высушенного распылением. Биомассу можно отделять с помощью известных способов, таких как центрифугирование, фильтрация, сепарация, декантация, комбинация сепарации и декантации, ультрафильтрация или микрофильтрация. Продукт биомассы можно отделить от культуральной среды и высушить распылением.

Готовые формы продуктов на основе микроорганизмов можно получить множеством способов, в том числе жидкие, твердые, гранулированные, пылевидные продукты или продукты замедленного высвобождения с помощью средств, которые будут понятны специалистам в области, имеющей приоритет для настоящего изобретения.

Готовые формы для применения на людях или животных можно получать в виде жидкости, пасты, мази, суппозитория, капсулы или таблетки и использовать аналогично лекарственным средствам, используемым в отрасли медицинских лекарственных средств. Готовые формы можно инкапсулировать с использованием компонентов, известных в фармацевтической отрасли. Инкапсуляция защищает компоненты от нежелательных реакций и помогает ингредиентам противостоять неблагоприятным условиям окружающей среды или обрабатываемого объекта или организма, например желудка.

Твердые готовые формы согласно изобретению могут иметь разные виды и формы, такие как цилиндры, палочки, блоки, капсулы, таблетки, брикеты, пеллеты, стрипсы, спайки и т.д. Твердые готовые формы также могут быть молотыми, гранулированными или порошкообразными. Гранулированный или порошкообразный материал может быть спрессован в таблетки или использоваться для заполнения заранее изготовленных желатиновых капсул или оболочек. Полутвердые готовые формы можно получать в

виде пастообразных, восковых, гелеобразных или кремообразных препаратов.

На твердые или полутвердые композиции согласно изобретению может быть нанесено покрытие с использованием покрывающих пленкой соединений, используемых в фармацевтической отрасли, таких как полиэтиленгликоль, желатин, сорбитол, камедь, сахар или поливиниловый спирт. Это особенно важно для таблеток или капсул, используемых в готовых формах пестицидов. Покрытие пленкой может защитить обрабатываемого от прямого контакта с активным ингредиентом в готовых формах. Кроме того, горчашее средство, такое как денатоний бензоат или квассин также может быть включено в пестицидные готовые формы, покрытие или и то и другое.

Композиции согласно изобретению также могут быть получены в виде порошковых готовых форм и заполнены в предварительно изготовленные желатиновые капсулы.

Концентрации ингредиентов в готовых формах и норму применения композиций можно широко варьировать в зависимости от вредителя, растения или обрабатываемой площади, или способа применения.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления композиция для борьбы с нематодами согласно заявленному изобретению содержит эффективное количество продуцируемого микроорганизмами биосурфактанта.

Согласно одному варианту осуществления продуцируемый микроорганизмами биосурфактант представляет собой гликолипид, такой как рамнолипид, софоролипиды (SLP), трегалозный липид и/или маннозилэритритоловый липид (MEL).

Согласно одному варианту осуществления композиция для борьбы с нематодами согласно заявленному изобретению содержит эффективное количество единственного продуцируемого микроорганизмами биосурфактанта и/или единственного микроорганизма, продуцирующего биосурфактант. Согласно другому варианту осуществления композиция для борьбы с нематодами может содержать смесь микробных биосурфактантов и/или смесь микроорганизмов, продуцирующих эти биосурфактанты.

Согласно одному варианту осуществления композиция для борьбы с нематодами содержит SLP. SLP может быть в очищенной форме или в смеси продуктов ферментации. Композиция предпочтительно содержит активные компоненты, такие как SLP, в концентрации 0,01-90 по массовым % (мас.%), предпочтительно 0,1-50 мас.% и более предпочтительно 0,1-20 мас.%. Согласно другому варианту осуществления очищенный SLP может быть в комбинации с принятым носителем, в которой SLP может присутствовать в концентрациях 0,001-50% (о/о), предпочтительно 0,01-20% (о/о), более предпочтительно 0,02-5% (о/о).

Согласно одному варианту осуществления композиция для борьбы с нематодами содержит MEL. MEL может быть в очищенной форме или в смеси продуктов ферментации. Композиция предпочтительно содержит активные компоненты, такие как MEL, в концентрациях 0,01-90 по массовым % (мас.%), предпочтительно 0,1-50 мас.% и более предпочтительно 0,1-20 мас.%. Согласно другому варианту осуществления очищенный MEL может быть в комбинации с принятым носителем, в которой SLP может присутствовать в концентрациях 0,0001-50% (о/о), предпочтительно 0,005-20% (о/о), более предпочтительно 0,001-5% (о/о).

Согласно другому варианту осуществления композиция для борьбы с нематодами содержит смесь SLP и MEL. SLP и MEL могут быть смешаны в любом соотношении при условии, что композиция содержит активные компоненты, комбинацию SLP и MEL, в концентрации 0,01-90 по массовым % (мас.%), предпочтительно 0,1-50 мас.%, и более предпочтительно 0,1-20 мас.%. Согласно другому варианту осуществления очищенные SLP и MEL могут быть в комбинации с принятым носителем, в которой SLP может присутствовать в концентрациях 0,0001-50% (о/о), предпочтительно 0,005-20% (о/о), более предпочтительно 0,001-5% (о/о).

Согласно дополнительному варианту осуществления композиция содержит SLP и/или MEL в комбинации со штаммом микроорганизма, продуцирующего SLP и/или MEL, таким как, например, виды *Starmerella*, *Wickerhamomyces anomalus* или *Pseudozyma*.

Биосурфактанты можно использовать либо отдельно или в комбинации с другими приемлемыми активными или неактивными

компонентами. Этими компонентами могут быть, например, масляный компонент, такой как коричное масло, гвоздичное масло, хлопковое масло, чесночное масло или розмариновое масло; другое натуральное поверхностно-активное вещество, такое как Yucca или *Quillaja saponins*; или компонентом может быть альдегид, такой как коричный альдегид. Другие масла, которые можно использовать в качестве пестицидного компонента или адъювантов, включают: миндальное масло, камфорное масло, масло канола, касторовое масло, кедровое масло, цитронелловое масло, цитрусовое масло, кокосовое масло, кукурузное масло, эвкалиптовое масло, рыбий жир, гераниевое масло, лецитин, лемонграссовое масло, льняное масло, минеральное масло, мятное масло или масло перечной мяты, оливковое масло, сосновое масло, рапсовое масло, подсолнечное масло, шалфейные масла, кунжутное масло, апельсиновое масло, тимьяновое масло, растительное масло и винтергреновое масло.

Другими приемлемыми компонентами могут быть, например, приманивающие нематоды вещества, такие как растворимые и газообразные вещества, продуцируемые корнями растений хозяев, или присутствующими в ризосфере микроорганизмами. Одним примером приманки для нематод согласно заявленному изобретению является корень валерианы (*Valeriana officianalis*). В частности, растворы, содержащие экстракт корня валерианы, а также любое другое соединение или побочный продукт, связанный с корнями растения валерианы, можно использовать в качестве приманки согласно заявленной композиции и способам.

Другие подходящие добавки, которые могут содержаться в готовых формах согласно изобретению, включают вещества, которые обычно используют для таких препаратов. Примеры таких добавок включают адъюванты, поверхностно-активные вещества, эмульгирующие средства, питательные вещества для растений, наполнители, пластификаторы, смазочные вещества, способствующие скольжению вещества, красители, пигменты, горчащие средства, буферные средства, регулирующие растворимость средства, регулирующие pH средства, консерванты, стабилизаторы и стойкие к ультрафиолетовому свету средства. Также могут быть включены повышающие твердость или отверждающие средства, чтобы упрочить

готовые формы и сделать их достаточно крепкими, чтобы противостоять давлению или силе в некоторых вариантах применения, таких как таблетки для введения в почву, в верхнюю часть корневого клубка или в дерево.

Согласно одному варианту осуществления композиция может дополнительно содержать буферные средства, включая органические и аминокислоты или их соли. Подходящие буферы включают цитрат, глюконат, тартрат, малат, ацетат, лактат, оксалат, аспартат, малонат, глюкогептонат, пируват, галактарат, глюкарат, тартронат, глутамат, глицин, лизин, глутамин, метионин, цистеин, аргинин и их смеси. Также можно использовать фосфорную и фосфористую кислоты или их соли. Синтетические буферы пригодны для использования, но предпочтительно использовать природные буферы, такие как органические и аминокислоты или их соли перечисленные выше.

Согласно дополнительному варианту осуществления средства регулирования pH включают гидроксид калия, гидроксид аммония, карбонат или бикарбонат калия, соляную кислоту, азотную кислоту, серную кислоту или их смесь.

Согласно одному варианту осуществления в состав могут быть включены дополнительные компоненты, такие как бикарбонат или карбонат натрия, сульфат натрия, фосфат натрия, бифосфат натрия.

Согласно одному варианту осуществления композиции могут содержать одно или более химических соединений с нематоцидной активностью. К ним относятся антибиотические нематоциды, такие как абамектин; карбаматные нематоциды, такие как беномил, карбофуран, карбосульфам и клеотокард; нематоциды группы оксимов карбаматов, такие как аланикарб, алдикарб, альдоксикарб, оксамил; фосфорорганические нематоциды, такие как диамидофос, фенамифос, фостизтан, фосфамидон, кадусафос, хлорпирифос, дихлофентион, диметоат, этопрофос, фенсульфотион, фостиазат, гетерофос, изамидофос, изазофос, метомил, форат, фосфокарб, тербуфос, тиодикарб, тионазин, триазофос, имициафос и мекарфон. Другие соединения с нематоцидной активностью включают ацетопрол, бенклотиаз, хлорпикрин, дазомет, DB CP, DCIP, 1,2-дихлорпропан, 1,3-дихлорпропен, фурфурол, йодметан, метам, метилбромид,

метилизотиоцианат и ксиленолы.

Согласно одному варианту осуществления композиции могут дополнительно содержать эффективное количество по меньшей мере одного инсектицида. Подходящие инсектициды включают, но без ограничения, нематоцидные неоникотиноидные инсектициды, такие как 1-(6-хлор-3-пиридилметил)-N-нитроимидазолидин-2-илиденнеамин (имidakлоприд); 3-(6-хлор-3-пиридилметил)-1,3-тиазолидин-2-илиден-цианамид (тиаклоприд); 1-(2-хлор-1,3-тиазол-5-илметил)-3-метил-2-нитрогуанидин (клотианидин); нитемпиран; N¹-[(6-хлор-3-пиридил) метил]-N²-циано-N¹-метилацетамидин (ацетамиприд); 3-(2-хлор-1,3-тиазол-5-илметил)-5-метил-1,3,5-оксадиазинан-4-илиден (нитро) амин (тиаметоксам); и 1-метил-2-нитро-3-(тетрагидро-3-фурилметил) гуанидин (динотефуран).

Применение продуктов на основе микроорганизмов

Согласно еще одному аспекту заявленное изобретение включает в себя способы, системы и устройства для применения продуктов на основе микроорганизмов.

Согласно одному варианту осуществления в заявленном изобретении предоставлен способ улучшения жизнестойкости растений и/или увеличения урожая сельскохозяйственной культуры за счет внесения раскрытой в настоящем документе композиции в почву, нанесения на семена или части растений. Согласно другому варианту осуществления в заявленном изобретении предоставлен способ увеличения урожая сельскохозяйственной культуры или растения, включающий многократные внесения описанной в настоящем документе композиции.

Предпочтительно, способ может эффективно бороться с нематодами и соответствующими болезнями, вызываемыми вредителями, в то время как достигается увеличение урожая при избегании побочных эффектов и дополнительных затрат.

Согласно одному варианту осуществления композицию можно наносить на уже проросшее и/или растущее растение, включая корни, стебли и листья. Композицию также можно применять для обработки семян. Использование для обработки семян выгодно, потому что можно легко обеспечить нанесение, а количество, используемое для обработки, может быть уменьшено, дополнительно

уменьшая потенциальную токсичность, если таковая имеется.

Согласно одному варианту осуществления продуцирующие биосурфактанты микроорганизмы и/или биосурфактанты можно добавлять в почву, в среду для выращивания растений, на растения, в водную среду или в любую зону, подлежащую обработке для предотвращения повреждения вредителями. Микроорганизмы могут расти *in situ* и вырабатывать биосурфактанты на месте для борьбы с нематодами. Кроме того, природные продуцирующие биосурфактанты организмы, применяемые в месте применения, смогут расти и вырабатывать биосурфактант. Следовательно, в месте обработки (например, в почве) можно легко и непрерывно получать высокую концентрацию биосурфактанта и продуцирующие биосурфактанты микроорганизмы.

Для достижения цели изобретения в композицию и/или место обработки также можно добавлять вещества, которые усиливают рост микроорганизмов и выработку биосурфактантов, для поддержки роста продуцирующих биосурфактанты организмов, а также для получения требуемых биосурфактантов на месте. Эти вещества включают, но без ограничения, углерод, органические субстраты, такие как масло, глицерин, сахар или другие питательные вещества. Например, для получения биосурфактанта на месте и борьбы с нематодами продуцирующие биосурфактант организмы могут расти на субстрате. Природные продуцирующие биосурфактанты организмы на месте применения (в почве, водной системе, частях растений и т.д.) будут производить биосурфактанты при использовании углеродного субстрата. Во время этого процесса продуцируемый биосурфактант будет разрушать и парализовать вредителей в заданной зоне. Согласно изобретению, нет необходимости заранее заражать намеченный участок или смесь углеродного субстрата продуцирующими биосурфактанты организмами.

Углеродные субстраты могут содержать, но без ограничения, источники органического углерода, такие как натуральное или синтетическое масло, включая, использованное масло для жарки; жир; липид; воск (натуральный или парафин); жирные кислоты, такие как лауриновая кислота; миристиновая кислота и т.д; спирт жирной кислоты, например, лауриловый спирт; амфифильные эфиры

жирных кислот с глицерином, такие как глицерилмонолаурат; гликолевые эфиры жирных кислот, такие как полиэтилен моностеарат; амины жирных кислот, такие как лауриламин; амиды жирных кислот; гексаны; глицерин; глюкоза; и т.д. Для стимулирования выработки биосурфактантов предпочтительно использовать водонерастворимый углеродный субстрат.

Один из вариантов осуществления включает добавление или внесение в углеродный субстрат достаточного количества специфического биосурфактанта, чтобы инициировать процесс эмульгирования и ингибировать или уменьшить рост других организмов, конкурирующих с продуцирующим биосурфактант организмом, и для борьбы с нематодами. Например, *Pseudomonas syringae* и *Bacillus subtilis* продуцируют серию липопептидных биосурфактантов, называемых порены. Эти липопептидные порены включают псевдомицин, сирингомицин, табтоксин, фазеолотоксин и сурфактин. Некоторые липопептиды способны создавать отверстия в клеточных мембранах, клетках и тканях.

Псевдомицин можно применять в качестве предпосевной обработки для борьбы с нематодами в растениеводстве. Если необходимо стимулировать рост *Bacillus subtilis*, к среде углеродного субстрата добавляют небольшое количество биосурфактанта сурфактина, чтобы помочь в создании популяции *B. subtilis* и выработке на месте большего количества сурфактина.

Согласно одному варианту осуществления композицию можно наносить путем распыления, разлива, погружения в виде концентрированных или разбавленных жидкостей, растворов, суспензий, порошков и тому подобное, содержащих такие концентрации активного средства, которые наиболее подходят для конкретной поставленной цели. Их можно применять в готовом виде или восстанавливать перед использованием. Например, их можно применять путем прямой инъекции в деревья или в верхнюю часть корневого кома.

Согласно одному варианту осуществления композицию согласно заявленному изобретению можно применять в количестве от приблизительно 0,0001 фунтов/акр до приблизительно 10 фунтов/акр, от приблизительно 0,001 фунтов/акр до приблизительно

5 фунтов/акр, от приблизительно 0,01 фунтов/акр до приблизительно 1 фунтов/акр, от приблизительно 0,01 фунтов/акр до приблизительно 0,1 фунтов/акр или от приблизительно 0,01 фунтов/акр до приблизительно 0,05 фунтов/акр.

Согласно одному варианту осуществления заявленную композицию наносят на растение или сельскохозяйственную культуру от приблизительно 1 до приблизительно 100 дней, от приблизительно 2 до приблизительно 50 дней, от приблизительно 10 до приблизительно 40 дней, от приблизительно 20 до приблизительно 30 дней после первоначального внесения в почву или на семена.

Согласно конкретным вариантам осуществления композиции можно, например, вводить в систему полива, распылять из ранца или аналогичных устройств, наносить с помощью наземного или авиационного роботизированного устройства, такого как дрон, и/или применять с помощью семян.

Нанесение на семена может происходить, например, путем нанесения покрытия на семена или за счет внесения композиции в почву одновременно с посевом семян. Это может быть автоматизировано, например, путем предоставления устройства или оросительной системы, которая наносит микробную композицию вместе с семенами и/или рядом с ними, во время или близко ко времени посева семян. Таким образом, микробную композицию можно вносить в пределах, например, 5, 4, 3, 2 или 1 дня перед или после времени посева или одновременно с посевом семян.

Согласно определенным вариантам осуществления предоставленные в настоящем документе композиции наносят на поверхности почвы без механического внесения. Благоприятное действие в результате внесения в почву может быть активировано осадками, дождевальным, паводковым или капельным орошением, а затем доведено, например, до намеченных вредителей, чтобы снизить уровень их популяции до приемлемых порогов, или до корней растений, чтобы повлиять на микробиом их корней или облегчить поглощение микробного продукта в сосудистую систему культуры или растения, на которое наносят микробный продукт. Согласно иллюстративному варианту осуществления представленные в

настоящем документе композиции можно эффективно наносить с помощью системы кругового орошения или с разбрызгиванием по борозде семян.

Ссылка в данном документе на введение композиции «на или около» вредителя или растения или в «окружающую среду» вредителя или растения означает, что введение является таким, что композиция находится в достаточном контакте с вредителем или растением, так что достигается требуемый результат (например, уничтожение вредителя, увеличение урожая, предотвращение повреждения растения, регулирование генов и/или гормонов и т.д.). Обычно это может быть, например, в пределах 10, 5, 3, 2 или 1 фута или менее от вредителя, растения, сорняка или другой желаемой цели.

Продукт на основе микроорганизмов также может быть применен так, чтобы способствовать колонизации корней и/или ризосферы, а также сосудистой системы растения, чтобы способствовать жизнестойкости и жизнеспособности растений. Таким образом, можно стимулировать микроорганизмы, фиксирующие питательные вещества, такие как *rhizohium* и/или *mycorrhzae*, а также другие эндогенные (уже присутствующие в почве), а также экзогенные, микроорганизмы или их побочные продукты, которые борются с вредителями или болезнями, или иначе способствуют росту сельскохозяйственной культуры, жизнестойкости и/или урожая. Продукт на основе микроорганизмов может также поддерживать сосудистую систему растения, например, путем проникновения в эту сосудистую систему и ее колонизации и внесения метаболитов и питательных веществ, важных для жизнестойкости и продуктивности растений, или метаболитов, обладающих свойствами борьбы с вредителями.

Преимущественно, способ не требует сложного оборудования или большого потребления энергии. Представляющие интерес микроорганизмы можно культивировать в небольшом или крупном масштабе на месте и использовать, даже смешивая с их средой. Аналогичным образом, метаболиты микроорганизмов также могут продуцироваться в больших количествах в нужном месте.

Преимущественно продукты на основе микроорганизмов можно производить в удаленных местах. В одном варианте осуществления

продукты на основе микроорганизмов можно использовать для питания человека и/или профилактики и/или лечения заболеваний.

Вредители-мишени

Согласно предпочтительным, но неограничивающим вариантам осуществления изобретения нематоды, как объект борьбы выбирают из:

(1) нематод, которые являются патогенными нематодами для растений, такими как, но без ограничения: Галловые Нематоды (*Meloidogone* видов) у риса (например, *M. incognita*, *M. javanica* или *M. graminicola*), у сои (например, *M. incognita* или *M. arenaria*), у хлопка (например, *M. incognita*), у картофеля (например, *M. chitwoodi* или *M. hapla*), у томатов (например, *M. chitwoodi*), у табака (например, *M. incognita*, *M. javanica* или *M. arenaria*) и у кукурузы (например, *M. incognita*); Цистообразующие нематоды (виды *Heterodera*) у риса (например, *H. oryzae*), у сои (например, *H. glycines*) и у кукурузы (например, *H. zeae*); Цистообразующие нематоды (виды *Globodera*) у картофеля (например, *G. pallida* или *G. rostochiensis*); Почковидные Нематоды (виды *Rotylenchulus*) у хлопка (например, *R. reniformis*); Корневые нематоды (виды *Pratylenchus*) у банана (например, *P. coffeae* или *P. goodeyi*); Роящие Нематоды (виды *Radopholus*) у банана (например, *R. similis*); и другие повреждающие рис нематоды, такие как нематода корней риса (виды *Hirschmaniella* например, *H. oryzae*);

(2) нематод, способных заражать людей, таких как, но без ограничения: *Enterobius vermicularis*, острица, которая вызывает энтеробиоз; *Ascaris lumbricoides*, большие кишечные круглые гельминты, которые вызывают аскаридоз; *Necator* и *Ancylostoma*, два типа анкилостом, которые вызывают анкилостомоз; *Trichuris trichiura*, власоглав, который вызывает трихуриаз; *Strongyloides stercoralis*, который вызывает стронгилоидоз; и *Trichonella spirae*, который вызывает трихинеллез; *Brugia malayi* и *Wuchereria bancrofti*, нитчатые нематоды, связанные с вызываемыми червями инфекциями, известными, как лимфатический филяриатоз и его грубое проявление, слоновость, и *Onchocerca volvulus*, которая вызывает речную слепоту;

(3) нематод, способных заражать животных, таких как, но без ограничения: собаки (Анкилостомы, например, *Ancylostoma caninum* или *Uncinaria stenocephala*, аскариды, например, *Toxocara canis* или *Toxascaris leonina*, или власоглавы, например, *Trichuris vulpis*), кошки (Анкилостомы, например, *Ancylostoma tubaeforme*, аскариды, например, *Toxocara cati*), рыбы (сельдяные черви или тресковые черви, например, *Anisakis*, или ленточный червь, например, *Diphyllbothrium*), овцы (нитевидные черви, например, *Haemonchus contortus*) и крупный рогатый скот (черви желудочно-кишечного тракта, например, *Ostertagia ostertagi*, *Cooperia oncophora*);

(4) нематод, которые вызывают нежелательное повреждение субстратов или материалов, такие как нематоды, которые повреждают продукты питания, семена, древесину, краску, пластмассу, одежду и т.д. Примеры таких нематод включают, но без ограничения: виды *Meloidogyne* (например, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. graminicola*, *M. chitwoodi* или *M. hapla*); виды *Heterodera* (например, *H. oryzae*, *H. glycines*, *H. zeae* или *H. schachtii*); виды *Globodera* (например, *G. pallida* или *G. rostochiensis*); виды *Ditylenchus* (например, *D. dipsaci*, *D. destructor* или *D. angustus*); виды *Belonolaimus*; виды *Rotylenchulus* (например, *R. reniformis*); виды *Pratylenchus* (например, *P. coffeae*, *P. goodeyi* или *P. zeae*); виды *Radopholus* (например, *R. similis*); виды *Hirschmaniella* (например, *H. oryzae*); виды *Aphelenchoides* (например, *A. besseyi*); виды *Criconeoides*; виды *Longidorus*; виды *Helicotylenchus*; виды *Hoplolaimus*; виды *Xiphinema*; виды *Paratrichodorus* (например, *P. Minor*); виды *Tylenchorhynchus*;

(5) нематод-переносчиков вирусов (например, *Longidorus macrosoma*: переносит вирус некротической кольцевой пятнистости сливы, *Xiphinema americanum*: переносит вирус кольцевой пятнистоститабака, *Paratrichodorus teres*: переносит вирус раннего потемнения гороха или *Trichodorus similis*: переносит вирус погремковости табака).

Специфичные вредители нематоды включают в себя:

Dracunculus medinensis, круглые гельминты, которые вызывают

дракункулез (болезнь, вызываемую гвинейским гельминтом); нематоды *Loa loa* (африканский глазной червь), *Mansonella streptocerca* и *Onchocerca volvulus*, которые вызывают кожный филяриоз; *Mansonella perstans* и *Mansonella ozzardi*, которые вызывают филяриоз брюшной полости; *Trichinella*, включая *T. pseudospiralis* (инфицирующий млекопитающих и птиц по всему миру), *T. nativa* (инфицирующий белых медведей), *T. nelsoni* (инфицирующий африканских хищников и падальщиков) и *T. britovi* (инфицирующий плотоядных животных Европы и западной Азии), который вызывает *Trichinellosis*; *Angiostrongylus cantonensis* (легочная нематода крыс), который является наиболее распространенной причиной эозинофильного менингита человека; *Angiostrongylus costaricensis*, который вызывает абдоминальный (или кишечный) ангиостронгилиаз; *Toxocara*, который вызывает токсокароз человека; *Gnathostoma spinigerum* и редко *G. hispidum*, который вызывает гнатостомоз; и *Anisakis simplex*, или *Pseudoterranova decipiens*, который вызывает анисакиоз.

Согласно конкретным вариантам осуществления способы и композиции согласно заявленному изобретению используют для борьбы с галловыми нематодами (*Meloidogyne incognita*), жалящими нематодами (*Belonolaimus longicaudatus*), цистообразующими нематодами сои (*Heterodera glycines*), ранящими нематодами (*Pratylenchus* sp.), нематодой-кинжалом (*Xiphinema* sp.) и/или цитрусовыми нематодами (*Tylenchulus semipenetrans*).

Растения-Мишени

Растения, которые могут извлечь выгоду от применения продуктов и способов согласно заявленному изобретению, включают: пропашные сельскохозяйственные культуры (например, кукурузу, сою, сорго, арахис, картофель и т.д.), полевые сельскохозяйственные культуры (например, люцерну, пшеницу, зерновые и т.д.), древесные культуры (например, грецкие орехи, миндаль, pekan, лесные орехи, фисташки и т.д.), цитрусовые культуры (например, апельсин, лимон, грейпфрут и т.д.), плодовые культуры (например, яблоки, груши и т.д.), газонные культуры, декоративные культуры (например, цветы, виноград и т.д.), овощи (например, томат, морковь и т.д.), лозовые культуры (например,

виноград, клубнику, чернику, ежевику и т.д.), лесные культуры (например, сосну, ель, эвкалипт, тополь и т.д.), пастбищные культуры (любые смеси растений, используемых для содержания пасущихся животных).

Преимущество может быть в виде, например, повышенного урожая, качества, устойчивости к болезням и вредителям, снижения стресса (например, от соли, засухи, нагрева и т.д.) и улучшения использования воды.

Другие растения, которые могут извлечь выгоду из продуктов и способов согласно изобретению, включают все растения, которые относятся к суперсемейству *Viridiplantae*, в частности однодольные и двудольные растения, включая кормовые или фуражные бобовые, декоративные растения, пищевые культуры, деревья или кустарники, выбираемые из видов *Acer*, видов *Actinidia*, видов *Abelmoschus*, *Agave sisalana*, видов *Agropyron*, *Agrostis stolonifera*, видов *Allium*, видов *Amarant* таким образом, *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, видов *Annona*, *Apium graveolens*, видов *Arachis*, видов *Artocarpus*, *Asparagus officinalis*, видов *Avena* (например, *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida*), *Averrhoa carambola*, видов *Bambusa*, *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsa*, *Beta vulgaris*, видов *Brassica* (например, *Brassica napus*, видов *Brassica rapa* [канола, масличный рапс, репа масличная]), *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis sativa*, видов *Capsicum*, *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, видов *Carya*, *Carthamus tinctorius*, видов *Castanea*, *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*, видов *Cinnamomum*, *Citrullus lanatus*, видов *Citrus*, видов *Cocos*, видов *Coffea*, *Colocasia esculenta*, видов *Cola*, видов *Corchorus*, *Coriandrum sativum*, видов *Corylus*, видов *Crataegus*, *Crocus sativus*, видов *Cucurbita*, видов *Cucumis*, видов *Cynara*, *Daucus carota*, видов *Desmodium*, *Dimocarpus longan*, видов *Dioscorea*, видов *Diospyros*, видов *Echinochloa*, *Elaeis* (например, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*), *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, видов *Eriant* таким образом, *Eriobotrya japonica*, видов *Eucalyptus*, *Eugenia uniflora*, видов *Fagopyrum*, видов *Fagus*, *Festuca arundinacea*,

Ficus carica, видов *Fortunella*, видов *Fragaria*, *Ginkgo biloba*, видов *Glycine* (например, *Glycine max*, *Soja hispida* или *Soja max*), *Gossypium hirsutum*, видов *Helianta* таким образом (например, *Helianta* таким образом *annuus*), *Heimerocallis fulva*, видов *Hibiscus*, видов *Hordeum* (например, *Hordeum vulgare*), *Ipomoea batatas*, видов *Juglans*, *Lactuca sativa*, видов *Lathyrus*, *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, видов *Lotus*, *Luffa acutangula*, видов *Lupinus*, *Luzula sylvatica*, видов *Lycopersicon* (например, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme*), видов *Macrotyloma*, видов *Malus*, *Malpighia emarginata*, *Mammea americana*, *Mangifera indica*, видов *Manihot*, *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, видов *Melilotus*, видов *Mentha*, *Miscanta* таким образом *sinensis*, видов *Momordica*, *Morus nigra*, видов *Musa*, видов *Nicotiana*, видов *Olea*, видов *Opuntia*, видов *Ornithopus*, видов *Oryza* (например, *Oryza sativa*, *Oryza latifolia*), *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca sativa*, видов *Pennisetum*, видов *Persea*, *Petroselinum crispum*, *Phalaris arundinacea*, видов *Phaseolus*, *Phleum pratense*, видов *Phoenix*, *Phragmites australis*, видов *Physalis*, видов *Pinus*, *Pistacia vera*, видов *Pisum*, видов *Poa*, видов *Populus*, видов *Prosopis*, видов *Prunus*, видов *Psidium*, *Punica granatum*, *Pyrus communis*, видов *Quercus*, *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, видов *Ribes*, *Ricinus communis*, видов *Rubus*, видов *Saccharum*, видов *Salix*, видов *Sambucus*, *Secale cereale*, видов *Sesamum*, видов *Sinapis*, видов *Solanum* (например, *Solanum tuberosum*, *Solanum integrifolium* или *Solanum lycopersicum*), *Sorghum bicolor*, видов *Spinacia*, видов *Syzygium*, видов *Tagetes*, *Tamarindus indica*, *Theobroma cacao*, видов *Trifolium*, *Tripsacum dactyloides*, *Triticosecale rimpaui*, видов *Triticum* (например, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum*, *Triticum monococcum* или *Triticum vulgare*), *Tropaeolum minus*, *Tropaeolum majus*, видов *Vaccinium*, видов *Vicia*, видов *Vigna*, *Viola odorata*, видов *Vitis*, *Zea mays*, *Zizania palustris*, видов *Ziziphus*.

Дополнительные примеры представляющих интерес растений

включают, но без ограничения, кукурузу (*Zea mays*), виды *Brassica* (например, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), особенно те виды *Brassica* которые используются в качестве источников масла семян, люцерну (*Medicago sativa*), рис (*Oryza sativa*), рожь (*Secale cereale*), сорго (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), просо (например, просо американское (*Pennisetum glaucum*), просо обыкновенное (*Panicum miliaceum*), просо итальянское (*Setaria italica*), просо пальчатое (*Eleusine coracana*)), подсолнечник (Heliantским образом *annuus*), сафлор (*Carthamus tinctorius*), пшеницу (*Triticum aestivum*), сою (*Glycine max*), табак (*Nicotiana tabacum*), картофель (*Solanum tuberosum*), арахис (*Arachis hypogaea*), хлопок (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), сладкий картофель (*Ipomoea batatas*), кассаву (*Manihot esculenta*), кофе (виды *Coffea*), кокос (*Cocos nucifera*), ананас (*Ananas comosus*), цитрусовые деревья (виды *Citrus*), какао (*Theobroma cacao*), чай (*Camellia sinensis*), банан (виды *Musa*), авокадо (*Persea americana*), инжир (*Ficus casica*), гуава (*Psidium guajava*), манго (*Mangifera indica*), оливки (*Olea europaea*), папайя (*Carica papaya*), кешью (*Anacardium occidentale*), макадамия (*Macadamia integrifolia*), миндаль (*Prunus amygdalus*), сахарную свеклу (*Beta vulgaris*), сахарный тростник (*Saccharum* видов), овес, ячмень, овощи, декоративные растения и хвойные.

Овощи включают помидоры (*Lycopersicon esculentum*), салат (например, *Lactuca sativa*), зеленые бобы (*Phaseolus vulgaris*), лимские бобы (*Phaseolus limensis*), горох (виды *Lathyrus*) и члены рода *Cucumis*, такие как огурец (*C. sativus*), канталуп (*C. cantalupensis*) и дыню мускусную (*C. melo*). Декоративные включают азалию (виды *Rhododendron*), гортензию (*Macrophylla hydrangea*), гибискус (*Hibiscus rosasanensis*), розы (виды *Rosa*), тюльпаны (виды *Tulipa*), нарциссы (виды *Narcissus*), петунии (*Petunia hybrida*), гвоздика (Diantским образом *caryophyllus*), пуансеттию (*Euphorbia pulcherrima*) и хризантему. Хвойные, которые можно использовать в практических вариантах осуществления, включают, например, сосну, такую как сосна ладанная (*Pinus taeda*), сосна Эллиота (*Pinus elliotii*), сосна орегонская (*Pinus ponderosa*), сосна скрученная широкохвойная (*Pinus contorta*) и сосна

монтерейская (*Pinus radiata*); тиссолистная лжетсуга (*Pseudotsuga menziesii*); тсуга западная (*Tsuga canadensis*); ель ситхинская (*Picea glauca*); секвойя вечнозеленая (*Sequoia sempervirens*); настоящие ели, такие как пихта белая (*Abies amabilis*) и пихта бальзамическая (*Abies balsamea*); и кедры, такие как туя гигантская (*Thuja plicata*) и каллитрописис нутканский (*Chamaecyparis nootkatensis*). Растения согласно вариантам осуществления включают сельскохозяйственные растения (например, кукурузу, люцерну, подсолнечник, капусту, сою, хлопок, подсолнечник, арахис, сорго, пшеницу, просо, табак и т.д.), например, растения кукурузы и сои.

Газонные травы включают, но без ограничения: мятлик однолетний (*Poa annua*); райграс многоцветковый (*Lolium multiflorum*); мятлик сплюснутый (*Poa compressa*); овсяница красная (*Festuca rubra*); полевица волосовидная (*Agrostis tenuis*); полевица болотная (*Agrostis palustris*); житняк гребенчатый (*Agropyron desertorum*); пырей пустынный (*Agropyron cristatum*); овсяница жестковатая (*Festuca longifolia*); мятлик луговой (*Poa pratensis*); ежа сборная (*Dactylis glomerate*); райграсс пастбищный (*Lolium perenne*); овсяница красная (*Festuca rubra*); полевица белая (*Agrostis alba*); мятлик обыкновенный (*Poa trivialis*); овсяница желобчатая (*Festuca ovine*); костер безостый (*Bromus inermis*); овсяница тростниковая (*Festuca arundinacea*); тимopheевка (*Phleum pretense*); полевица собачья (*Agrostis canine*); бескильница поникшая (*Puccinellia distans*); пырей Смита (*Agropyron smithii*); свиной пальчатый (виды *Cynodon*); августинова трава (*Stenotaphrum secundatum*); Цойсия японская (виды *Zoysia*); гречка заметная (*Paspalum notatum*); аксонопус чудесный (*Axonopus affinis*); трава сороконожка (*Eremochloa ophiuroides*); кикуйя (*Pennisetum clandestinum*); паспалум приморский (*Paspalum vaginatum*); бутелуа (*Bouteloua gracilis*); бизонова трава (*Buchloe dactyloids*); бутелуа боковая (*Bouteloua curtipendula*).

Другие представляющие интерес растения включают *Cannabis* (например, *sativa*, *indica* и *ruderalis*) и промышленную коноплю.

Представляющие интерес растения включают зерновые растения,

которые обеспечивают представляющие интерес семена, масличные растения и зернобобовые растения. Представляющие интерес семена включают семена зерновых, такие как кукуруза, пшеница, ячмень, рис, сорго, рожь, просо и т.д. Масличные растения включают хлопок, сою, сафлор, подсолнечник, капусту, кукурузу, люцерну, пальму, кокос, лен, клещевину, оливу и т.д. Зернобобовые растения включают бобы и горох. Бобы включают гуар, рожковое дерево, пажитник, сою, фасоль обыкновенную, коровий горох, маш, лимскую фасоль, садовые бобы, чечевицу, нут и т.д.

Все растения и части растений можно обрабатывать в соответствии с изобретением. В этом контексте растения следует понимать, как все растения и популяция растений, например, требуемые и нежелательные дикие растения или сельскохозяйственные растения (включая существующие в природе сельскохозяйственные растения). Сельскохозяйственные растения могут представлять собой растения, которые могут быть получены традиционными методами разведения и оптимизации или с помощью биотехнологических и рекомбинантных методов, или комбинаций этих методов, включая трансгенные растения и сорта растений.

Части растений следует понимать, как все надземные и подземные части и органы растений, такие как побег, лист, цветок и корень, примеры, которые могут быть упомянуты, включают листья, иглы, черенки, стебли, цветы, плодовые тела, плоды и семена, но также корни, клубни и корневища. Части растений также включают растительный материал и материал для вегетативного и генеративного размножения, например черенки, клубни, корневища, побеги и семена.

ПРИМЕРЫ

Должно быть понятно, что описанные в настоящем документе варианты осуществления примеры и предназначены только для иллюстративных целей, и что в связи с этим специалистам в данной области будут предложены разные модификации или изменения, которые должны быть включены в пределы сущности и рамок настоящей заявки.

ПРИМЕР 1 – ФЕРМЕНТАЦИЯ *S. BOMBICOLA* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СОФОРОЛИПИДА (SLP) В 110 Л РАСПРЕДЕЛЯЕМОМ РЕАКТОРЕ

Используют портативный, аэрлифтный, полностью закрытый реактор, управляемый PLC с фильтрацией воды, блоком регулирования температуры и встроенным нагнетателем воздуха. Реактор имеет рабочий объем 90 л при выращивании *Starmerella bombicola* для получения SLP.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления питательными веществами для получения SLP являются глюкоза, мочевины, экстракт дрожжей, масло канолы, сульфат магния и фосфат калия.

Реактор инокулируют 8 литрами жидкой культуры, выращенной в колбах. Продолжительность цикла культивирования для получения SLP составляет 7-8 дней, при 25°C и pH 3,5, с взятием проб, проводимым два раза в день.

Итоговая концентрация SLP составляет приблизительно 10% рабочего объема, в этом случае приблизительно 9 л продукта содержат 300-400 грамм SLP на литр.

ПРИМЕР 2 - ФЕРМЕНТАЦИЯ *S. BOMBICOLA* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ SLP В ПОРТАТИВНОМ 14 Л РАСПРЕДЕЛЯЕМОМ РЕАКТОРЕ

Этот реактор представляет собой автоклавируемый снабженный рубашкой стеклянный сосуд с воздушной продувкой и крыльчаткой. Он оборудован зондом растворенного кислорода, pH, температуры и пены; он имеет встроенную станцию управления с цветным сенсорным интерфейсом, встроенные насосы, регуляторы расхода газа и регуляторы уровня pH/DO пены. Рабочий объем реактора составляет 10 литров.

Питательная среда содержит глюкозу, экстракт дрожжей, мочевины и растительное масло. Инокулят может представлять собой культуру *Starmerella bombicola* в возрасте 1-2 дня в количестве приблизительно 5-10% от общего объема культуры. Продолжительность культивирования и сбор готового продукта продолжает 5-14 дней. Итоговая выработка софоролипида может достигать 1-2 килограмма за цикл.

Пример 3 - Ферментация *WICKERHAMOMYCES* И/ИЛИ ДРОЖЖЕЙ *PICHIA* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ SLP В 450 Л РАСПРЕДЕЛЯЕМОМ РЕАКТОРЕ

Используют подвижный аэрлифтный реактор, управляемый PLC с

фильтрацией воды, блоком регулирования температуры и нагнетателем воздуха для достаточной аэрации. Процесс можно проводить в виде процесса периодического культивирования. Реактор имеет рабочий объем 400 л, при выращивании *Wickerhamomyces* или *Pichia* для получения SLP.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления питательными веществами для получения SLP являются глюкоза, мочевины, экстракт дрожжей, масло канолы, сульфат магния и фосфат калия.

Инокуляция этого реактора требует до 5% жидкой культуры семян от рабочего объема. Продолжительность цикла культивирования составляет 7 дней при температуре 25°C и pH 3,5, с взятием проб, проводимым два раза в день.

Итоговая концентрация SLP составляет приблизительно 20-25% рабочего объема, в этом случае образуется более чем 90 л продукта.

ПРИМЕР 4 - ФЕРМЕНТАЦИЯ WICKERHAMOMYCES И/ИЛИ ДРОЖЖЕЙ PICHIA ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО БЕЛКА И БЕЛКА ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ В 900 Л РАСПРЕДЕЛЯЕМОМ РЕАКТОРЕ

Используют портативный реактор, разделенный на два резервуара, обслуживаемых центральным аэрлифтом, чтобы способствовать одновременному перемешиванию двух резервуаров. Реактор имеет рабочий объем 600 л, при выращивании *Wickerhamomyces* и/или *Pichia* для получения клеток.

Согласно предпочтительному варианту осуществления питательными веществами для получения клеток являются глюкоза или хлебопекарный сахар, мочевины, экстракт дрожжей, сульфат магния и фосфат калия.

Реактор инокулируют 2% посевной культуры. Ферментацию продолжают 48-72 часов без стабилизации pH и при температуре 26-32°C.

Итоговая концентрация клеток будет 100 г влажной массы на литр. Концентрация влажной биомассы может достигать 90 кг за цикл с концентрацией белка до 45 кг.

ПРИМЕР 5 - ФЕРМЕНТАЦИЯ WICKERHAMOMYCES И/ИЛИ ДРОЖЖЕЙ PICHIA

ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО БЕЛКА И БЕЛКА ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ В 2000 Л РАСПРЕДЕЛЯЕМОМ РЕАКТОРЕ

Используют портативный реактор, разделенный на два квадратных резервуара, с 2 петлями для массообмена между ними. Реактор имеет рабочий объем 2000 л, при выращивании *Wickerhamomycetes* и/или *Pichia* для получения клеток.

Согласно предпочтительному варианту осуществления питательными веществами для получения клеток являются глюкоза или хлебопекарный сахар, мочевины, экстракт дрожжей, сульфат магния и фосфат калия.

Реактор инокулируют 2% посевной культуры. Ферментацию продолжают 48-72 часов без стабилизации pH и при температуре 26-32°C.

Итоговая концентрация клеток будет 100 г сырой массы на литр. Концентрация влажной биомассы может достигать до 200 кг за цикл с концентрацией белка до 100 кг.

ПРИМЕР 6 - ФЕРМЕНТАЦИЯ PSEUDOZYMA APHIDIS ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МАННОЗИЛЭРИТРИТОЛОВОГО ЛИПИДА (MEL) В ПОРТАТИВНОМ 14 Л РАСПРЕДЕЛЯЕМОМ РЕАКТОРЕ

Это паровой автоклавируемый снабженный рубашкой стеклянный сосуд с воздушной продувкой и крыльчаткой Раштана. Он оборудован зондом DO, pH, температуры и пены. Он имеет встроенную станцию управления с цветным сенсорным интерфейсом, встроенные насосы, регуляторы расхода газа и регуляторы уровня pH/DO пены. Рабочий объем реактора составляет 10 литров.

Состав питательной среды: нитрат натрия, фосфат калия, сульфат магния, экстракт дрожжей и растительное масло. Инокулятом может быть культура *Pseudozyma aphidis* возраста 1-2 дня, в количестве приблизительно 5-10% общего объема культуры. Продолжительность культивирования и сбор пробы: 9-15 дней. Итоговое получение MEL: 800-1000 грамм.

ПРИМЕР 7 - ИСПОЛЬЗОВАНИЕ SLP ДЛЯ УМЕНЬШЕНИЯ ЯИЦ ГАЛЛОВОЙ НЕМАТОДЫ НА РАСТЕНИЯХ ТОМАТА

Starmerella bombicola выращивали, как описано выше. В конце ферментации культуры бульон осаждается, и большая часть SLP

отделяется в виде темно коричневого слоя (концентрация приблизительно 500 г/л). Этот коричневый слой в основном содержит SLP, а также немного клеток. Слой собирают, а pH доводят до pH 7,0. Затем этот раствор разбавляют водой для получения требуемых концентраций.

1 день Проращивание семян томатов (Money-maker)

14 День Приготовление смеси песок/глина turface (1:1) с 1% удобрением (осмокот), пересаживание 2-недельной рассады томатов

28 день заражение микроорганизмами путем промачивания почвы растений в возрасте 4 недели. Для каждого квадратного горшка 10 см x 10 см, 80-100 мл культуры было достаточно для смачивания почвы.

32 день Через четыре дня после заражения микроорганизмами на каждое растение наносили яйца RKN (4000 яиц на горшок).

76 День Через шесть недель после заражения яйцами уборка растения.

После уборки растения промыли водой из-под крана для удаления песка/глины turface, находящихся на корне. Регистрировали сырую массу корней. После этого корни нарезали на маленькие части и клали в маленький пластмассовый обеденный пакет. После добавления 200 мл 5% раствора гипохлорита натрия пакет инкубировали и осторожно встряхивали в течение 15 мин. Затем подсчитывали яйца в 10 мкл пробах в трех повторях под стереомикроскопом. Рассчитывали общее количество яиц на каждом корне. В итоге, рассчитывали количество яиц в каждом грамме биомассы корней.

SLP 0,25% также показывает активность против галловой нематоды (RKN) с уменьшением яиц приблизительно на 52%.

ПРИМЕР 8 – СРАВНЕНИЕ СПОСОБНОСТИ SLP, MEL И NIMITZ® БОРОТЬСЯ С ГАЛЛОВЫМИ, ЖАЛЯЩИМИ И РАНЯЩИМИ НЕМАТОДАМИ

Nimitz® представляет собой первый новый химический нематоцид, разработанный более чем 20 лет назад. Nimitz® демонстрирует необратимую и быструю нематоцидную активность немедленно после применения. В течение одного часа контакта нематоды прекращают есть и быстро становятся парализованными. В

течение 24–48 часов происходит гибель вредителей, а не временная нематостатическая (остановка) активности, что демонстрируют органофосфатные и карбаматные нематоциды.

Pseudozyma aphidis выращивали, как описано выше. В конце ферментации использовали весь культуральный бульон, так как MEL очень трудно отделять без использования растворителя. Затем MEL разбавляют водой до требуемых концентрации непосредственно перед применением.

Starmerella bombicola выращивали, как описано выше. В конце ферментации культуры бульон осаждается, и большая часть SLP отделяется в виде темно коричневого слоя (концентрация приблизительно 500 г/л). Этот коричневый слой в основном содержит SLP, а также немного клеток. Слой собирают, а pH доводят до pH 7,0. Затем этот раствор разбавляют водой для получения требуемых концентраций.

Проводили следующий биоанализ: стеклянные предметные стекла с полостью заполняют подходящими количествами тестируемого продукта. В содержащий нематоцид раствор добавляют известную популяцию личинок нематод-мишеней. Предметные стекла с полостью содержат при комнатной температуре. Гибель нематод можно оценить путем подсчета количества нематод через 24, 48 и 72 часов. Уровень гибели в процентах рассчитывали как: [среднее количество погибших личинок при обработке/общее количество личинок при обработке] x 100.

А. Галловые Нематоды

Гибель галловых нематод (*Meloidogyne incognita*) (т.е. сколько нематод погибло) и отсутствие подвижности (т.е. сколько нематод были смертельно поражены) определяли через 3 дня после обработки SLP (SD10) или MEL (SD12) в разных концентрациях и сравнивали с обработкой Nimitz® и контролем без обработки (фиг. 1 и 2). Уровень гибели в процентах рассчитывали по количеству мертвых нематод/величину общей численности нематод перед тестированием. Процент неподвижных нематод рассчитывали по количеству неподвижных нематод/количество живых нематод. Таким образом, подвижность рассчитывали, как долю тех нематод, которые

не погибли, но были определены, как неподвижные.

В тесте наиболее эффективной обработкой был высокий уровень MEL (0,1% о/о). В отношении гибели она была значительно более эффективной, чем Nimitz®. Не наблюдался четкий дозозависимый ответ. Результаты также показывают, что SLP был таким же эффективным, как Nimitz® в отношении гибели галловых нематод и отсутствия подвижности.

В. Жалющие Нематоды

Гибель и показатели уменьшения подвижности жалющих нематод (*Belonolaimus longicaudatus*) определяли через 3 дня после обработки SLP или MEL в разных концентрациях и сравнивали с обработкой Nimitz® и контролем без обработки (фиг. 1 и 2).

Результаты показывают, что как SLP, так и MEL увеличивают гибель и показатель уменьшения подвижности жалющих нематод зависимым от дозы образом. Высокие уровни MEL (0,1% или 0,2% о/о) были наиболее эффективной обработкой в тесте. Они были также эффективны, как Nimitz® в отношении гибели и более эффективны, чем Nimitz® в отношении показателя уменьшения подвижности.

С. Ранящие нематоды

Гибель и показатели уменьшения подвижности ранящих нематод (*Pratylenchus* sp.) определяли через 3 дня после обработки SLP или MEL в разных концентрациях и сравнивали с обработкой Nimitz® и контролем без обработки (Фиг. 1 и 2).

Результаты показывают, что как SLP, так и MEL увеличивают гибель и показатель уменьшения подвижности ранящих нематод зависимым от дозы образом. В тесте MEL был более эффективным, чем SLP и сравним с Nimitz®.

ПРИМЕР 9 – ОЦЕНКА РАЗНЫХ ОБРАБОТОК ПРОТИВ ЮЖНЫХ ГАЛЛОВЫХ НЕМАТОД В ТЕСТАХ В СОСУДАХ В ФИТОПАТОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Обработку SLP (SD10) и обработку MEL (SD12), применяемые непосредственно на инфицированной нематодами почве, тестировали в двух нормах, отдельно или вместе, и сравнивали с Nimitz® и контролем без обработки для уменьшения популяций живых Южных Галловых Нематод. Подсчет проводили в три разные момента времени

после обработки.

Шесть повторов 7 обработок проводили в стеклянных сосудах, содержащих 350 см³ 99% песчаной почвы. Сосуды заражали 70 взрослыми Южными Галловыми нематодами (*Meloidogyne incognita*). Одно применение препарата проводили непосредственно после заражения нематодами, когда 85 мл препарата вручную наливали в каждый сосуд. Смеси препаратов получали согласно Таблице 1 (ниже). Подсчет живых и мертвых нематод проводили на 3 день, 14 день и 23 день после обработки. Также в таблицу свели подсчет неподвижных нематод в виде доли от всех живых.

Таблица 1 Получение смесей для обработки

№ обр.	Название обработки	Тип формы	Норма	Единица нормы	Количество продукта для измерения
1	SD10	L	0,25	% о/о	2,5 мл/см
2	SD10	L	0,5	% о/о	4,999 мл/см
3	SD12	L	0,1	% о/о	0,9999 мл/см
4	SD12	L	0,2	% о/о	2,0 мл/см
5	SD10+ SD12	L L	0,25 0,1	% о/о % о/о	2,5 мл/см 0,9999 мл/см
6	Nimitz®	L	10	ч/млн pr	9,999 мл/см
7	Проверка без обработки				

результаты

Результаты тестирования в сосудах для продуктов SD10 и SD12 говорят о положительном ответе на дозу для активности против Южных Галловых Нематод. SD10 и SD12, применяемые вместе при низкой норме, не были также эффективны, как каждый продукт отдельно при более высокой норме. Nimitz® обеспечивал

превосходные результаты борьбы.

На фиг. 3 и в Таблице 2 (ниже) показан подсчет живых нематод для каждой обработки. На фиг. 4 и в Таблице 3 (ниже) показан контроль живых нематод (т.е. Норма гибели нематод) для каждой обработки.

Таблица 2. Подсчет живых нематод

№ обр.	Название обработки	Норма	Единица нормы	Код пр.	Предварительный подсчет		3DA-A		14DA-A		23DA-A	
1	SD10	0,25	% о/о	A	77,00	a	52,00	a	38,17	a	13,5	A b
2	SD10	0,5	% о/о	A	77,00	a	47,67	a	36,67	a	11,50	B
3	SD12	0,1	% о/о	A	77,00	a	46,33	a	36,00	a	11,83	B
4	SD12	0,2	% о/о	A	77,00	a	48,50	a	33,33	a	8,17	C
5	SD10+ SD12	0,25 0,1	% о/о % о/о	A	77,00	a	46,00	a	36,50	a	11,83	B
6	Nimitz®	10	ч/млн pr	A	77,00	a	16,00	b	4,17	b	1,67	D
7	Проверка без обработки				77,00	a	50,50	a	39,83	a	15,33	a

Уже на 3 день (3 DA-A) были значительно более высокие зарегистрированные результаты борьбы в сосудах, обработанных Nimitz® (10 ч/млн). Для каждого из SD10 и SD12 наблюдался значительный ответ на дозу на 23 DA-A, причем образцы, обработанные более высокой нормой имели меньшее количество нематод, чем у образцов с более низкой нормой. При применении SD10 и SD12 с более низкой нормой в комбинации, гибель нематод существенно не повышалась до уровней, наблюдаемых при обработках с более высокой нормой.

Таблица 3. Контроль живых нематод (%)

№ обр.	Название обработки	Норма	Единица нормы	Код пр.	3DA-A		14DA-A		23DA-A	
1	SD10	0,25	% о/о	A	1,84	bc	9,09%	bc	15,56	cd
2	SD10	0,5	% о/о	A	8,29	bc	8,03%	bc	25,72	c
3	SD12	0,1	% о/о	A	8,84	bc	9,24%	bc	22,18	c

4	SD12	0,2	% о/о	A	9,39	b	18,64%	b	44,88	b
5	SD10+ SD12	0,25 0,1	% о/о % о/о	A	10,88	b	11,40%	bc	20,90	c
6	Nimitz®	10	ч/млн pr	A	68,24	a	89,94%	a	89,77	a
7	Проверка без обработки				0,00	c	0,00%	c	0,00	d

На фиг. 5 и в Таблице 4 (ниже) показан подсчет неподвижных нематод. На фиг. 6 и в Таблице 5 (ниже) показан подсчет неподвижных живых нематод (%).

Таблица 4. Подсчет неподвижных нематод

№ обр.	Название обработки	Норма	Единица нормы	Код пр.	3DA-A		14DA-A		23DA-A	
1	SD10	0,25	% о/о	A	3,33	C	4,67	bc	2,5	Ab
2	SD10	0,5	% о/о	A	5,17	Bc	4,67	bc	3,17	A
3	SD12	0,1	% о/о	A	7,33	B	4,67	bc	1,50	Bc
4	SD12	0,2	% о/о	A	11,8 3	A	6,67	a	2,00	Ab c
5	SD10+ SD12	0,25 0,1	% о/о % о/о	A	10,0 0	A	6,33	Ab	3,17	A
6	Nimitz®	10	ч/млн pr	A	4,67	C	2,50	D	0,67	C
7	Проверка без обработки				2,83	c	3,33	cd	1,83	ab c

Количество неподвижных нематод было самое низкое в образцах, обработанных Nimitz®. На 3 DA-A была более высокая доля неподвижных нематод при повышенных нормах либо SD10, либо SD12, подтверждая, что ранняя активность пестицидов не приводила к немедленной гибели. На 14 DA-A доля живых нематод оцениваемых неподвижными, статистически не отличалась среди обработанных SD сосудов.

Таблица 5. Подсчет неподвижных живых нематод (%)

№	Название	Норма	Единица	Код	3DA-A	14DA-A	23DA-A
---	----------	-------	---------	-----	-------	--------	--------

обр.	обработки		ца нормы	пр.						
1	SD10	0,25	% о/о	A	6,39	E	12,86	b	18,80	a
2	SD10	0,5	% о/о	A	11,1 8	De	12,55	b	28,61	a
3	SD12	0,1	% о/о	A	15,7 8	Cd	13,51	b	13,16	a
4	SD12	0,2	% о/о	A	25,0 3	Ab	20,85	b	22,59	a
5	SD10+ SD12	0,25 0,1	% о/о % о/о	A	22,0 0	Bc	17,89	b	27,85	a
6	Nimitz®	10	ч/млн pr	A	30,5 5	A	43,06	a	36,67	a
7	Проверка без обработки				5,91	e	8,54	b	13,01	a

ПРИМЕР 10 – ИСПОЛЬЗОВАНИЕ MEL В КАЧЕСТВЕ НЕМАТОЦИДА В СИСТЕМЕ МИКРОДЕЛЯНОК РАСТЕНИЙ ОГУРЦОВ

для изучения обработки нематод MEL для растений огурцов по сравнению с Nimitz® и контролем без обработки использовали микроделянку вне помещения, находящуюся в Thonotosassa, Florida, USA. Исследовали шесть разных групп обработки, каждая из которых состоит из 8 растений. Для групп с применением обработки SD12 (0,2% аи/о), препарат вносили в почву один раз, два раза или три раза. Как подсчет нематод, так и норму галлообразования определяли при уборке. Также измеряли мощность растений, урожай и массу растений.

Растения, подвергаемые обработке Nimitz® (5 pt/a), выращивали в почве, обработанной за 7 дней перед посевом (химическая обработка является слишком фитотоксической для применения в сезон роста). Для всех растений, подвергаемых обработке SD12, первое внесение SD12 в почву (60 мл для каждого растения) происходило во время посева. Для растений, подвергаемых двойной обработке и тройной обработке SD12, второе применение 60 мл происходило через две недели после первой

обработки. Для растений, подвергаемых тройной обработке SD12, третье применение 60 мл происходило через четыре недели после первой обработки.

Подсчет нематод и норм галлообразования проводили для всех групп через 31 день после итоговой обработки SD12 в группе тройной обработки. Мощность растений (0-10 индекс/шкала), урожай (фунт.) и массу (фунт.) измеряли на следующий день.

Результаты

ответ на норму наблюдали по галлообразованию (фиг. 7 и Таблица 6 (ниже)) и по подсчету нематод после обработки (фиг. 8 и Таблица 7 (ниже)). SD12 выполнены по коммерческим стандартам. Не было существенной разницы между обработками SD12 и обработкой Nimitz®, но между обработками SD12 и контролем без обработки наблюдались значительные отличия. В таблице 8 ниже приведены мощность, урожай и масса растений при уборке.

Таблица 6. Рейтинг галлообразования (1-10 индекс/шкала)

№ обр.	Название обработки	Норма	Единица нормы	Код пр.	Рейтинг галлообразования	
1	без обработки				2,9	A
2	Nimitz®	5	Pt/a	A	1,1	B
3	SD12*1	0,2	% ай/о	B	1,1	B
4	SD12*2	0,2	% ай/о	BC	0,7	B
5	SD12*3	0,2	% ай/о	BCD	0,3	B

LSD (P=0,05)=0,88; SD=0,86; CV=69,39; X2 Бартлетта=11,754; P (X2 Бартлетта)=0,019*; Повтор F=3,712; повтор Prob(F)=0,0061; обработка F=11,133; обработка prob(F)=0,0001.

Таблица 7. Количество нематод

№ обр.	Название обработки	Норма	Единица нормы	Код пр.	Количество нематод	
1	без обработки				59	A
2	Nimitz®	5	Pt/a	A	27	B
3	SD12*1	0,2	% ай/о	B	20	B
4	SD12*2	0,2	% ай/о	BC	18	B

5	SD12*3	0,2	% ай/о	BCD	9	В
---	--------	-----	--------	-----	---	---

LSD (P=0,05)=17,33; SD=16,3; CV=63,88; X2 Бартлетта=17,263;
P (X2 Бартлетта)=0,02*; Повтор F=2,774; повтор Prob(F)=0,0261;
обработка F=10,44; обработка prob(F)=0,0001.

Таблица 8. Мощность растений (0-10), урожай (ф.) и масса (ф). Измерения при уборке растений.

№ обр.	Название обработки	Норма	Единица нормы	Код пр.	Мощность		Урожай		Масса	
1	без обработки				6,2	В	2,188	а	1,131	а
2	Nimitz®	5	Pt/a	A	8,0	а	3,063	а	1,550	а
3	SD12*1	0,2	% ай/о	В	8,1	а	2,438	а	1,288	а
4	SD12*2	0,2	% ай/о	BC	8,4	а	2,638	а	1,263	а
5	SD12*3	0,2	% ай/о	BCD	8,2	а	3,281	а	1,425	а

ПРИМЕР 11 – ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМАНКИ НЕМАТОД

Процентные значения количества и заражения Южных Галловых Нематод получали в четырех герметичных камерах 11,6 д. x 7,6 д., содержащих почву с озерным мелким песком, с добавленным материалом приманки. Для получения приманки предварительно подготовленный, купленный экстракт корня валерианы смешивали с водой, растительным глицерином и 20% зерновым спиртом.

Каждую делянку заражали нематодами в зоне с диаметром 2 см. В зоне 3 см (в) x 1 см (ш) добавляли 10 мл приманки для нематод, в 2 см от зоны заражения (фиг. 9).

Процентные значения количества и заражение нематодами получали в трех местах, через 3 дня после обработки и через 8 дней после обработки. Три тестируемых места представляли собой центр зоны заражения, зоны приманки и зоны без обработки.

Результаты

Результаты изложены на фиг. 10 и в таблице 9 (ниже).

Миграция в сторону зоны приманки или без обработки значительно отличалась относительно зоны заражения в виде доли общей популяции. В случае взятия проб через 24 и 48 часов количество нематод в зоне приманки, чем в зонах без обработки камеры было больше более чем на 14%; однако в центральной зоне, где происходило заражение нематодами, содержалось больше всего нематод.

Таблица 9

№ обр.	Зона обработки	Норма	Единица нормы	Количество				Заражение %			
				3DA-A		8DA-A		3DA-A		8DA-A	
1	Центр			63,50	a	22,50	a	62,17	a	76,52	a
2	Обработка -Приманка	10	Мл/группу	27,50	b	6,00	b	28,67	b	18,66	b
3	Без обработки			8,75	b	1,75	b	9,16	c	4,82	c

Все патенты, патентные заявки, предварительные заявки и публикации, упоминаемые или цитируемые в настоящем документе, полностью включены в данный документ посредством ссылки, включая все фигуры и таблицы, в той степени, в которой они не противоречат явным положениям настоящего описания.

Описание в данном документе любого аспекта или варианта осуществления изобретения с использованием таких терминов, как «содержащий», «имеющий», «включающий» или «включающий в себя» со ссылкой на элемент или элементы, предназначено для обеспечения поддержки аналогичного аспекта или варианта осуществления изобретения, которое «состоит из», «состоит по существу из» или «по существу содержит» этот конкретный элемент или элементы, если не указано иное или явно не противоречит контексту.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ борьбы с нематодами, где указанный способ включает получение нематоцидной композиции на основе микроорганизмов путем культивирования микроорганизмов в таких условиях, что микроорганизм продуцирует биосурфактант, причем указанная нематоцидная композиция содержит микроорганизмы и/или питательный бульон, в котором культивируют микроорганизм, и при этом указанный способ дополнительно включает применение нематоцидной композиции к нематодам и/или к окружающей их среде.

2. Способ по п. 1, в котором биосурфактант представляет собой гликолипид.

3. Способ по п. 2, в котором гликолипид представляет собой софоролипид (SLP).

4. Способ по п. 2, в котором гликолипид представляет собой маннозилэритритоловый липид (MEL).

5. Способ по п. 1, в котором микроорганизмом является грибок, выбираемый из *Starmerella*, *Pichia* и *Pseudozyma*.

6. Способ по п. 5, в котором грибок представляет собой *Starmerella bombicola*.

7. Способ по п. 5, в котором грибок представляет собой *Pseudozyma aphidis*.

8. Способ по п. 5, в котором грибок представляет собой *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*).

9. Способ по п. 1, в котором питательный бульон содержит указанный биосурфактант.

10. Способ по п. 9, в котором способ дополнительно включает обработку питательного бульона для того, чтобы отделить биосурфактант от клеточной массы с последующим применением биосурфактанта к нематодам и/или к окружающей их среде.

11. Способ по п. 9, в котором питательный бульон наносят на нематоды и/или в окружающую их среду без отделения сперва биосурфактанта от клеточной массы.

12. Способ по п. 1, который применяется для борьбы с нематодами, выбанными из галловых нематод (*Meloidogyne incognita*), жалящих нематод (*Belonolaimus longicaudatus*),

соевых цистообразующих нематод (*Heterodera glycines*), ранящих нематод (*Pratylenchus sp.*), роющих нематод (*Xiphinema sp.*) и цитрусовых нематод (*Tylenchulus semipenetrans*).

13. Способ по п. 1, который применяют для борьбы с нематодами, вредителями растений.

14. Способ по п. 13, в котором растения выбирают из томата, сои, кукурузы, цитрусовых и газонных трав.

15. Способ по п. 13, в котором композицию применяют для протравливания семян.

16. Способ по п. 1, в котором композицию наносят на почву.

17. Способ по п. 1, который дополнительно включает применение приманки для нематод.

18. Композиция для борьбы с нематодами, где указанная композиция содержит биосурфактанты и микроорганизмы, которые продуцируют указанные биосурфактанты.

19. Композиция по п. 18, в которой биосурфактант представляет собой гликолипид.

20. Композиция по п. 19, в которой гликолипид представляет собой SLP.

21. Композиция по п. 19, в которой гликолипид представляет собой MEL.

22. Композиция по п. 19, дополнительно содержащая вещество для приманки нематод.

23. Композиция по п. 22, в которой вещество для приманки нематод содержит экстракт корня валерианы.

24. Способ борьбы с нематодами, где указанный способ включает нанесение на нематод и/или внесение в окружающую нематод среду маннозилэритритолового липида (MEL).

25. Способ по п. 24, дополнительно включающий нанесение SLP на нематод.

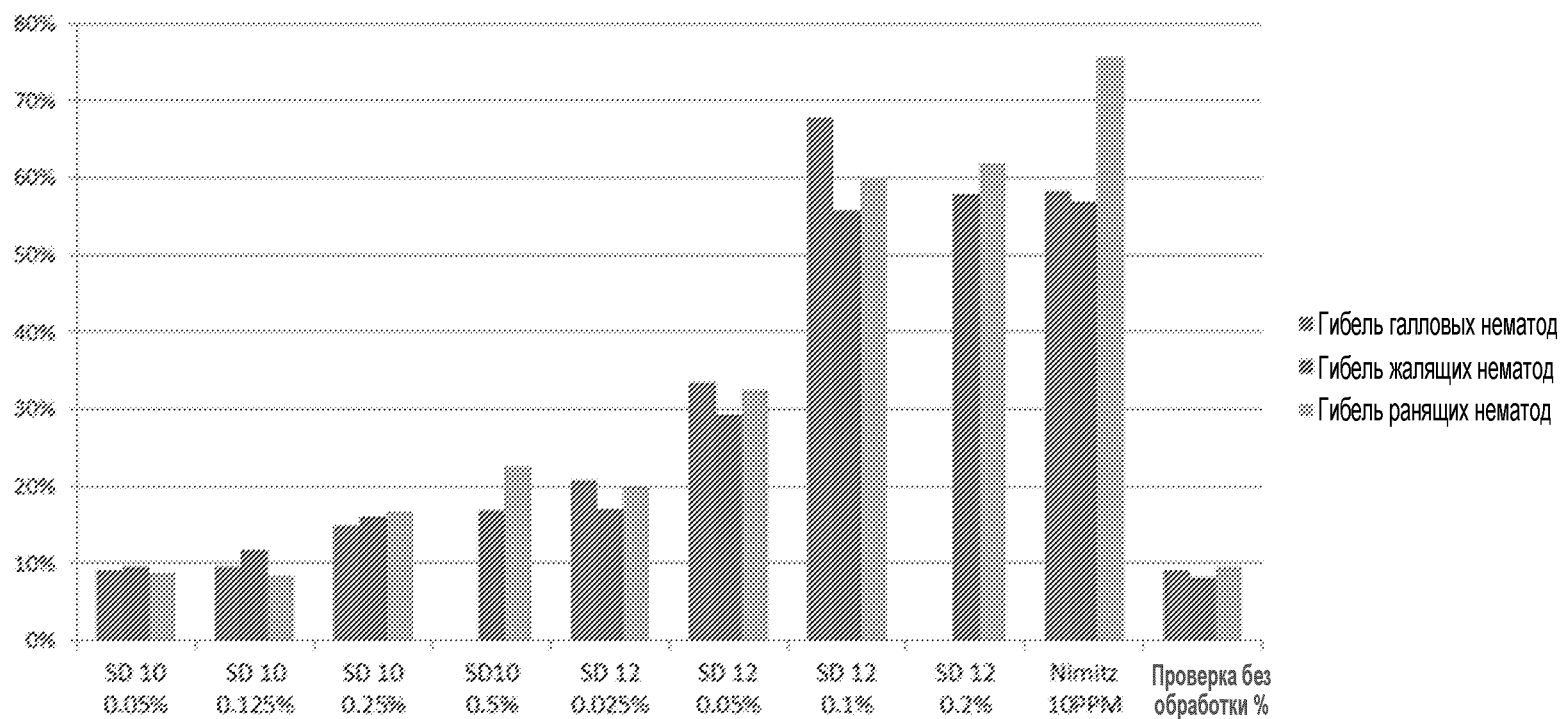
26. Способ по п. 25, дополнительно включающий вещество для приманки нематод.

27. Способ по п. 25, применяемый для борьбы с нематодами, выбанными из галловых нематод (*Meloidogyne incognita*), жалящих нематод (*Belonolaimus longicaudatus*), соевых цистообразующих нематод (*Heterodera glycines*), ранящих нематод (*Pratylenchus*

sp.), роющих нематод (*Xiphinema sp.*) и цитрусовых нематод (*Tylenchulus semipenetrans*).

Результаты гибели нематод

Показатель гибели в исследованиях с разными обработками
% гибели

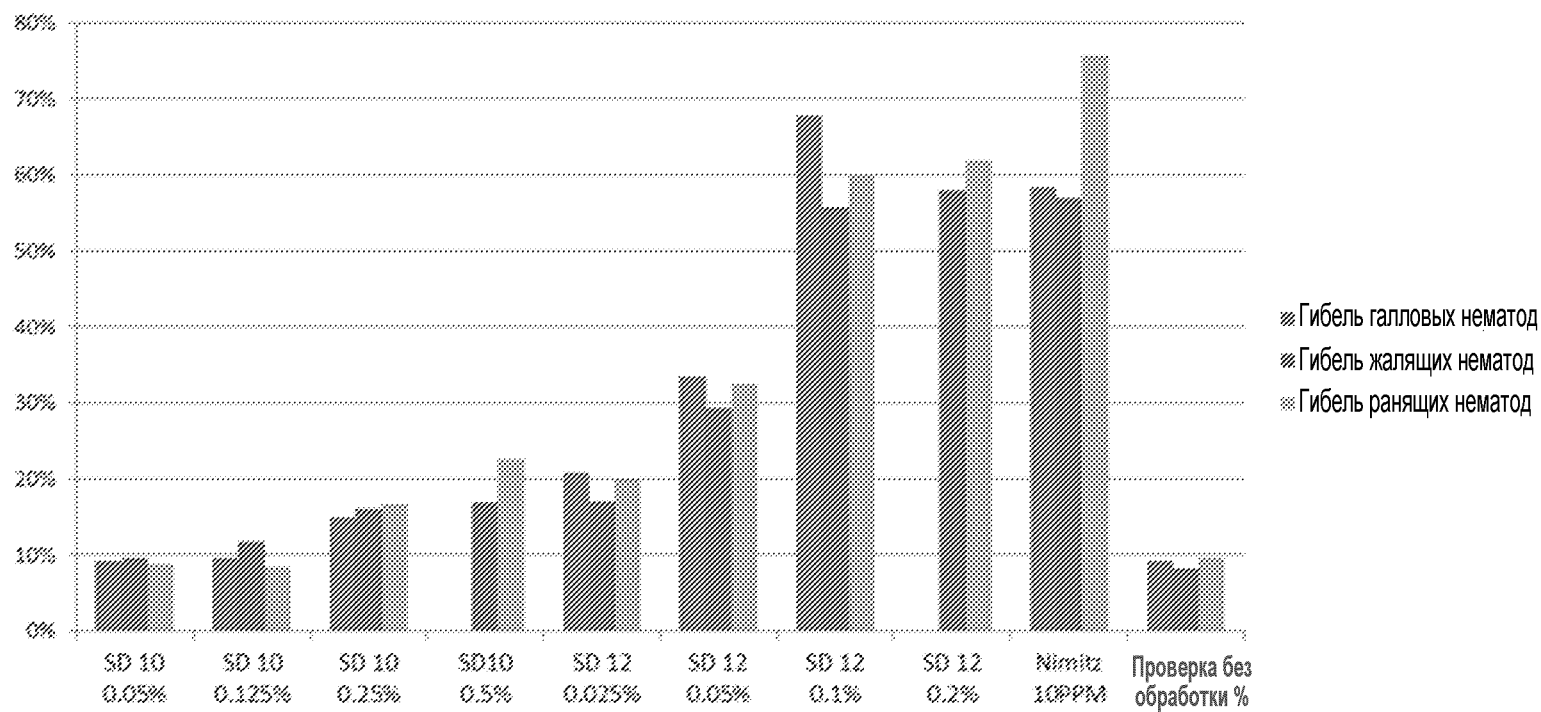


ФИГ. 1

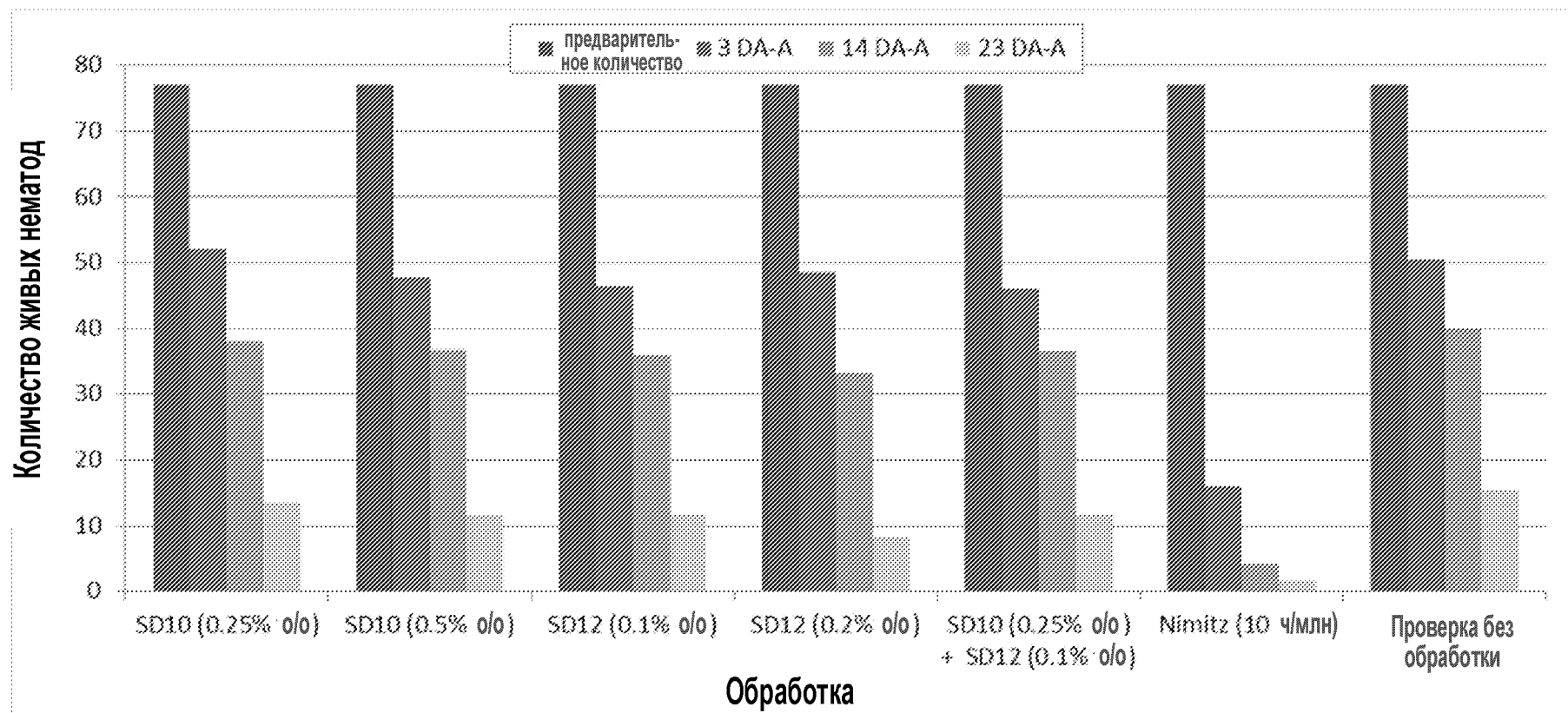


Результаты гибели нематод

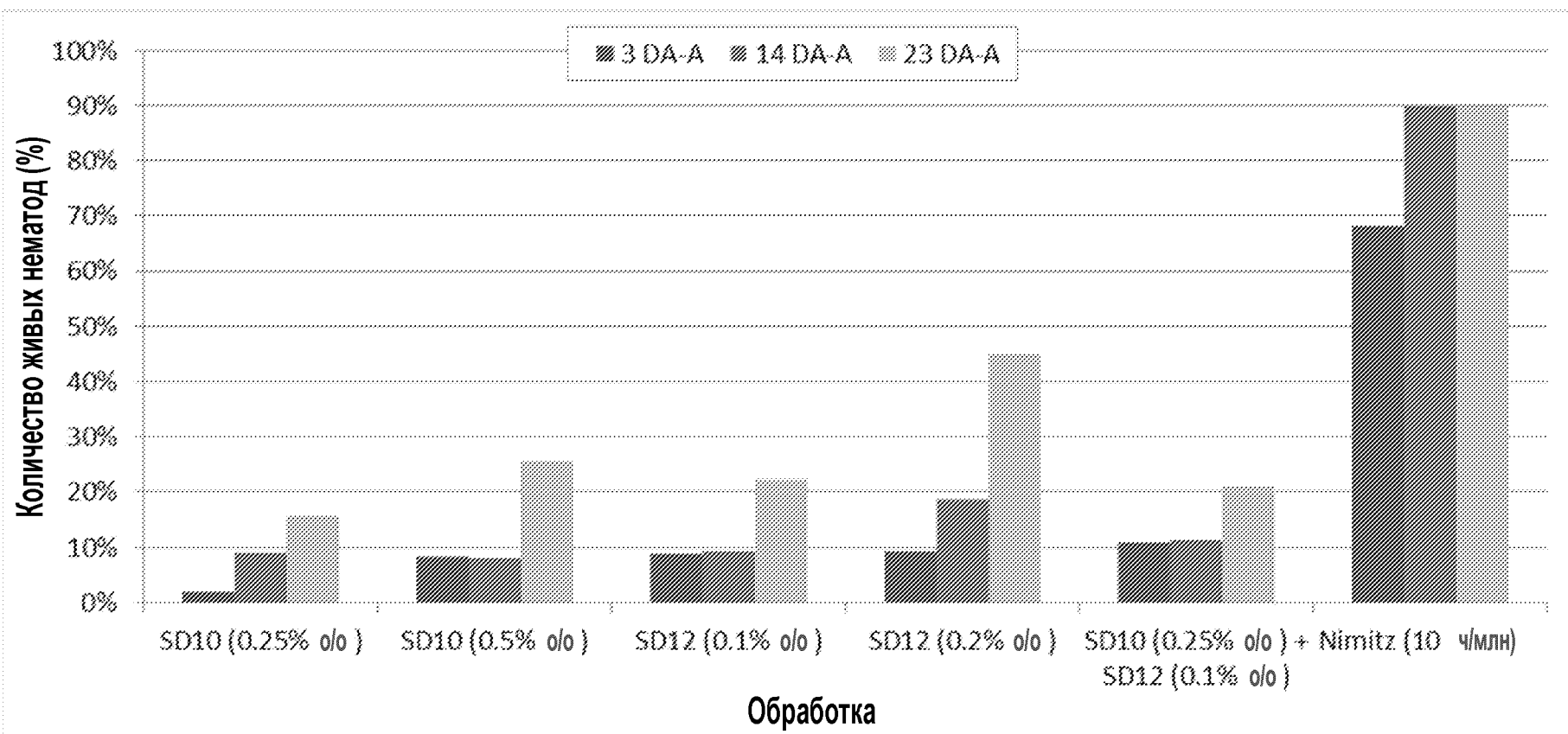
Показатель гибели в исследованиях с разными обработками
% гибели



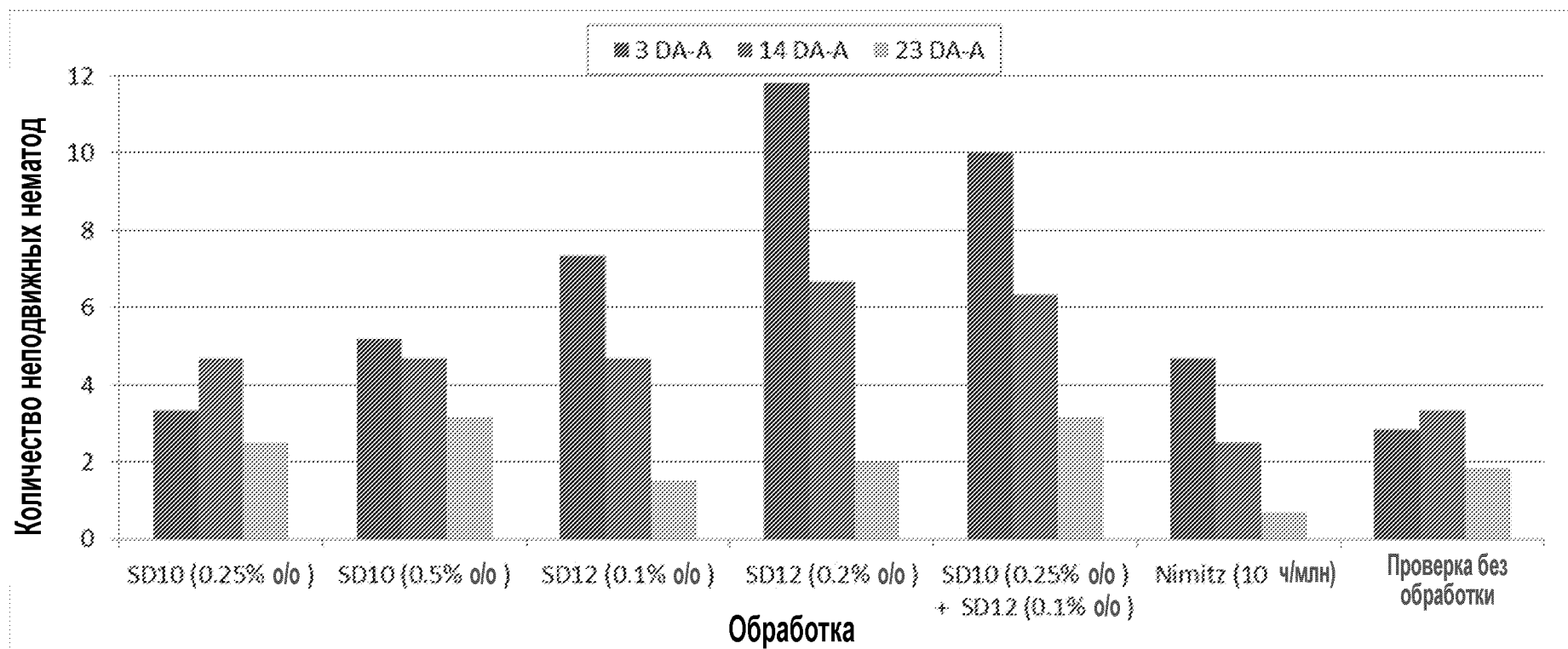
ФИГ. 2



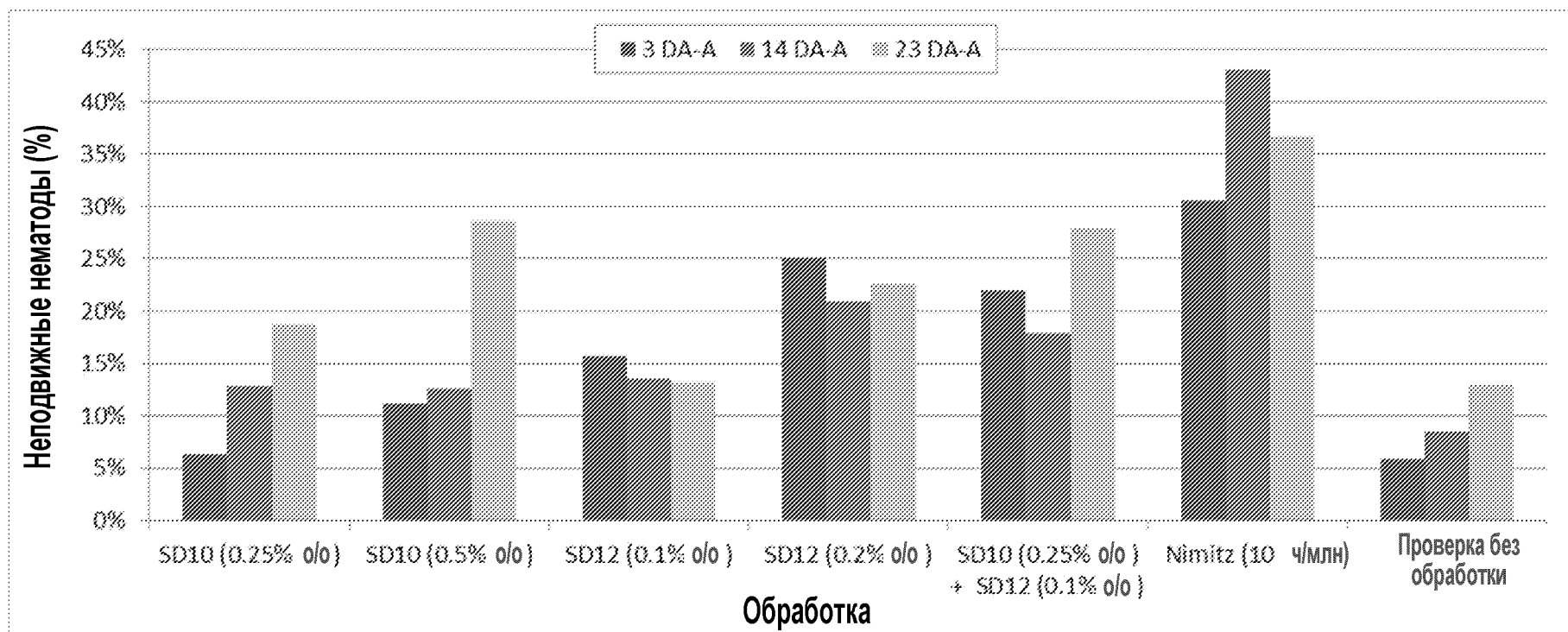
ФИГ. 3



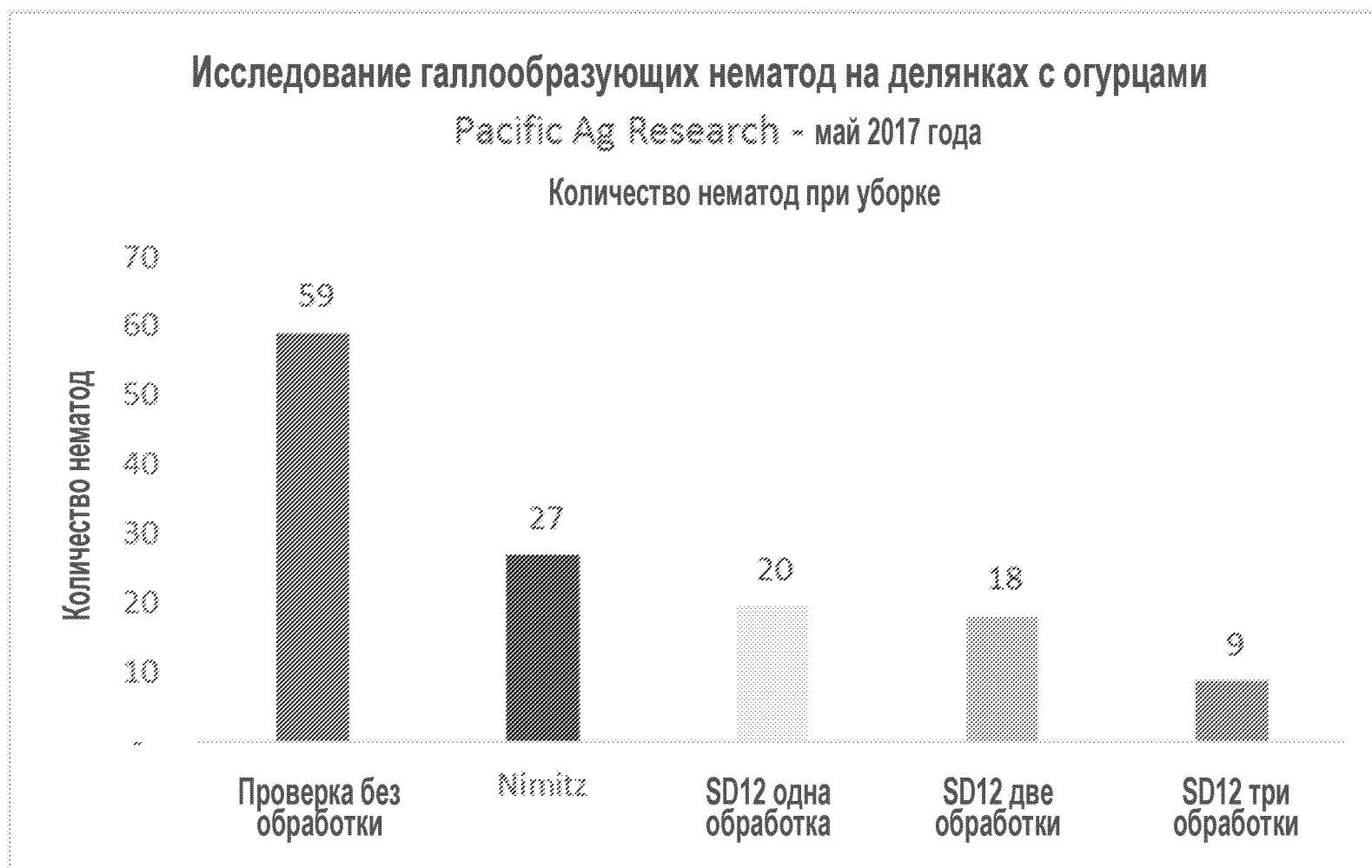
ФИГ. 4



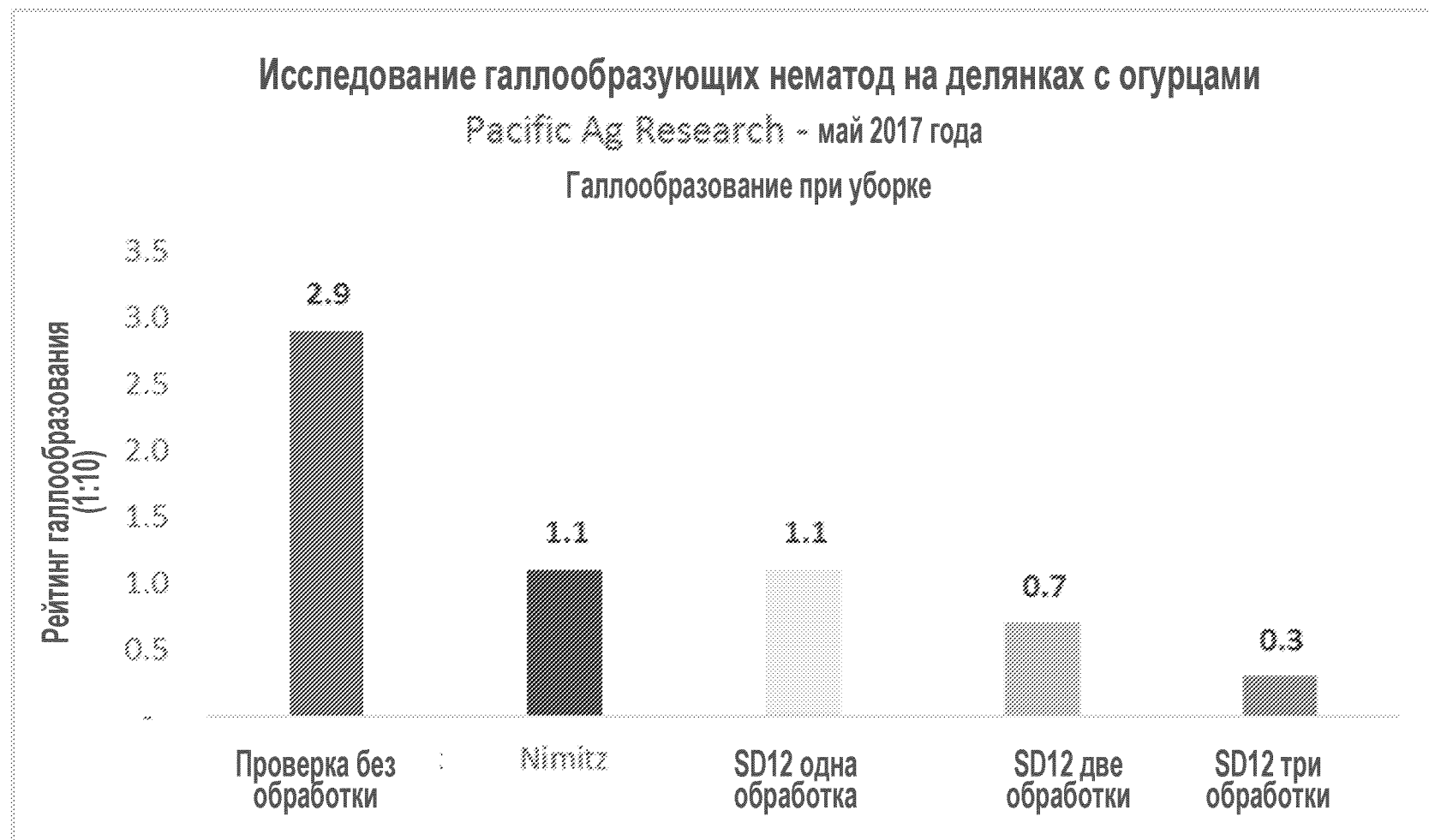
ФИГ. 5



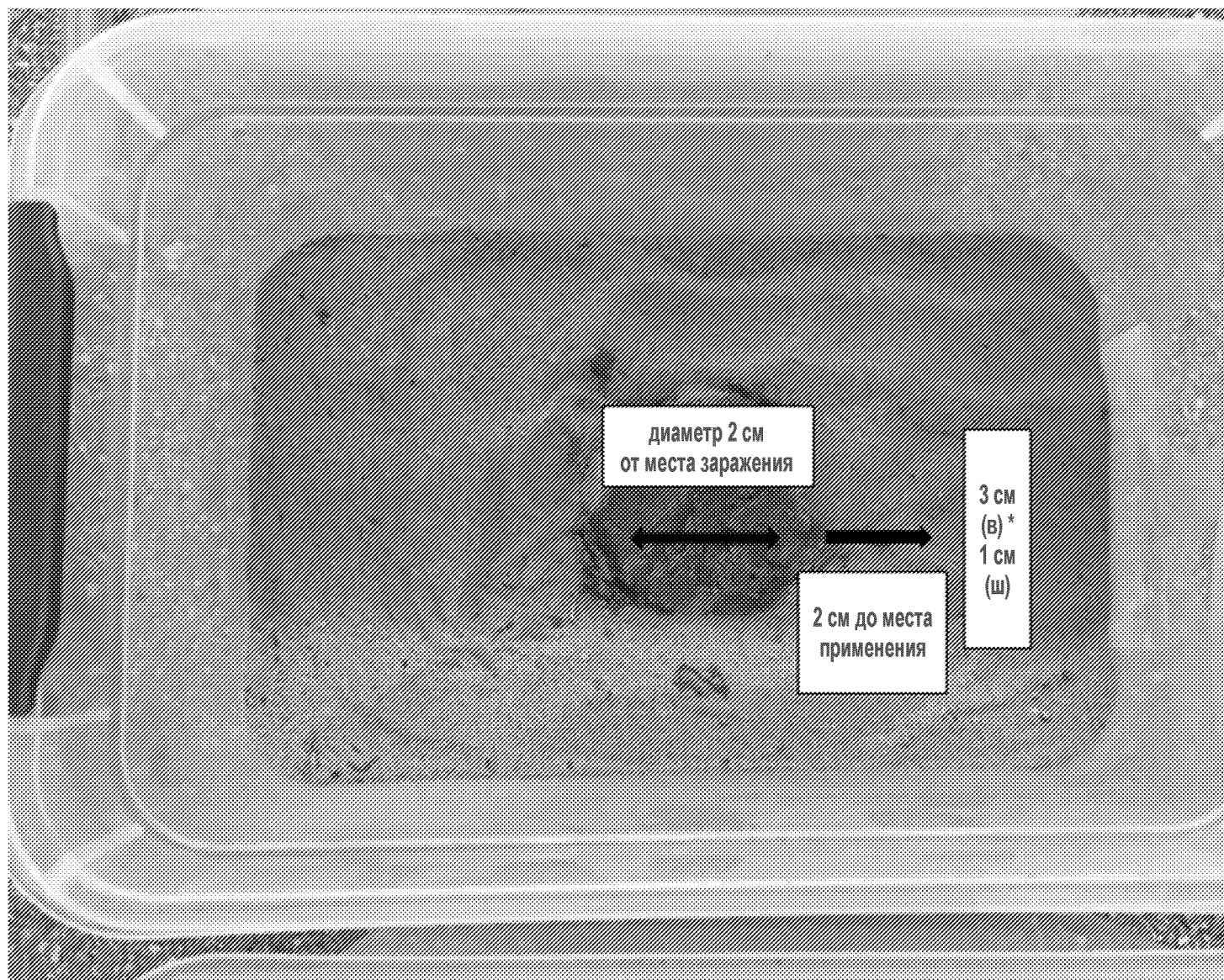
ФИГ. 6



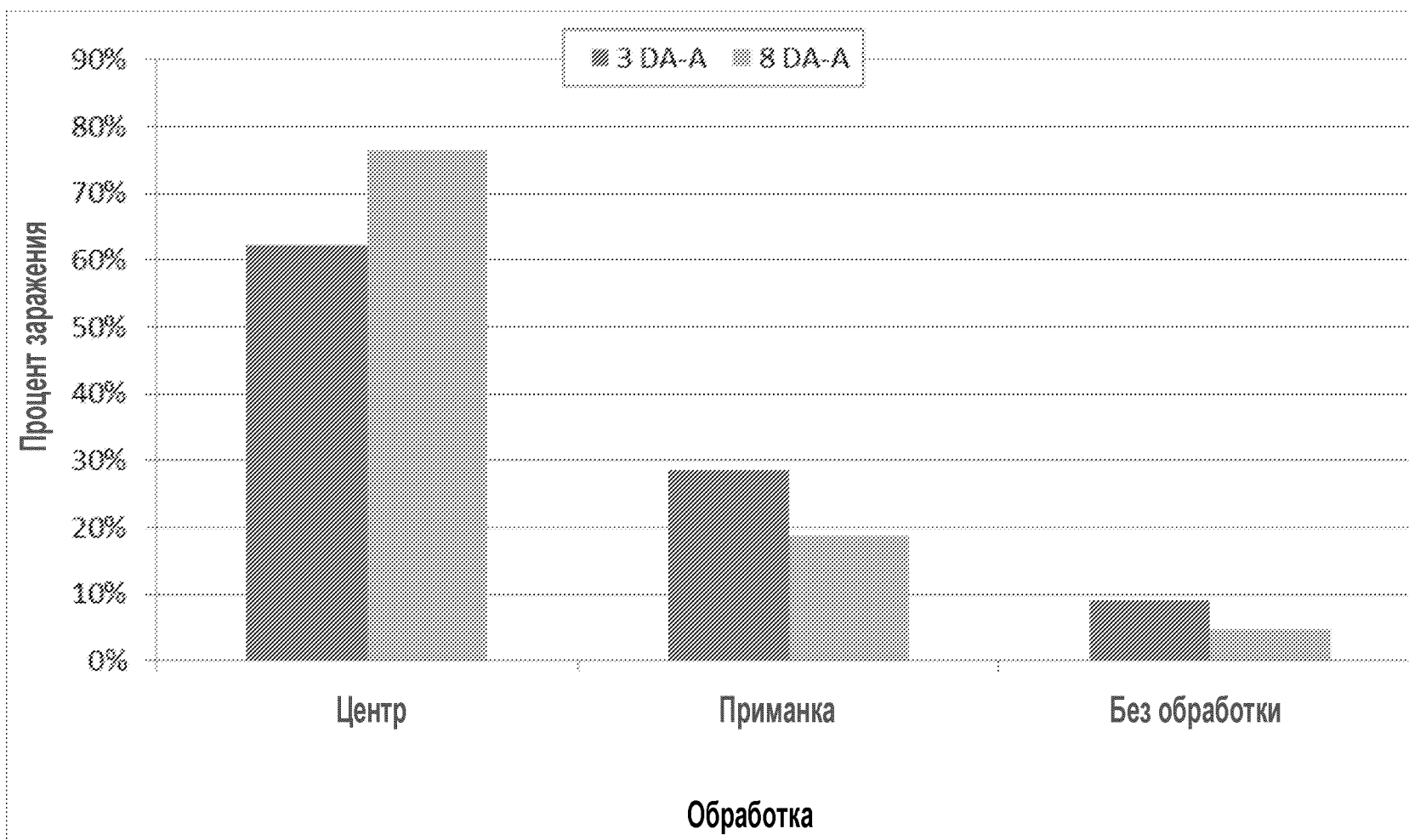
ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9



ФИГ. 10