



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0039462

(51)^{2020.01} A01N 63/22; A01P 1/00; A01G 7/06; (13) B
A01N 25/30

(21) 1-2020-01513

(22) 25/09/2018

(86) PCT/US2018/052519 25/09/2018

(87) WO 2019/067380 04/04/2019

(30) 62/564,517 28/09/2017 US

(45) 25/04/2024 433

(43) 25/08/2020 389

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

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

(72) FARMER, Sean (US); ALIBEK, Ken (US); MOLDAKOZHAYEV, Alibek (US).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU TRỊ CÁC BỆNH Ở THỰC VẬT GÂY RA BỞI VIRUT KHẢM

(57) Sáng chế đề cập đến các chế phẩm và phương pháp để điều trị một số mầm bệnh thực vật sử dụng các sản phẩm gốc vi sinh vật. Cụ thể, sáng chế đề cập đến việc điều trị các virus gây bệnh thực vật, bao gồm virus khảm, cũng như vi khuẩn gây bệnh thực vật, sử dụng các vi sinh vật có lợi và/hoặc các sản phẩm phụ sinh trưởng của chúng. Trong các phương án nhất định, các sản phẩm phụ sinh trưởng là các chất hoạt động bề mặt sinh học.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất chế phẩm và phương pháp để điều trị các bệnh ở thực vật gây ra bởi virus và vi khuẩn, cụ thể là, đề cập đến việc chế phẩm và phương pháp điều trị các bệnh ở thực vật gây ra bởi virus, bao gồm virus khảm, cũng như bệnh ở thực vật gây ra bởi vi khuẩn, sử dụng các vi sinh vật có lợi và/hoặc các sản phẩm phụ sinh trưởng của chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các virus khảm là nhóm các mầm bệnh thực vật gây nhiễm và có thể gây thiệt hại đáng kể cho hơn 150 loại thực vật khác nhau. Hàng triệu cây trồng đã có những phần, hoặc thậm chí toàn bộ cây trồng bị phá hủy bởi virus khảm. Các loại cây trồng phổ biến nhất có thể bị nhiễm virus khảm bao gồm khoai tây, bầu bí, đậu bắp, ớt, dưa chuột, dưa lưới, bí ngô, cà chua, cây thuốc lá, hoa hồng, hoa tulip, củ cải đường, cây mận, đậu và nhiều loại nữa.

Có nhiều loài virus thuộc danh mục các bệnh “khảm”, từng loài thuộc một trong các loại, ví dụ, *Begomovirus* (ví dụ, virus khảm lá sắn), *Potyvirus* (ví dụ, virus gây sần quả), *Tobamovirus* (ví dụ, virus khảm thuốc lá) và một số loại khác. Ví dụ về các loài virus khảm bao gồm virus khảm linh lăng, virus khảm củ cải, virus khảm sắn, virus khảm đậu đũa, virus khảm dưa chuột, virus khảm cây kê, virus gây sần quả mận, virus khảm bí, virus khảm thuốc lá, virus khảm hoa tulip và virus khảm bí ngòi vàng. Mặc dù hầu hết các loại virus này được xem là các virus ssARN, một số virus ssADN được xem là virus chưa được xác định.

Mặc dù nhiều loại virus này có tên “gắn” với thực vật cụ thể, nhưng thực tế, cùng loại virus có thể có lượng lớn vật chủ. Ví dụ, mặc dù virus khảm thuốc lá (TMV: tobacco mosaic virus) được đặt tên cho loại thực vật đầu tiên được phát hiện (thuốc lá), nhưng nó lây nhiễm hơn 150 loại thực vật khác nhau. Trong số các thực vật bị ảnh hưởng bởi TMV là các loại rau, cỏ dại và hoa. Cụ thể, cà chua, ớt và nhiều loại cây cảnh bị tấn công hàng năm bởi loại virus này.

Tổn hại do virus khảm xuất hiện đầu tiên dưới dạng những chiếc lá màu xanh lá

cây bị lốm đốm, xoắn hoặc bị biến dạng. Thông thường, trên những chiếc lá này sẽ phát triển những đốm màu vàng, xuất hiện thêm những lốm đốm, và cây có thể bị chậm phát triển, cụ thể là nếu bị nhiễm bệnh vào đầu mùa. Trong họ bầu bí (bí ngô, bầu, dưa chuột, bí), ví dụ, các khu vực bị ảnh hưởng cũng có thể được bao phủ bằng mụn cóc hoặc xen kẽ, vỏ của trái cây có thể bị héo và nhăn nhui. Mặc dù virus khảm có thể không giết chết thực vật, nhưng ảnh hưởng của nó đối với sự sinh trưởng và sức khỏe tổng thể của thực vật có thể ảnh hưởng lớn đến lượng sản phẩm có giá trị kinh tế được cung cấp bởi cây trồng. Ví dụ, trái cây có thể trở nên quá đắng để có thể ăn được, hoặc màu sắc, chất lượng hoặc làm phá vỡ quá trình làm chín trái cây.

Virut khảm trải qua mùa đông trên các loại thực vật bao gồm các tàn tích từ thực vật không được dọn sạch khỏi vườn hoặc cây trồng, cũng như các loài thực vật như cỏ bạc hà mèo, thương lục mỹ, cây bông tai và cây dưa chuột dại. Rệp và bọ cánh cứng dưa chuột truyền bệnh khi chúng ăn và di chuyển giữa những loại thực vật bị nhiễm bệnh và những thực vật khỏe mạnh. Virut cũng có thể lây lan qua hoạt động của con người, các dụng cụ và thiết bị. Do đó, rửa tay và khử trùng các dụng cụ làm vườn, cộc, thanh giăng, chậu, băng khay trồng trong nhà kính, v.v. bằng cách sử dụng thuốc tẩy là rất cần thiết cho người trồng để giảm nguy cơ ô nhiễm. Bệnh lây lan đầu mùa, số lượng thực vật bị thiệt hại nghiêm trọng do virus khảm càng nhiều. Hơn nữa, virus lây lan đặc biệt dễ dàng ở điều kiện ẩm ướt.

Ngoài các mầm bệnh virus gây bệnh thực vật, các mầm bệnh vi khuẩn gây bệnh thực vật cũng có thể gây ra các bệnh nghiêm trọng và gây thiệt hại về kinh tế. Tuy nhiên, trái ngược với các virus lây nhiễm vào bên trong tế bào chủ, vi khuẩn phát triển trong không gian giữa các tế bào thay vì xâm nhập chúng. Hầu hết các vi khuẩn gây bệnh thực vật thuộc về các chi sau: *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Acidovorax*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Streptomyces*, *Xylella*, *Spiroplasma*, và *Phytoplasma*. Các triệu chứng của sự lây nhiễm một số loài gây hại có thể bao gồm đốm, dạng khảm hoặc nốt mụn trên lá và quả, thối củ, mụn cây, phát triển quá mức, héo, đốm lá, thối và tàn rụi, nấm vảy, thối mục cây và thậm chí là chết cây.

Một số vi khuẩn gây bệnh thực vật tạo ra các độc tố hoặc truyền các protein đặc hiệu dẫn đến chết tế bào chủ hoặc chúng tạo ra các enzym phá vỡ các thành phần cấu trúc quan trọng của tế bào thực vật và các thành của chúng. Những loài gây hại này lây

lan theo nhiều cách khác nhau và có thể di chuyển xa, ví dụ, chúng có thể bị bắn ra xung quanh bởi mưa, hoặc mang theo gió, chim hoặc côn trùng, và giống như các virus có thể lây lan qua hoạt động của con người. Tuy nhiên, bất kể chúng được phát tán như thế nào, các mầm bệnh vi khuẩn phải có điểm bắt đầu, chẳng hạn như vết thương hoặc lỗ khí để xâm nhập vào bên trong thực vật.

Không có cách điều trị các bệnh do virus như virus khảm một khi thực vật bị nhiễm bệnh. Thông thường với các bệnh do vi khuẩn, trọng tâm không phải là chữa khỏi bệnh, mà thay vào đó là phòng ngừa nhiễm bệnh hoặc lây lan. Ví dụ, giảm số lượng côn trùng mang mầm bệnh tiếp xúc với thực vật hoặc giảm số lượng cỏ dại lâu năm hoặc các loại cây khác ở lân cận cây trồng hoặc lô đất có thể là biện pháp phòng ngừa hiệu quả; tuy nhiên, điều này thường đòi hỏi sử dụng thuốc trừ sâu hóa học hoặc thuốc diệt cỏ đậm đặc. Thuốc kháng sinh có thể được sử dụng để kiểm soát vi khuẩn nhất định, nhưng điều này có thể dẫn đến các chủng kháng thuốc. Các phương pháp hiệu quả nhất cho đến nay bao gồm việc sử dụng các thực vật được tạo khả năng chống lại các loại gây hại nhất định. Tuy nhiên, do số lượng lớn các loại virus và các loài vi khuẩn khác nhau có thể lây nhiễm cho thực vật, nên có thể khó bảo vệ chống lại nhiều mầm bệnh bằng phương pháp này.

Thiệt hại lớn về hại kinh tế có thể là kết quả của sự lây nhiễm rộng rãi của các thực vật và cây trồng từ các bệnh thực vật nhất định có thể lây lan khắp các khu vườn, mùa vụ và nhà kính. Điều này cũng có thể có tác động mạnh mẽ đến việc cung cấp các cây lương thực sẵn có cho người tiêu dùng. Vì vậy, cần có các phương pháp an toàn và thân thiện với môi trường để điều trị virus gây bệnh thực vật, bao gồm cả virus khảm, cũng như vi khuẩn gây bệnh thực vật.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các vi sinh vật, cũng như các sản phẩm phụ của sự sinh trưởng của chúng, như chất hoạt động bề mặt sinh học, để sử dụng trong điều trị một số bệnh nhiễm trùng thực vật. Cụ thể, sáng chế đề cập đến việc điều trị các virus gây bệnh thực vật, bao gồm virus khảm, cũng như vi khuẩn gây bệnh thực vật, sử dụng các vi khuẩn có lợi và/hoặc các sản phẩm phụ sinh trưởng của chúng. Ngoài ra, các phương pháp và sản phẩm gốc vi sinh vật của sáng chế thân thiện với môi trường, không độc hại và mang lại hiệu quả về chi phí.

Trong các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các chế phẩm gốc vi sinh vật, trong đó các chế phẩm chứa một hoặc nhiều vi sinh vật có lợi và/hoặc một hoặc nhiều sản phẩm phụ sinh trưởng của vi sinh vật. Chế phẩm cũng có thể bao gồm môi trường lên men trong đó các vi sinh vật có lợi và/hoặc sản phẩm phụ sinh trưởng được sản xuất. Các sản phẩm phụ sinh trưởng của vi sinh vật có thể là những sản phẩm được tạo ra bởi các vi sinh vật của chế phẩm, hoặc chúng có thể được sản xuất ở nơi khác và bổ sung vào chế phẩm.

Trong một phương án, chế phẩm chỉ bao gồm sản phẩm phụ sinh trưởng của vi sinh vật mà không có vi sinh vật có lợi. Ví dụ, trong một phương án, chế phẩm chỉ bao gồm canh lên men trong đó vi sinh vật có lợi được nuôi cấy.

Các sản phẩm phụ sinh trưởng của vi sinh vật có thể ở dạng tinh khiết hoặc thô. Trong các phương án được ưu tiên, sản phẩm phụ sinh trưởng là chất hoạt động bề mặt sinh học được lựa chọn từ các glycolipit (ví dụ, các sophorolipit, rhamnolipit, trehaloza lipit hoặc mannosylerythritol lipit) và các lipopeptit (ví dụ, surfactin, iturin, lichenysin và fengycin). Trong một phương án ưu tiên, sản phẩm phụ sinh trưởng là sophorolipit (SLP).

Trong một số phương án, các chất hoạt động bề mặt sinh học dạng thô có thể ở dạng hỗn hợp lỏng bao gồm phân lửng chất hoạt động bề mặt sinh học và canh lên men do nuôi cấy vi sinh vật sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học. Chất hoạt động bề mặt sinh học dạng thô và canh có thể chứa từ khoảng 0,001% đến khoảng 75%, từ khoảng 20% đến khoảng 70%, từ khoảng 35% đến khoảng 65%, từ khoảng 40% đến khoảng 60%, từ khoảng 45% đến khoảng 55%, hoặc khoảng 50% chất hoạt động bề mặt sinh học tinh khiết.

Trong các phương án nhất định, vi sinh vật có lợi theo sáng chế là vi sinh vật sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học. Trong các phương án cụ thể, vi sinh vật là nấm men sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học, ví dụ như *Starmerella bombicola*. Trong phương án khác, vi sinh vật là loại nấm men sát thủ sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học, ví dụ, *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*). Các nấm men này có khả năng sản xuất các chất hoạt động bề mặt glycolipit.

Trong một phương án, vi sinh vật có lợi là một loại vi khuẩn sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học không gây bệnh, ví dụ như *Bacillus subtilis* hoặc *Bacillus*

amyloliquefaciens. Cả hai loài này là loài sản xuất hiệu quả các chất hoạt động bề mặt sinh học lipopeptit nhất định.

Các sản phẩm gốc vi sinh vật có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp với các hợp chất khác giúp tăng cường điều trị virus cúm và các bệnh ở thực vật gây ra bởi vi khuẩn.

Trong các phương án nhất định, chất kết dính có thể được bổ sung vào điều trị để kéo dài sự kết dính của sản phẩm với lá cây. Ví dụ, chất gốc polysacarit, ví dụ, gồm xanthan, có thể được sử dụng làm chất kết dính cho các chế phẩm theo sáng chế.

Trong các phương án nhất định, các chế phẩm của sáng chế có ưu điểm hơn, ví dụ, các chất chuyển hóa vi sinh tinh khiết đơn lẻ. Những ưu điểm này có thể bao gồm một hoặc nhiều trong số những điều sau đây: nồng độ mannoprotein cao (chất nhũ hóa) như là một phần của bề mặt bên ngoài của thành tế bào nấm men; sự có mặt của beta-glucan (chất nhũ hóa) trong các thành tế bào nấm men; sự có mặt của các chất hoạt động bề mặt sinh học trong môi trường nuôi cấy; và sự có mặt của dung môi và/hoặc các chất chuyển hóa khác trong môi trường nuôi cấy (ví dụ, axit lactic, etanol, v.v.).

Sáng chế còn đề xuất phương pháp để nuôi cấy các chế phẩm gốc vi sinh vật. Các chế phẩm có thể thu được thông qua các quá trình nuôi cấy từ quy mô nhỏ đến lớn. Các quá trình nuôi cấy này bao gồm nhưng không giới hạn ở nuôi cấy/lên men chìm, lên men trạng thái rắn (SSF) và lai (ví dụ, hệ thống ma trận chìm), các sửa đổi và/hoặc kết hợp chúng.

Sáng chế có thể được sử dụng trong nhiều ứng dụng đặc biệt vì, ví dụ, khả năng cung cấp và sử dụng hiệu quả canh lên men tươi với các chất chuyển hóa hoạt động; hỗn hợp của các tế bào, mầm giống sinh vật và/hoặc các thành phần tế bào với canh lên men; chế phẩm với các tế bào sống; các chế phẩm có mật độ tế bào cao bao gồm các tế bào sống; các sản phẩm gốc vi sinh vật ở đơn đặt hàng ngắn; và các sản phẩm gốc vi sinh vật ở các địa điểm xa.

Trong một số phương án, các phương pháp được đề xuất để điều trị virus cúm và/hoặc các bệnh thực vật gây ra bởi vi khuẩn, trong đó các phương pháp bao gồm việc tiếp xúc với vi sinh vật có lợi và/hoặc sản phẩm phụ sinh trưởng của vi sinh vật với một phần của cây bị nhiễm bệnh. Trong một số phương án nhất định, phương pháp này bao gồm việc áp dụng chế phẩm gốc vi sinh vật theo sáng chế vào thực vật.

Chế phẩm gốc vi sinh vật có thể được tiếp xúc trực tiếp với thực vật và/hoặc với môi trường xung quanh thực vật. Trong các phương án nhất định, các chế phẩm được tiếp xúc với lá hoặc tán lá của thực vật bị nhiễm bệnh. Trong các phương án khác, các chế phẩm được tiếp xúc với bất kỳ phần nào của thực vật bị nhiễm bệnh, ví dụ, rễ, hạt, thân, hoa hoặc quả. Hơn nữa, các chế phẩm có thể được tiếp xúc với toàn bộ thực vật, và/hoặc với môi trường xung quanh thực vật, chẳng hạn như đất.

Các vi sinh vật có thể sống (hoặc tồn tại) hoặc bất hoạt tại thời điểm áp dụng. Khi sử dụng các vi sinh vật sống, các vi sinh vật có thể sinh trưởng tại chỗ và sản xuất các hợp chất hoạt động tại chỗ. Do đó, nồng độ vi sinh vật cao có thể đạt được dễ dàng và liên tục tại nơi điều trị (ví dụ, vườn cây). Theo cách này, các phương pháp có thể bao gồm bổ sung các chất để tăng cường sự sinh trưởng của vi sinh vật trong quá trình ứng dụng. Trong một phương án, các chất được bổ sung vào là các nguồn dinh dưỡng, ví dụ như các nguồn nitơ, nitrat, phospho, magie và/hoặc cacbon.

Trong một số phương án, phương pháp này bao gồm việc cho thực vật bị nhiễm bệnh tiếp xúc với vi sinh vật và/hoặc các sản phẩm phụ sinh trưởng trong môi trường lên men mà chúng được sản xuất. Trong một số phương án, phương pháp đơn giản là bao gồm việc áp dụng môi trường lên men và/hoặc sản phẩm phụ của vi sinh vật cho thực vật. Sản phẩm phụ sinh trưởng có thể được tinh chế hoặc ở dạng thô. Trong các phương án được ưu tiên, sản phẩm phụ sinh trưởng là chất hoạt động bề mặt sinh học, như glycolipit hoặc lipopeptit. Trong một phương án ưu tiên, chất hoạt động bề mặt sinh học là sophorolipit.

Phương pháp còn có thể bao gồm việc áp dụng một hoặc nhiều chất để tăng cường tác dụng kiểm soát mầm bệnh, ví dụ như chất kết dính để kéo dài sự kết dính của sản phẩm với thực vật.

Hơn nữa, sáng chế có thể được sử dụng mà không giải phóng lượng lớn các hợp chất vô cơ vào môi trường. Ngoài ra, các chế phẩm và phương pháp sử dụng các thành phần có khả năng phân hủy sinh học và an toàn độc tính. Do đó, sáng chế có thể được sử dụng để điều trị virus và vi khuẩn gây các bệnh cho thực vật như phương pháp điều trị “xanh”.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất các vi sinh vật, cũng như các sản phẩm phụ sinh trưởng của

chúng, như các chất hoạt động bề mặt sinh học, để sử dụng trong điều trị một số bệnh nhiễm trùng thực vật. Cụ thể, sáng chế đề xuất các chế phẩm và phương pháp xử lý các virus gây bệnh thực vật, bao gồm virus khảm, cũng như vi khuẩn gây bệnh thực vật, sử dụng các vi sinh vật có lợi và/hoặc các sản phẩm phụ sinh trưởng của chúng. Ngoài ra, các phương pháp và sản phẩm gốc vi sinh vật của sáng chế thân thiện với môi trường, không độc hại và mang lại hiệu quả chi phí.

Như được sử dụng ở đây, “chế phẩm gốc vi sinh vật” có nghĩa là chế phẩm chứa các thành phần được tạo ra do sự sinh trưởng sinh trưởng của vi sinh vật hoặc nuôi cấy tế bào khác. Do đó, chế phẩm gốc vi sinh vật có thể chứa chính các vi sinh vật và/hoặc sản phẩm phụ sinh trưởng của vi sinh vật. Các vi sinh vật có thể là ở trạng thái sinh dưỡng, bào tử, dạng sợi, ở bất kỳ dạng nào giống vi sinh vật nào khác, hoặc sự kết hợp của chúng. Các vi sinh vật có thể là sinh vật phù du hoặc ở dạng màng sinh học hoặc hỗn hợp của cả hai. Các sản phẩm phụ của sự sinh trưởng vi sinh vật có thể là, ví dụ, các chất chuyển hóa (ví dụ, các chất hoạt động bề mặt sinh học), các thành phần màng tế bào, các protein được biểu hiện và/hoặc các thành phần tế bào khác. Các vi sinh vật có thể còn nguyên vẹn hoặc bị ly giải. Các tế bào có thể có mặt, ví dụ với nồng độ 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} hoặc nhiều hơn các tế bào hoặc mầm giống trên mỗi mililit của chế phẩm. Như được sử dụng trong sáng chế, mầm giống là bất kỳ phần nào của vi sinh vật mà từ đó sinh vật mới và/hoặc đã trưởng thành có thể sinh trưởng, bao gồm nhưng không giới hạn ở các tế bào, bào tử đính, bào tử nang, bào tử (ví dụ, bào tử sinh sản, nội bào tử và ngoại bào tử), sợi nấm, chồi và hạt.

Sáng chế còn đề xuất các “sản phẩm gốc vi sinh vật” là những sản phẩm sẽ được ứng dụng trong thực tế để đạt được kết quả mong muốn. Sản phẩm gốc vi sinh vật có thể chỉ đơn giản là chế phẩm gốc vi sinh được thu hoạch từ quá trình nuôi cấy vi sinh vật. Ngoài ra, sản phẩm gốc vi sinh vật có thể còn bao gồm các thành phần được bổ sung. Các thành phần bổ sung này có thể bao gồm, ví dụ, các chất ổn định, chất đệm, chất mang (ví dụ, nước hoặc các dung dịch nước muối), các chất dinh dưỡng được bổ sung vào để hỗ trợ cho sinh trưởng của vi sinh vật, chất sinh trưởng phi dinh dưỡng và/hoặc các chất tạo điều kiện theo dõi vi khuẩn và/hoặc các thành phần trong môi trường mà vi khuẩn được áp dụng. Sản phẩm gốc vi sinh cũng có thể chứa hỗn hợp của các chế phẩm gốc vi sinh vật. Sản phẩm gốc vi sinh vật cũng có thể chứa một hoặc nhiều

thành phần của chế phẩm gốc vi sinh vật được xử lý theo một số cách nào đó như lọc, ly tâm, ly giải, sấy khô, tinh chế và tương tự.

Như được sử dụng trong sáng chế, “thu hoạch” đề cập đến việc loại bỏ một số hoặc tất cả các chế phẩm gốc vi sinh vật khỏi bề sinh trưởng.

Như được sử dụng trong sáng chế, “màng sinh học” là tổ hợp các vi sinh vật, ví dụ như vi khuẩn, trong đó các tế bào kết dính với nhau. Các tế bào trong màng sinh học khác biệt về mặt sinh lý với những tế bào phù du của cùng một loại sinh vật, đó là các đơn tế bào có thể nổi hoặc bơi trong môi trường chất lỏng.

Như được sử dụng trong sáng chế, các thuật ngữ “phân lập” hoặc “tinh chế” phân tử axit nucleic, polynucleotit, polypeptit, protein, hợp chất hữu cơ, như phân tử nhỏ (ví dụ, được mô tả bên dưới) hoặc các hợp chất khác không chứa các hợp chất khác, như thành phần tế bào, mà nó được liên kết tự nhiên. Ví dụ, polynucleotit được tinh chế hoặc phân lập (axit ribonucleic (ARN) hoặc axit deoxyribonucleic (ADN)) không chứa gen hoặc trình tự liên kề nó ở trạng thái tự nhiên. Polypeptit được tinh chế hoặc phân lập không chứa các axit amin hoặc trình tự liên kề nó ở trạng thái tự nhiên. Chúng vi sinh vật được tinh chế hoặc phân lập được loại bỏ khỏi môi trường mà nó tồn tại trong tự nhiên. Do đó, chúng phân lập có thể tồn tại như, ví dụ, nuôi cấy tinh khiết về mặt sinh học, hoặc là bào tử (hoặc các dạng khác của chúng) kết hợp với chất mang.

Như được sử dụng trong sáng chế, “môi trường nuôi cấy thuần khiết về mặt sinh học” là môi trường nuôi cấy được phân lập từ các vật liệu có liên quan đến tự nhiên. Trong một phương án được ưu tiên, môi trường nuôi cấy đã được phân lập từ tất cả các tế bào sống khác. Trong các phương án được ưu tiên khác, môi trường nuôi cấy thuần khiết về mặt sinh học có những đặc điểm lợi thế so với môi trường nuôi cấy cùng loại vi sinh vật như nó tồn tại trong tự nhiên. Các đặc điểm lợi thế có thể là, ví dụ, tăng cường sản xuất một hoặc nhiều sản phẩm phụ sinh trưởng của chúng.

Trong các phương án nhất định, các hợp chất được tinh chế chứa ít nhất 60% theo khối lượng của hợp chất quan tâm. Tốt nhất là, chế phẩm chứa ít nhất 75%, tốt hơn là chứa ít nhất 90%, và tốt nhất là chứa ít nhất 99% theo khối lượng hợp chất quan tâm. Ví dụ, hợp chất được tinh chế chứa một hợp chất chứa ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 98%, 99%, hoặc 100% (w/w) hợp chất mong muốn theo khối lượng. Độ tinh khiết được đo bằng bất kỳ phương pháp tiêu chuẩn thích hợp nào, ví dụ bằng sắc ký cột, sắc

ký lớp mỏng, hoặc phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC: High-performance liquid chromatography).

“Chất chuyển hóa” đề cập đến bất kỳ chất nào được tạo ra bởi quá trình trao đổi chất (ví dụ, sản phẩm phụ sinh trưởng) hoặc chất cần thiết để tham gia vào quá trình trao đổi chất cụ thể. Chất chuyển hóa có thể là hợp chất hữu cơ bao gồm là nguyên liệu ban đầu (ví dụ, glucoza), nguyên liệu trung gian (ví dụ, axetyl-CoA), hoặc và sản phẩm cuối (ví dụ, n-butanol) của quá trình chuyển hóa. Ví dụ các chất chuyển hóa bao gồm nhưng không giới hạn ở các enzym, chất độc tố, axit, dung môi, rượu, protein, cabohydrat, vitamin, khoáng chất, nguyên tố vi lượng, axit amin, polyme và các chất hoạt động bề mặt.

Phạm vi được đề xuất trong sáng chế được hiểu là viết tắt cho tất cả các giá trị trong phạm vi. Ví dụ, phạm vi từ 1 đến 20 được hiểu là bao gồm bất kỳ số nào, tổ hợp của các số, hoặc phạm vi phụ từ nhóm bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 cũng như tất cả các giá trị thập phân xen giữa các số nguyên nói trên, như là, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, và 1,9. Đối với phạm vi phụ, “các phạm vi phụ lồng nhau” được mở rộng từ một trong hai điểm cuối của phạm vi được dự tính cụ thể. Ví dụ, phạm vi phụ lồng nhau của phạm vi ưu tiên từ 1 đến 50 có thể bao gồm 1 đến 10, 1 đến 20, 1 đến 30, và 1 đến 40 theo một hướng, hoặc 50 đến 40, 50 đến 30, 50 đến 20 và 50 đến 10 theo hướng khác.

Như được sử dụng trong sáng chế, “giảm xuống” đề cập tới sự thay đổi tiêu cực của ít nhất 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% hoặc 100%.

Trong sáng chế “tham khảo” nghĩa là điều kiện tiêu chuẩn hoặc đối chứng.

Như được sử dụng trong sáng chế, “chất hoạt động bề mặt” đề cập tới hợp chất làm giảm sức căng bề mặt (hoặc sức căng mặt phân cách) giữa hai chất lỏng hoặc giữa chất lỏng và chất rắn. Chất hoạt động bề mặt hoạt động như là chất tẩy rửa, chất làm ướt, chất nhũ hóa, chất tạo bọt và/hoặc chất phân tán. Chất hoạt động bề mặt được sản xuất bởi các vi sinh vật được gọi là “chất hoạt động bề mặt sinh học”.

Như được sử dụng trong sáng chế, “nông nghiệp” có nghĩa là trồng trọt và nhân giống các cây trồng và/hoặc nấm làm thực phẩm, chất xơ, nhiên liệu sinh học, thuốc, mỹ phẩm, chất bổ sung, mục đích trang trí và các mục đích sử dụng khác. Theo sáng chế, nông nghiệp cũng có thể bao gồm trồng trọt, làm cảnh, làm vườn, bảo tồn thực vật,

trồng cây ăn quả và trồng cây. Nông nghiệp còn bao gồm chăm sóc, giám sát và cải tạo đất.

Như được sử dụng trong sáng chế, sinh vật “gây bệnh” là bất kỳ sinh vật nào có khả năng gây bệnh ở sinh vật khác. Thông thường, các sinh vật gây bệnh là các tác nhân truyền nhiễm và có thể bao gồm, ví dụ, vi khuẩn, các virus, nấm, nấm mốc, động vật nguyên sinh, prion, ký sinh trùng, giun sán và tảo.

Như được sử dụng trong sáng chế, “loài gây hại” có thể là bất kỳ sinh vật nào, không phải là con người, có tính phá hoại, gây hại và/hoặc gây bất lợi cho con người hoặc mối quan tâm của con người (ví dụ, nông nghiệp, làm vườn, chăn nuôi, nuôi trồng thủy sản). Trong một số, nhưng không phải tất cả các trường hợp, loài gây hại có thể là sinh vật gây bệnh. Loài gây hại có thể gây ra hoặc là vectơ nhiễm trùng, nhiễm ký sinh, hoặc bệnh, hoặc chúng có thể đơn giản ăn hoặc gây ra tác hại vật lý khác cho mô sống. Các loài gây hại có thể là sinh vật đơn bào hoặc đa bào bao gồm nhưng không giới hạn ở virus, nấm, vi khuẩn, ký sinh trùng và/hoặc tuyến trùng.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “điều trị” dùng để cập đến việc loại bỏ, suy giảm, cải thiện hoặc đẩy lùi mức độ, dấu hiệu hoặc triệu chứng của tình trạng, bệnh hoặc rối loạn. Điều trị có thể bao gồm nhưng không yêu cầu ở chữa khỏi hoàn toàn bệnh, tình trạng hoặc rối loạn, có nghĩa là điều trị cũng có thể bao gồm loại bỏ một phần, cải thiện, suy giảm, cải tiến hoặc đẩy lùi. Hơn nữa, điều trị có thể bao gồm trì hoãn sự xuất hiện của các dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh, tình trạng hoặc rối loạn, hoặc trì hoãn sự tiến triển của bệnh, tình trạng hoặc rối loạn đến tình trạng bệnh, tình trạng hoặc rối loạn nặng hơn.

Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “kiểm soát” được sử dụng để chỉ mầm bệnh hoặc vật gây hại mở rộng đến hành động tiêu diệt, vô hiệu hóa, làm bất động hoặc giảm số lượng mầm bệnh và/hoặc vật gây hại, hoặc nói cách khác là làm cho mầm bệnh và/hoặc vật gây hại về căn bản không có khả năng gây bệnh hoặc tác hại khác.

Thuật ngữ chuyển tiếp “gồm có” đồng nghĩa với “bao gồm”, hoặc “chứa”, bao gồm tất cả hoặc từ đầu đến cuối và không loại trừ các yếu tố hoặc các bước phương pháp bổ sung, không được liệt kê. Ngược lại, cụm từ chuyển tiếp “được tạo bởi” loại trừ bất kỳ yếu tố, bước, hoặc thành phần nào không được chỉ ra trong yêu cầu bảo hộ. Cụm từ chuyển tiếp “chủ yếu được tạo bởi” giới hạn phạm vi của yêu cầu bảo hộ đối với các chế

phẩm hoặc các bước được chỉ ra “và những thứ không ảnh hưởng thiết yếu đến đặc tính cơ bản và mới của sáng chế được bảo hộ”.

Trừ khi được quy định cụ thể hoặc rõ ràng ngữ cảnh, như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “hoặc” được hiểu là bao gồm.

Trừ khi được quy định cụ thể hoặc rõ ràng từ ngữ cảnh, như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “khoảng” được hiểu là trong phạm vi của dung sai thông thường trong kỹ thuật, ví dụ trong phạm vi 2 độ lệch chuẩn của giá trị trung bình. Khoảng có thể được hiểu là trong 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, hoặc 0,01% của giá trị đã nêu.

Việc liệt kê danh sách các nhóm hóa học trong bất kỳ định nghĩa nào về tham biến trong sáng chế bao gồm các định nghĩa về tham biến đó như bất kỳ nhóm đơn lẻ hoặc sự kết hợp của các nhóm được liệt kê. Việc liệt kê phương án cho tham biến hoặc khía cạnh trong sáng chế bao gồm phương án đó như bất kỳ phương án đơn lẻ nào hoặc kết hợp với bất kỳ phương án hoặc các phần khác của nó.

Tất cả các tài liệu tham khảo được trích dẫn ở đây đều được kết hợp bằng cách tham khảo toàn bộ.

Các chế phẩm gốc vi sinh vật

Sáng chế đề xuất các chế phẩm gốc vi sinh vật, trong đó các chế phẩm chứa một hoặc nhiều vi sinh vật có lợi và/hoặc một hoặc nhiều sản phẩm phụ sinh trưởng của vi sinh vật. Chế phẩm có thể chứa môi trường lên men trong đó các vi sinh vật và/hoặc sản phẩm phụ sinh trưởng được sản xuất. Sản phẩm phụ sinh trưởng của vi sinh vật có thể là những sản phẩm được tạo ra bởi các vi sinh vật của chế phẩm, hoặc chúng có thể được sản xuất ở nơi khác và bổ sung vào chế phẩm.

Ngoài ra, các chế phẩm gốc vi sinh vật theo sáng chế không độc hại (ví dụ, độc tính khi ăn lớn hơn 5 g/kg) và có thể được áp dụng ở nồng độ cao mà không gây kích ứng, ví dụ da hoặc đường tiêu hóa. Do đó, sáng chế đặc biệt hữu ích khi áp dụng các chế phẩm gốc vi sinh vật xảy ra với sự có mặt của các sinh vật sống, chẳng hạn như nông dân và người trồng trọt.

Trong các phương án nhất định, sáng chế sử dụng vi sinh vật sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học. Các vi sinh vật có lợi có thể ở dạng hoạt động hoặc bất hoạt, hoặc

chế phẩm có thể bao gồm sự kết hợp của các vi sinh vật hoạt động và bất hoạt.

Trong các phương án cụ thể, vi sinh vật là nấm men sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học, ví dụ *Starmerella bombicola*. Trong phương án khác, vi sinh vật là nấm men sát thủ sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học, ví dụ, *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*). Những nấm men này là loài sản xuất hiệu quả các chất hoạt động bề mặt glycolipit.

Trong một phương án, vi sinh vật có lợi là vi khuẩn sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học, như *Bacillus subtilis* hoặc *Bacillus amyloliquefaciens*. Những loài này là loài sản xuất hiệu quả các chất hoạt động bề mặt sinh học lipopeptit nhất định.

Trong các phương án nhất định, chế phẩm có thể chứa canh lên men có chứa môi trường nuôi cấy sống và/hoặc bất hoạt và/hoặc các chất chuyển hóa của vi sinh vật được sản xuất bởi vi sinh vật và/hoặc bất kỳ chất dinh dưỡng còn lại nào. Sản phẩm của quá trình lên men có thể được sử dụng trực tiếp mà không cần chiết xuất hoặc tinh chế. Nếu muốn, chiết xuất và tinh chế có thể dễ dàng đạt được bằng cách sử dụng các phương pháp hoặc kỹ thuật chiết xuất và/hoặc tinh chế tiêu chuẩn được mô tả trong tài liệu.

Hơn nữa, chế phẩm có thể, ví dụ, ít nhất, 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, hoặc 100% theo trọng lượng canh lên men. Hàm lượng sinh khối của canh lên men có thể, ví dụ từ 5 g/l đến 180 g/l trở lên, hoặc bất kỳ các tỷ lệ phần nào nằm giữa từ 0% đến 100%. Trong một phương án, hàm lượng các chất rắn của canh là từ 10 g/l đến 150 g/l.

Trong một phương án, chế phẩm chỉ bao gồm sản phẩm phụ sinh trưởng vi sinh vật. Nó có thể ở dạng tinh khiết hoặc thô (ví dụ, chưa tinh chế).

Trong một số phương án, sản phẩm phụ sinh trưởng của chế phẩm theo sáng chế là chất hoạt động bề mặt sinh học. Các chất hoạt động bề mặt sinh học có thể là, ví dụ, các chất hoạt động bề mặt sinh học glycolipit, bao gồm các sophorolipit (SLP), mannosylerythritol lipit (MEL), rhamnolipit (RLP) và/hoặc trehaloza lipit (TL). Các chất hoạt động bề mặt sinh học cũng có thể là các lipopeptit, ví dụ như surfactin, iturin, fengycin và/hoặc lichenysin.

Trong các phương án nhất định, glycolipit là SLP, MEL hoặc kết hợp của chúng. MEL được sản xuất nhiều bởi, ví dụ, *Pseudozyma aphidis*. SLP được sản xuất bởi, ví dụ, các nấm men *Starmerella* và các nấm men *Pichia*.

Trong các phương án nhất định, các chất hoạt động bề mặt sinh học là SLP. Có ít nhất tám sophorolipit có cấu trúc khác nhau. Thành phần hóa học SLP được hình thành bởi sophoroza và axit béo hoặc một nhóm este. Macrolacton và các cấu trúc axit tự do được axetyl hóa đến các mức độ khác nhau tại vị trí hydroxyl chính của vòng sophoroza. Thành phần chính của sophorolipit là axit 17-hydroxyoctadecanoic và lacton tương ứng của nó. Ngoài ra, các axit béo C-18 không bão hòa của axit oleic có thể được chuyển không đổi thành các sophorolipit.

Trong một số phương án, hỗn hợp tự nhiên của các sophorolipit có thể được tổng hợp bằng cách lên men *S. bombicola*.

Trong một số phương án, các chất hoạt động bề mặt dạng thô có thể ở dạng hỗn hợp lỏng bao gồm chất hoạt động bề mặt sinh học lắng trong canh lên men do nuôi cấy vi sinh vật sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học. Dung dịch chất hoạt động bề mặt sinh học dạng thô này có thể chứa từ khoảng 0,001% đến khoảng 75%, từ khoảng 30% đến khoảng 70%, từ khoảng 35% đến khoảng 65%, từ khoảng 40% đến khoảng 60%, từ khoảng 45% đến khoảng 55%, hoặc khoảng 50% chất hoạt động bề mặt sinh học tinh khiết.

Trong các phương án nhất định, nồng độ của chất hoạt động bề mặt sinh học, ví dụ, SLP, trong chế phẩm theo sáng chế nằm trong khoảng từ 0,001% đến 5,0%, tốt nhất là từ 0,1% đến 0,5% hoặc 0,2%.

Các vi sinh vật có lợi và các chế phẩm gốc vi sinh vật của sáng chế có một số đặc tính hữu ích để điều trị các bệnh thực vật gây ra bởi virus và vi khuẩn, bao gồm cả virus khảm. Ví dụ, các chất hoạt động bề mặt sinh học theo sáng chế có thể ức chế sự bám dính của vi sinh vật vào nhiều bề mặt khác nhau, ngăn chặn sự hình thành của các màng sinh học và có thể có đặc tính nhũ hóa và khử nhũ tương mạnh.

Trong các phương án nhất định, các chế phẩm của sáng chế có lợi thế hơn, ví dụ, các chất chuyển hóa vi sinh tinh khiết, do một hoặc nhiều lợi thế sau: nồng độ mannoprotein cao (chất nhũ hóa) như một phần của bề mặt ngoài của thành tế bào nấm men; sự có mặt của beta-glucan (cũng là chất nhũ hóa) trong các thành tế bào nấm men; và sự có mặt của các chất hoạt động bề mặt sinh học, các dung môi và/hoặc các chất chuyển hóa khác trong môi trường nuôi cấy (ví dụ, axit lactic, etanol, v.v.).

Các chế phẩm khác có thể được bổ sung vào chế phẩm gốc vi sinh vật để tăng

cường hoạt tính kháng lại mầm bệnh. Tốt hơn là, các chất phụ gia này được coi là hữu cơ hoặc thân thiện với môi trường. Ví dụ, các chất kết dính, hợp chất chống virus cho người/động vật, hợp chất kháng khuẩn, tinh dầu, terpen, chất nhũ hóa, chất chelat hóa hoặc bất kỳ chất chống lại mầm bệnh nào khác có thể được đưa vào chế phẩm.

Các chất phụ gia cũng có thể bao gồm các chất đệm, chất mang, các chế phẩm gốc vi sinh vật khác được sản xuất tại cùng hoặc khác địa điểm, các chất điều chỉnh độ nhớt, chất bảo quản, chất dinh dưỡng cho sự sinh trưởng của vi sinh vật, chất theo dõi, bioxit, các vi sinh vật khác, chất nhũ hóa, chất bôi trơn, chất kiểm soát độ hòa tan, chất điều chỉnh độ pH, chất bảo quản, chất ổn định và chất chống ánh sáng cực tím.

Trong một phương án, chế phẩm còn có thể chứa các chất đệm, bao gồm các axit hữu cơ và axit amin hoặc muối của chúng, để ổn định độ pH gần giá trị tối ưu. Các chất đệm thích hợp bao gồm nhưng không giới hạn ở xitrat, gluconat, tartarat, malat, axetat, lactat, oxalat, aspartat, malonat, glucoheptonat, pyruvat, galactarat, gluxarat, tartronat, glutamat, glyxin, lysin, glutamin, methionin, xystein, arginin và hỗn hợp của chúng. Axit phosphoric và phospho hoặc các muối của chúng cũng có thể được sử dụng. Chất đệm tổng hợp thích hợp để sử dụng nhưng tốt hơn là sử dụng chất đệm tự nhiên như các axit hữu cơ và axit amin hoặc các muối của chúng.

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

Độ pH của chế phẩm gốc vi sinh vật phải phù hợp với vi sinh vật quan tâm. Trong các phương án nhất định, độ pH của chế phẩm gốc vi sinh vật thành phẩm dao động từ 5,0 đến 9,0, từ 6,0 đến 8,0, hoặc tốt nhất là từ 7,0 đến 7,5.

Trong một phương án, các thành phần bổ sung như chế phẩm dạng nước của muối, như natri bicarbonat hoặc cacbonat, natri sulfat, natri phosphat hoặc natri biphosphat, có thể được bao gồm trong chế phẩm gốc vi sinh vật.

Trong các phương án nhất định, chế phẩm gốc vi sinh vật của sáng chế còn bao gồm chất mang. Chất mang có thể là bất kỳ người chất mang nào phù hợp nào được biết đến trong kỹ thuật cho phép các sản phẩm phụ nấm men hoặc nấm men được chuyển đến các thực vật và/hoặc đất đích.

Trong các phương án tiếp theo, sản phẩm nấm men được cung cấp dưới dạng, ví dụ, huyền phù lỏng, nhũ tương, bột đông khô hoặc phun khô, hạt, viên hoặc gel.

Các chế phẩm gốc vi sinh vật có thể được sử dụng mà không cần ổn định, bảo quản và lưu trữ sau khi chúng được sản xuất. Hơn nữa, việc sử dụng trực tiếp các chế phẩm gốc vi sinh vật giúp bảo toàn khả năng sống sót cao của các vi sinh vật, làm giảm khả năng tạp nhiễm từ các tác nhân bên ngoài và các vi sinh vật không mong muốn và duy trì hoạt động của các sản phẩm phụ sinh trưởng của vi sinh vật.

Các vi sinh vật và/hoặc canh lên men do sự sinh trưởng của vi sinh vật có thể được loại bỏ khỏi bể sinh trưởng trong đó xảy ra sự nuôi cấy và chuyển qua, ví dụ, đường ống để sử dụng ngay lập tức.

Trong các phương án khác, chế phẩm (các vi sinh vật, canh hoặc vi sinh vật và canh) có thể được đặt trong các thùng chứa có kích thước phù hợp, xem xét đến, ví dụ, mục đích sử dụng, phương pháp áp dụng dự định, kích thước của bể lên men, và bất kỳ phương thức vận chuyển từ thiết bị sinh trưởng vi sinh vật đến địa điểm sử dụng. Do đó, các thùng chứa chế phẩm gốc vi sinh vật được đặt có thể, ví dụ, từ 1 gallon (3,785 L) đến 1.000 gallon (3785 L) trở lên. Trong các phương án nhất định, các thùng chứa là 2 gallon (7,570 L), 5 gallon (18,925 L), 25 gallon (94,625 L) hoặc lớn hơn.

Khi thu hoạch chế phẩm gốc vi sinh vật từ các bể sinh trưởng, các thành phần còn có thể được bổ sung vào khi sản phẩm được thu hoạch được đặt vào các thùng chứa và/hoặc đường ống (hoặc được vận chuyển để sử dụng). Các chất phụ gia có thể, ví dụ, những chất được mô tả trong tài liệu này, cũng như các chất khác, chẳng hạn như prebiotic, cải tạo đất và các thành phần khác cụ thể cho mục đích sử dụng.

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

Các chủng vi sinh vật

Các vi sinh vật có lợi theo sáng chế có thể, ví dụ, vi khuẩn không gây bệnh, nấm

men và/hoặc nấm. Những vi sinh vật này có thể là các vi sinh vật tự nhiên hoặc biến đổi gen. Ví dụ, các vi sinh vật có thể được biến đổi với các gen cụ thể để biểu hiện các đặc tính cụ thể. Các vi sinh vật cũng có thể là đột biến của chủng mong muốn. Như được sử dụng trong sáng chế, “đột biến” có nghĩa là chủng, biến thể di truyền hoặc phân nhóm của vi sinh vật tham khảo, trong đó đột biến có một hoặc nhiều biến thể di truyền (ví dụ, đột biến điểm, đột biến sai nghĩa, đột biến vô nghĩa, mất, lặp đoạn, đột biến lệch khung đọc hoặc lặp trình tự ngắn) so với các vi sinh vật tham khảo. Quá trình tạo đột biến đã được biết đến trong kỹ thuật vi sinh. Ví dụ, đột biến UV và nitrosoguanidin được sử dụng rộng rãi cho mục đích này.

Trong các phương án được ưu tiên, các vi sinh vật là các vi sinh vật sản xuất sinh hóa, có khả năng sản xuất, ví dụ, các chất hoạt động bề mặt sinh học và/hoặc các chất chuyển hóa hữu ích khác.

Trong một phương án, vi sinh vật là nấm men hoặc nấm. Các loại nấm men và nấm phù hợp để sử dụng theo sáng chế, bao gồm *Aureobasidium* (ví dụ, *A. pullulans*), *Blakeslea*, *Candida* (ví dụ, *C. apicola*, *C. bombicola*), *Entomophthora*, *Saccharomyces* (ví dụ, *S. boulardii sequela*, *S. cerevisiae*, *S. torula*), *Issatchenkia*, *Mortierella*, *Mycorrhiza*, và/hoặc *Trichoderma* (ví dụ, *T. reesei*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. viride*).

Trong các phương án nhất định, vi sinh vật là bất kỳ loại nấm men nào được biết đến như “nấm men sát thủ”, được đặc trưng bởi sự tiết ra các protein hoặc glycoprotein độc hại, mà chính chủng này là miễn dịch. Chúng có thể bao gồm, ví dụ, *Candida* (ví dụ, *C. nodaensis*), *Cryptococcus*, *Debaryomyces* (ví dụ, *D. hansenii*), *Hanseniaspora*, (ví dụ, *H. uvarum*), *Hansenula*, *Kluyveromyces* (ví dụ, *K. phaffii*), *Pichia* (ví dụ, *P. anomala*, *P. guilliermondii*, *P. occidentalis*, *P. kudriavzevii*), *Saccharomyces* (ví dụ, *S. cerevisiae*), *Torulopsis*, *Ustilago* (ví dụ, *U. maydis*), *Wickerhamomyces* (ví dụ, *W. anomalus*), *Williopsis* (ví dụ, *W. mrakii*), *Zygosaccharomyces* (ví dụ, *Z. bailii*), và các loại khác.

Trong một phương án, vi sinh vật là *Starmerella bombicola* loài sản xuất hiệu quả các chất hoạt động bề mặt sinh học sophorolipit. Trong phương án khác, sáng chế sử dụng các loại nấm men sát thủ, ví dụ như, *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*). Các loài có quan hệ gần khác cũng được sử dụng, ví dụ, các loài thuộc các

nhánh *Starmerella*, *Wickerhamomyces* và/hoặc *Pichia*.

Trong các phương án nhất định, các vi sinh vật có lợi là vi khuẩn, bao gồm cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm. Các vi khuẩn có thể là, ví dụ *Agrobacterium* (ví dụ, *A. radiobacter*), *Azotobacter* (*A. vinelandii*, *A. chroococcum*), *Azospirillum* (ví dụ, *A. brasiliensis*), *Bacillus* (ví dụ, *B. amyloliquifaciens*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mucilaginosus*, *B. subtilis*), *Frateuria* (ví dụ, *F. aurantia*), *Microbacterium* (ví dụ, *M. laevaniformans*), *Pantoea* (ví dụ, *P. agglomerans*), *Pseudomonas* (ví dụ, *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* (*Kluyver*), *P. putida*), *Rhizobium spp.*, *Rhodospirillum* (ví dụ, *R. rubrum*), và/hoặc *Sphingomonas* (ví dụ, *S. paucimobilis*).

Trong một phương án, vi sinh vật là chủng *Bacillus* có khả năng sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học lipopeptit, ví dụ như *B. subtilis* hoặc *B. amyloliquefaciens*.

Trong một phương án, chủng *B. subtilis* là *B. subtilis var. locuses* B1 hoặc B2, là những loài sản xuất hiệu quả, ví dụ, surfactin và các chất hoạt động bề mặt sinh học khác, cũng như các polyme sinh học. Phần mô tả này được kết hợp với tài liệu tham khảo công bố đơn Quốc tế số WO 2017/044953 A1 trong phạm vi phù hợp với các hướng dẫn được nêu trong tài liệu này.

Các chủng vi sinh vật khác bao gồm, ví dụ, các chủng khác có khả năng tích lũy lượng đáng kể chất hoạt động bề mặt sinh học, mannoprotein, beta-glucan và/hoặc các chất chuyển hóa hữu ích khác, có thể được sử dụng theo sáng chế.

Sự sinh trưởng của các vi sinh vật theo sáng chế

Sáng chế sử dụng các phương pháp nuôi cấy các vi sinh vật và sản xuất các chất chuyển hóa của vi sinh vật và/hoặc các sản phẩm phụ khác của sự sinh trưởng của vi sinh vật. Sáng chế còn sử dụng các quy trình nuôi cấy phù hợp cho việc nuôi cấy các vi sinh vật và sản xuất các chất chuyển hóa của vi sinh vật ở quy mô mong muốn. Các quy trình nuôi cấy này bao gồm nhưng không giới hạn ở nuôi cấy/lên men chìm, lên men trạng thái rắn (SSF) và cải tạo, lai (ví dụ, ma trận chìm) và/hoặc kết hợp chúng.

Như được sử dụng trong sáng chế “lên men” đề cập đến việc nuôi cấy hoặc sinh trưởng của các tế bào trong các điều kiện được kiểm soát. Sự sinh trưởng có thể là hiếu khí hoặc kỵ khí.

Trong một phương án, sáng chế đề xuất các vật liệu và phương pháp để sản xuất sinh khối (ví dụ, vật liệu tế bào sống), chất chuyển hóa ngoại bào (ví dụ, các phân tử nhỏ và protein bài tiết), chất dinh dưỡng còn lại và/hoặc các thành phần nội bào (ví dụ như các enzym và các protein khác).

Các bể sinh trưởng vi sinh vật được sử dụng theo sáng chế có thể là bất kỳ thiết bị lên men hoặc thiết bị phản ứng nuôi cấy nào sử dụng trong công nghiệp. Trong một phương án, bể có thể có các điều khiển/cảm biến chức năng hoặc có thể được kết nối với các điều khiển/cảm biến chức năng để đo các yếu tố quan trọng trong quá trình nuôi cấy, như độ pH, oxy, áp suất, nhiệt độ, độ ẩm, mật độ vi sinh vật và/hoặc nồng độ chất chuyển hóa.

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

Phương pháp có thể cung cấp oxy cho sinh trưởng nuôi cấy. Một phương án sử dụng chuyển động chậm của không khí để loại bỏ không khí chứa oxy thấp và đưa vào không khí giàu oxy. Trong trường hợp lên men chìm, không khí giàu oxy có thể là không khí xung quanh được bổ sung hàng ngày thông qua các cơ cấu bao gồm các cánh quạt để khuấy trộn cơ học của chất lỏng, và các máy phun khí để cấp bọt khí vào chất lỏng để hòa tan oxy vào chất lỏng.

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

Phương pháp này có thể bao gồm bổ sung nguồn cacbon cho nuôi cấy. Nguồn cacbon thường là cacbohyđrat, chẳng hạn như glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, trehaloza, mannoza, mannitol, và/hoặc maltoza; các axit hữu cơ như axit axetic, axit fumaric, axit xitric, axit propionic, axit malic, axit malonic và/hoặc axit pyruvic; các rượu như etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, isobutanol, và/hoặc glyxerol; các

chất béo và dầu như dầu đậu nành, dầu hạt cải, dầu cám gạo, dầu ô liu, dầu ngô, dầu mè và/hoặc dầu hạt lanh; v.v.. Những nguồn cacbon này có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp hai nguồn hoặc nhiều hơn.

Trong một phương án, các yếu tố sinh trưởng và chất dinh dưỡng vi lượng cho các vi sinh vật được đưa vào trong môi trường. Điều này đặc biệt được ưu tiên khi sinh trưởng các vi sinh vật không có khả năng sản xuất tất cả các vitamin mà chúng cần. Các chất dinh dưỡng vô cơ, bao gồm các nguyên tố vi lượng như sắt, kẽm, đồng, mangan, molybden và/hoặc coban cũng có thể được đưa vào môi trường. Hơn nữa, các nguồn các vitamin, axit amin thiết yếu và các nguyên tố vi lượng có thể được đưa vào, ví dụ, dưới dạng bột hoặc bột thô, như bột ngô, hoặc dưới dạng các chiết xuất, như chiết xuất nấm men, chiết xuất khoai tây, chiết xuất thịt bò, chiết xuất đậu nành, chiết xuất vỏ chuối, và tương tự, hoặc ở các dạng tinh khiết. Các axit amin như, ví dụ, những axit hữu ích cho quá trình sinh tổng hợp protein, cũng có thể được đưa vào.

Trong một phương án, muối vô cơ cũng có thể được đưa vào. Các muối vô cơ có thể sử dụng có thể là kali dihydro phosphat, đikali hydro phosphat, natri hydro phosphat, magie sunfat, magie clorua, sắt sunfat, sắt clorua, mangan sunfat, mangan clorua, kẽm sunfat, chì clorua, đồng sunfat, canxi clorua, natri clorua, canxi cacbonat, và/hoặc natri cacbonat. Những muối vô cơ này có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp hai loại hoặc nhiều hơn.

Trong một số phương án, phương pháp nuôi cấy có thể còn bao gồm các axit và/hoặc chất kháng vi sinh vật bổ sung trong môi trường trước đó và/hoặc trong quá trình nuôi cấy. Các chất kháng vi sinh vật hoặc kháng sinh được sử dụng để bảo vệ môi trường nuôi cấy chống lại tạp nhiễm.

Ngoài ra, các chất chống tạo bọt cũng có thể được bổ sung vào để ngăn ngừa sự hình thành và/hoặc tích tụ bọt khi khí được tạo ra trong quá trình nuôi cấy chìm.

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

Phương pháp và thiết bị nuôi cấy các vi sinh vật và sản xuất các sản phẩm phụ của vi sinh vật có thể được thực hiện theo mẻ, với quy trình gần như liên tục hoặc một quy

trình liên tục.

Các vi sinh vật có thể được sinh trưởng ở dạng sinh vật phù du hoặc dưới dạng màng sinh học. Trong trường hợp màng sinh học, bề có thể chứa cơ chất mà trên đó các vi sinh vật có thể được sinh trưởng ở trạng thái màng sinh học. Hệ thống cũng có thể có, ví dụ, khả năng áp dụng các kích thích (như ứng suất cắt) khuyến khích và/hoặc cải thiện các đặc tính sinh trưởng của màng sinh học.

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

Trong một phương án, các thiết bị được sử dụng trong phương pháp và quy trình nuôi cấy là vô trùng. Các thiết bị nuôi cấy như thiết bị phản ứng/bể có thể được phân tách, nhưng được kết nối với, bộ phận tiệt trùng, ví dụ, nồi hấp. Thiết bị nuôi cấy cũng có thể có bộ phận tiệt trùng để tiệt trùng tại chỗ trước khi bắt đầu cấy chuyển. Không khí có thể được tiệt trùng bằng các phương pháp biết trong kỹ thuật. Ví dụ, không khí xung quanh có thể đi qua ít nhất một bộ lọc trước khi được đưa vào bể. Trong các phương án khác, môi trường có thể được tiệt trùng hoặc tùy ý, không bổ sung nhiệt, trong đó việc sử dụng hoạt độ nước thấp và độ pH thấp có thể được lợi dụng để kiểm soát sự sinh trưởng của vi khuẩn không mong muốn.

Trong một phương án, sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất các chất chuyển hóa của vi sinh vật, ví dụ như các chất hoạt động bề mặt sinh học, enzym, protein, etanol, axit lactic, beta-glucan, peptit, chất chuyển hóa trung gian, axit béo không bão hòa đa nối đôi, và lipit, bằng cách nuôi cấy chủng vi khuẩn của sáng chế trong các điều kiện thích hợp cho sự sinh trưởng và sản xuất chất chuyển hóa; và, tùy ý, tinh chế chất chuyển hóa. Hàm lượng chất chuyển hóa được tạo ra bằng phương pháp này có thể là, ví dụ, ít nhất 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90%.

Trong trường hợp lên men chìm, hàm lượng sinh khối của canh lên men có thể, ví dụ, từ 5 g/l đến 180 g/l trở lên. Trong một phương án, hàm lượng chất rắn của canh là từ 10 g/l đến 150 g/l.

Nồng độ tế bào có thể, ví dụ, 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} hoặc 1×10^{13} các tế bào hoặc bào tử trên mỗi gram thành phẩm.

Sản phẩm phụ sinh trưởng của vi sinh vật được sản xuất bởi các vi sinh vật quan tâm có thể được giữ lại trong các vi sinh vật hoặc được tiết vào môi trường sinh trưởng. Môi trường có thể chứa các hợp chất ổn định hoạt động của sản phẩm phụ sinh trưởng vi sinh vật.

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

Trong phương án khác, chỉ một phần của sản phẩm lên men được loại bỏ bất cứ lúc nào. Trong phương án này, sinh khối với các tế bào sống, bào tử, conidia, sợi nấm và/hoặc thể sợi vẫn giữ lại trong bể dưới dạng chất cấy truyền cho mẻ nuôi cấy mới. Thành phần được loại bỏ có thể là môi trường không có tế bào hoặc chứa các tế bào, bào tử hoặc các mầm giống khác và/hoặc sự kết hợp của chúng. Theo cách này, hệ thống gần như liên tục được tạo ra.

Hơn nữa, phương pháp không đòi hỏi thiết bị phức tạp hoặc tiêu thụ năng lượng cao. Các vi sinh vật quan tâm có thể được nuôi cấy ở quy mô nhỏ hoặc lớn và được sử dụng, thậm chí vẫn còn được trộn lẫn với môi trường của chúng.

Hơn nữa, các sản phẩm gốc vi sinh vật có thể được sản xuất ở các địa điểm xa. Các thiết bị sinh trưởng vi sinh vật có thể hoạt động mà không cần mạng lưới điện, bằng cách sử dụng, ví dụ, năng lượng mặt trời, gió và/hoặc thủy điện.

Điều chế các chế phẩm gốc vi sinh vật

Sản phẩm gốc vi sinh vật của sáng chế đơn giản là canh lên men có chứa vi sinh vật và/hoặc các chất chuyển hóa của vi sinh vật được tạo ra bởi vi sinh vật và/hoặc bất kỳ chất dinh dưỡng còn lại nào. Sản phẩm của quá trình lên men có thể được sử dụng trực tiếp mà không cần chiết xuất hoặc tinh chế. Nếu muốn, chiết xuất và tinh chế có thể dễ dàng đạt được bằng cách sử dụng các phương pháp hoặc kỹ thuật chiết xuất và/hoặc tinh chế tiêu chuẩn được mô tả trong tài liệu.

Các vi sinh vật trong sản phẩm gốc vi sinh vật có thể ở dạng hoạt động hoặc bất hoạt. Các sản phẩm gốc vi sinh vật có thể chứa sự kết hợp của các vi sinh vật hoạt động và bất hoạt.

Các vi sinh vật, sản phẩm phụ của vi sinh vật và/hoặc canh do sự sinh trưởng của vi sinh vật có thể được loại bỏ khỏi bể sinh trưởng và chuyển qua, ví dụ, đường ống để sử dụng ngay lập tức.

Trong các phương án khác, chế phẩm (các vi sinh vật, chất chuyển hóa và/hoặc canh) có thể được đặt trong các thùng chứa có kích thước phù hợp, có xem xét đến, ví dụ, mục đích sử dụng, phương pháp áp dụng dự định, kích thước của bể lên men, và bất kỳ phương thức vận chuyển từ thiết bị sinh trưởng vi sinh vật đến địa điểm sử dụng. Do đó, các thùng chứa chế phẩm gốc vi sinh vật được đặt có thể, ví dụ, từ 1 gallon (3,785 L) đến 1.000 gallon (3785 L) trở lên. Trong các phương án nhất định, các thùng chứa là 2 gallon (7,570 L), 5 gallon (18,925 L), 25 gallon (94,625 L) hoặc lớn hơn.

Khi thu hoạch chế phẩm gốc vi sinh vật từ các bể sinh trưởng, các thành phần tiếp theo có thể được bổ sung vào khi sản phẩm được thu hoạch được đặt vào thùng chứa và/hoặc đường ống (hoặc được vận chuyển để sử dụng). Các chất phụ gia có thể, ví dụ, những chất được mô tả trong tài liệu này, cũng như các chất khác, chẳng hạn như các chất nhũ hóa, chất bôi trơn, chất kiểm soát độ hòa tan, chất điều chỉnh độ pH, prebiotic, cải tạo đất và các thành phần cụ thể khác cho mục đích sử dụng.

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

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

Trong một phương án, các thành phần bổ sung như chế phẩm dạng nước muối của axit polyprotic như natri bicarbonat hoặc cacbonat, natri sulfat, natri phosphat, natri biphosphat, có thể được bao gồm trong công thức.

Hơn nữa, theo sáng chế, sản phẩm gốc vi sinh vật có thể chứa canh trong đó các vi

khuẩn được sinh trưởng. Sản phẩm có thể, ví dụ, ít nhất, 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% hoặc 100% nước dùng theo trọng lượng. Lượng sinh khối trong sản phẩm, tính theo trọng lượng, có thể, ví dụ, bao gồm bất kỳ tỷ lệ phần trăm nào nằm giữa từ 0% đến 100%.

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

Các thành phần khác có thể được bổ sung vào chế phẩm gốc vi sinh vật để tăng cường hoạt tính kháng bệnh của nó. Tốt hơn là, các chất phụ gia này được xem là hữu cơ hoặc thân thiện với môi trường. Ví dụ, các chất kết dính, hợp chất chống virus cho người/động vật, hợp chất kháng khuẩn, tinh dầu, terpen, chất nhũ hóa, chất tạo chelat hoặc bất kỳ chất kháng bệnh nào khác có thể được đưa vào chế phẩm. Trong các trường hợp khác nghiệt, ví dụ, đối với sự tàn phá quy mô lớn của cây trồng cụ thể, thuốc kháng sinh và/hoặc thuốc kháng virus cũng có thể được sử dụng cùng với việc điều trị.

Trong các phương án nhất định, chất kết dính có thể được bổ sung vào quá trình điều trị để kéo dài sự kết dính của sản phẩm với lá cây. Các polyme, chẳng hạn như polyme tích điện, hoặc các chất gốc polysacarit có thể được sử dụng, ví dụ, gồm xanthan, gồm guar, levan, xylinan, gồm gellan, curdlan, pullulan, dextran và các loại khác.

Trong các phương án được ưu tiên, gồm xanthan thương mại được sử dụng làm chất kết dính. Nồng độ của gồm nên được lựa chọn dựa trên hàm lượng gồm trong sản phẩm thương mại. Nếu gồm xanthan có độ tinh khiết cao thì 0,001% (w/v – gồm xanthan/dung dịch) là đủ.

Trong các phương án nhất định, ví dụ, nếu việc điều trị không hiệu quả như mong muốn đối với vi khuẩn Gram âm, các sản phẩm điều trị có thể được tăng cường để điều trị các bệnh thực vật do vi khuẩn Gram âm gây ra bằng cách bổ sung chất chelat hóa.

Như được sử dụng trong sáng chế, “chất chelat hóa” hoặc “chất tạo chelat” có nghĩa là chất hoạt động có khả năng loại bỏ ion kim loại khỏi hệ thống bằng cách tạo thành phức hợp để ion kim loại không thể tham gia hoặc xúc tác cho sự hình thành gốc

oxy. Hơn nữa, chất chelat hóa tăng cường hiệu quả của chất hoạt động bề mặt sinh học kháng khuẩn bằng cách biến đổi các thành tế bào, ví dụ, vi khuẩn gram âm, dễ bị xử lý bằng chất hoạt động bề mặt hơn. Do đó, khả năng thâm vào vi khuẩn gram âm mở rộng phạm vi khả năng điều trị cho sáng chế.

Các ví dụ về các chất chelat hóa phù hợp với sáng chế bao gồm nhưng không giới hạn ở axit đimercaptosuxinic (DMSA), axit 2,3-dimercaptopropansulfonic (DMPS), axit alpha lipoic (ALA), thiamin tetrahydrofurfuryl disulfua (TTFD), penisilamin, axit etylenđiamintetraaxetic (EDTA) và axit xitric. Trong các phương án được ưu tiên, chất chelat hóa là EDTA ở nồng độ 0,1 đến 1,0% (v/v).

Các phương pháp điều trị các mầm bệnh do virus và vi khuẩn

Sáng chế có thể được sử dụng để tăng cường trồng thực vật bằng cách điều trị nhiễm trùng, nhiễm ký sinh và/hoặc các bệnh của thực vật và/hoặc cây trồng trong, ví dụ như nông nghiệp, làm vườn, nhà kính, làm cảnh, và tương tự. Hơn nữa, các phương pháp có thể được sử dụng để kiểm soát các mầm bệnh và/hoặc để ngăn chặn sự lây lan của các sinh vật đó từ cây này sang cây khác.

Trong một số phương án, các phương pháp được đề xuất để điều trị các bệnh thực vật gây ra bởi virus khảm và/hoặc vi khuẩn, trong đó các phương pháp bao gồm việc để một phần của thực vật bị nhiễm bệnh tiếp xúc với vi sinh vật có lợi và/hoặc sản phẩm phụ sinh trưởng của vi sinh vật. Trong các phương án nhất định, phương pháp bao gồm việc áp dụng chế phẩm gốc vi sinh vật theo sáng chế cho thực vật. Ngoài ra, chế phẩm có thể tiêu diệt, làm giảm, ức chế cạnh tranh sinh trưởng và/hoặc kiểm soát mầm bệnh thực vật bằng bất kỳ phương tiện nào khác. Hơn nữa, các phương pháp có thể cải thiện khả năng miễn dịch và/hoặc phòng bệnh cho các thực vật mà không cần sử dụng hóa chất đậm đặc hoặc kháng sinh.

Như được sử dụng trong sáng chế, “áp dụng” các phương pháp có thể bao gồm việc cho sản phẩm gốc vi sinh vật tiếp xúc trực tiếp với các thực vật và hoặc môi trường xung quanh. Sản phẩm vi sinh vật có thể được phun dưới dạng chất lỏng hoặc bột khô, hoặc được sử dụng dưới dạng gel hoặc dán vào thực vật. Các loại đất có thể được xử lý bằng các dạng chất lỏng hoặc khô của các sản phẩm, ví dụ, thông qua hệ thống tưới dưới dạng dung dịch lỏng, hoặc dưới dạng các hạt hoặc viên hòa tan.

Chế phẩm gốc vi sinh vật có thể được tiếp xúc trực tiếp với thực vật và/hoặc với

môi trường xung quanh thực vật. Trong các phương án nhất định, ứng dụng bao gồm để sản phẩm gốc vi sinh vật tiếp xúc với lá hoặc tán lá của thực vật bị nhiễm bệnh. Trong các phương án khác, các chế phẩm được tiếp xúc với bất kỳ phần nào của thực vật bị nhiễm bệnh, ví dụ, rễ, thân, hoa hoặc quả. Hơn nữa, các chế phẩm có thể được tiếp xúc với toàn bộ thực vật, và/hoặc với môi trường xung quanh thực vật, chẳng hạn như đất.

Trong một phương án, phương pháp bao gồm việc áp dụng chế phẩm gốc vi sinh vật chứa nấm men *Starmerella bombicola* và/hoặc các sản phẩm phụ sinh trưởng của nó cho thực vật hoặc một phần của thực vật. Trong phương án khác, vi sinh vật có lợi là *Wickerhamomyces anomalus*. Trong phương án khác, vi sinh vật có lợi là vi khuẩn sản xuất lipopeptit, ví dụ như *Bacillus subtilis* hoặc *Bacillus amyloliquefaciens*.

Các vi sinh vật có thể sống (hoặc tồn tại) hoặc bất hoạt tại thời điểm áp dụng. Khi sử dụng các vi sinh vật sống, các vi sinh vật có thể sinh trưởng tại chỗ và tạo ra các hợp chất hoạt tính tại chỗ. Do đó, nồng độ các vi sinh vật cao có thể đạt được một cách dễ dàng và liên tục tại nơi điều trị (ví dụ, khu vườn). Theo cách này, các phương pháp còn có thể bao gồm bổ sung các chất để tăng cường sự sinh trưởng của vi sinh vật trong quá trình ứng dụng. Trong một phương án, các chất được bổ sung vào là các nguồn dinh dưỡng, ví dụ như các nguồn nitơ, nitrat, phospho, magie và/hoặc cacbon.

Trong một số phương án, phương pháp bao gồm việc cho thực vật bị nhiễm bệnh tiếp xúc với vi sinh vật và/hoặc các sản phẩm phụ sinh trưởng trong môi trường lên men mà chúng được sản xuất. Trong một số phương án, phương pháp chỉ đơn giản là áp dụng môi trường lên men và/hoặc sản phẩm phụ của vi sinh vật cho thực vật. Các sản phẩm phụ tăng trưởng có thể được tinh chế hoặc ở dạng thô. Trong các phương án được ưu tiên, sản phẩm phụ sinh trưởng là chất hoạt động bề mặt sinh học, chẳng hạn như glycolipit hoặc lipopeptit. Trong một phương án ưu tiên, chất hoạt động bề mặt sinh học là sophorolipit.

Phương pháp có thể còn bao gồm việc áp dụng một hoặc nhiều chất để tăng cường các tác dụng kiểm soát mầm bệnh, ví dụ như chất kết dính để kéo dài sự kết dính của sản phẩm với thực vật. Trong một phương án, chất kết dính là gôm xanthan. Các chất khác có thể được áp dụng với chế phẩm bao gồm, ví dụ, các chất hữu cơ hoặc thân thiện với môi trường có đặc tính kháng virut và/hoặc kháng khuẩn, tinh dầu, terpen, chất nhũ

hóa, chất chelat hóa hoặc bất kỳ các chất kháng bệnh nào khác. Trong các trường hợp khác nghiệt, ví dụ, đối với sự tàn phá quy mô lớn của cây trồng cụ thể, thuốc kháng sinh và/hoặc thuốc kháng virus cũng có thể được sử dụng cùng với việc điều trị.

Các mầm bệnh đích

Ngoài tất cả các dạng virus khảm, các ví dụ về nhiễm virus ảnh hưởng đến các thực vật, mà sáng chế mang lại hữu ích bao gồm nhưng không giới hạn ở *Carlavirus*, *Abutilon*, *Hordeivirus*, *Potyvirus*, *Mastrevirus*, *Badnavirus*, *Reoviridae*, *Fijivirus*, *Oryzavirus*, *Phytoreovirus*, *Mycroevirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*, *Ipomoviurus*, *Bymovirus*, *Cucumoviurus*, *Luteovirus*, *Begomovirus*, *Rhabdoviridae*, *Tospovirus*, *Comovirus*, *Sobemovirus*, *Nepovirus*, *Tobravirus*, *Benyvirus*, *Furovirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus*; virus khảm linh lăng, virus khảm củ cải, virus khảm sắn, virus khảm đậu đũa, virus khảm dưa chuột, virus khảm cây kê, virus gây sần quả mận, virus khảm bí, virus khảm thuốc lá, virus khảm hoa tulip và virus khảm bí ngòi vàng.

Ví dụ về các nhiễm trùng vi khuẩn ảnh hưởng đến thực vật, trong đó sáng chế mang lại hữu ích bao gồm nhưng không giới hạn ở *Pseudomonas* (ví dụ, *P. savastanoi*, *Pseudomonas syringae pathovars*); *Ralstonia solanacearum*; *Agrobacterium* (ví dụ, *A. tumefaciens*); *Xanthomonas* (ví dụ, *X. oryzae* pv. *oryzae*; *X. campestris pathovars*; *X. axonopodis pathovars*); *Erwinia* (ví dụ, *E. amylovora*); *Xylella* (ví dụ, *X. fastidiosa*); *Dickeya* (ví dụ, *D. dadantii* và *D. solani*); *Pectobacterium* (ví dụ, *P. carotovorum* và *P. atrosepticum*); *Clavibacter* (ví dụ, *C. michiganensis* và *C. sepedonicus*); *Candidatus Liberibacter asiaticus*; *Pantoea*; *Ralstonia*; *Burkholderia*; *Acidovorax*; *Streptomyces*; *Spiroplasma*; và *Phytoplasma*.

Các sản phẩm gốc vi sinh vật có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các hợp chất khác để điều trị hiệu quả các loài gây bệnh, bao gồm các loại virus như virus khảm và vi khuẩn. Điều trị SLP ít hiệu quả đối với vi khuẩn gram âm hơn so với các loài gây hại và/hoặc vi sinh vật khác; tuy nhiên, các sản phẩm điều trị theo sáng chế có thể được tăng cường để điều trị các bệnh do vi khuẩn gram âm gây bệnh thực vật. Điều này có thể được thực hiện bằng cách bổ sung chất chelat hóa vào sản phẩm.

Các thực vật đích

Như được sử dụng trong sáng chế, “thực vật” đề cập đến bất kỳ thực vật nào được sử dụng trong nông nghiệp như được định nghĩa ở đây. Thực vật có thể độc lập, ví dụ,

trong khu vườn, hoặc nó có thể là một trong nhiều thực vật, ví dụ, như một phần của vườn cây hoặc trang trại. Ví dụ về các thực vật mà sáng chế mang lại hữu ích bao gồm nhưng không giới hạn ở các loại ngũ cốc và cỏ (ví dụ, lúa mì, lúa mạch, lúa mạch đen, yến mạch, gạo, ngô, lúa miến, bắp), củ cải đường (ví dụ, củ cải đường hoặc củ cải dành cho chăn nuôi); trái cây (ví dụ, nho, dâu tây, quả mâm xôi đỏ, quả mâm xôi đen, quả táo, quả hạch, trái cây mềm, táo, lê, mận, đào, hạnh nhân, anh đào hoặc quả mọng); cây họ đậu (ví dụ, đậu, đậu lăng, đậu Hà Lan hoặc đậu nành); các cây lấy dầu (ví dụ, cải dầu, mù tạt, anh túc, ô liu, hoa hướng dương, dừa, thầu dầu, ca cao hoặc hạt lạc); bầu bí (ví dụ, bí ngô, dưa chuột, bí hoặc dưa); cây sợi (ví dụ, bông, lanh, cây gai hoặc đay); trái cây có múi (ví dụ, cam, chanh, bưởi hoặc quýt); rau quả (ví dụ, rau bina, rau diếp, măng tây, cải bắp, cà rốt, hành tây, cà chua, khoai tây hoặc ớt chuông); họ nguyệt quế (ví dụ, bơ, quế hoặc long não); và cũng thuốc lá, các loại hạt, thảo mộc, gia vị, cây thuốc, cà phê, cà tím, mía, trà, hạt tiêu, nho, hoa bia, họ mã đề, cây cao su, cát hoa và trang trí.

Các loại thực vật có thể hưởng lợi từ việc áp dụng các sản phẩm và phương pháp của sáng chế bao gồm nhưng không giới hạn ở: cây trồng theo hàng (ví dụ, ngô, đậu nành, lúa miến, đậu phộng, khoai tây, v.v.), cây trồng trên đồng ruộng (ví dụ, cỏ linh lăng, lúa mì, ngũ cốc, v.v.), cây thân gỗ (ví dụ, quả óc chó, hạnh nhân, quả hồ đào, quả phi, quả hồ trăn, v.v.), cây có múi (ví dụ, cam, chanh, bưởi, v.v.), cây ăn quả (ví dụ, táo, lê, dâu tây, quả việt quất, quả mâm xôi đen, v.v.), cây cỏ (ví dụ, cỏ), cây cảnh (ví dụ, hoa, dây leo, v.v.), rau (ví dụ, cà chua, cà rốt, v.v.), cây nho (ví dụ, nho, v.v.), cây trồng rừng (ví dụ, thông, vân sam, bạch đàn, cây bạch dương, v.v.), đồng cỏ được quản lý (bắt kỳ hỗn hợp các thực vật nào được sử dụng để hỗ trợ chăn thả các động vật).

Các loài thực vật khác có thể hưởng lợi từ các sản phẩm và phương pháp của sáng chế bao gồm tất cả các cây thuộc họ siêu họ Viridiplantae, cụ thể là các cây một lá mầm và cây hai lá mầm bao gồm cỏ hoặc cây họ đậu, cây cảnh, cây lương thực, cây thân gỗ hoặc cây bụi được chọn từ *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Abelmoschus* spp., *Agave sisalana*, *Agropyron* spp., *Agrostis stolonifera*, *Allium* spp., *Amaranthus* spp., *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, *Annona* spp., *Apium graveolens*, *Arachis* spp, *Artocarpus* spp., *Asparagus officinalis*, *Avena* spp. (ví dụ, *A. sativa*, *A. fatua*, *A. byzantina*, *A. fatua* var. *sativa*, *A. hybrida*), *Averrhoa carambola*, *Bambusa* sp., *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsea*, *Beta vulgaris*, *Brassica* spp. (ví dụ, *B. napus*, *B. rapa* ssp. [canola, oilseed rape, turnip rape]), *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis*

sativa, *Capsicum* spp., *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, *Carya* spp.,
Carthamus tinctorius, *Castanea* spp., *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*,
Cinnamomum spp., *Citrullus lanatus*, *Citrus* spp., *Cocos* spp., *Coffea* spp., *Colocasia*
esculenta, *Cola* spp., *Corchorus* sp., *Coriandrum sativum*, *Corylus* spp., *Crataegus* spp.,
Crocus sativus, *Cucurbita* spp., *Cucumis* spp., *Cynara* spp., *Daucus carota*, *Desmodium*
spp., *Dimocarpus longan*, *Dioscorea* spp., *Diospyros* spp., *Echinochloa* spp., *Elaeis* (ví dụ,
E. guineensis, *E. oleifera*), *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Erianthus* sp.,
Eriobotrya japonica, *Eucalyptus* sp., *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum* spp., *Fagus* spp.,
Festuca arundinacea, *Ficus carica*, *Fortunella* spp., *Fragaria* spp., *Ginkgo biloba*,
Glycine spp. (ví dụ, *G. max*, *Soja hispida* hoặc *Soja max*), *Gossypium hirsutum*,
Helianthus spp. (ví dụ, *H. annuus*), *Hemerocallis fulva*, *Hibiscus* spp., *Hordeum* spp.
(ví dụ, *H. vulgare*), *Ipomoea batatas*, *Juglans* spp., *Lactuca sativa*, *Lathyrus* spp., *Lens*
culinaris, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, *Lotus* spp., *Luffa acutangula*, *Lupinus*
spp., *Luzula sylvatica*, *Lycopersicon* spp. (ví dụ, *L. esculentum*, *L. lycopersicum*, *L.*
pyriforme), *Macrotyloma* spp., *Malus* spp., *Malpighia emarginata*, *Mammea*
americana, *Mangifera indica*, *Manihot* spp., *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*,
Melilotus spp., *Mentha* spp., *Miscanthus sinensis*, *Momordica* spp., *Morus nigra*, *Musa*
spp., *Nicotiana* spp., *Olea* spp., *Opuntia* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp. (e.g., *O.*
sativa, *O. latifolia*), *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*,
Pastinaca sativa, *Pennisetum* sp., *Persea* spp., *Petroselinum crispum*, *Phalaris*
arundinacea, *Phaseolus* spp., *Phleum pratense*, *Phoenix* spp., *Phragmites australis*,
Physalis spp., *Pinus* spp., *Pistacia vera*, *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus* spp., *Prosopis*
spp., *Prunus* spp., *Psidium* spp., *Punica granatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp.,
Raphanus sativus, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes* spp., *Ricinus communis*, *Rubus* spp.,
Saccharum spp., *Salix* sp., *Sambucus* spp., *Secale cereale*, *Sesamum* spp., *Sinapis* sp.,
Solanum spp. (ví dụ, *S. tuberosum*, *S. integrifolium* hoặc *S. lycopersicum*), *Sorghum*
bicolor, *Spinacia* spp., *Syzygium* spp., *Tagetes* spp., *Tamarindus indica*, *Theobroma*
cacao, *Trifolium* spp., *Tripsacum dactyloides*, *Triticosecale rimpaii*, *Triticum* spp. (ví
dụ, *T. aestivum*, *T. durum*, *T. turgidum*, *T. hybernum*, *T. macha*, *T. sativum*, *T.*
monococcum hoặc *T. vulgare*), *Tropaeolum minus*, *Tropaeolum majus*, *Vaccinium* spp.,
Vicia spp., *Vigna* spp., *Viola odorata*, *Vitis* spp., *Zea mays*, *Zizania palustris*, *Ziziphus*
spp., các loại khác.

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

Các loại rau bao gồm cà chua (*Lycopersicon esculentum*), rau diếp (ví dụ, *Lactuca sativa*), đậu xanh (*Phaseolus vulgaris*), đậu lima (*Phaseolus limensis*), đậu Hà Lan (*Lathyrus* spp.), và các loại thuộc chi *Cucumis* như dưa chuột (*C. sativus*), dưa vàng (*C. cantalupensis*), và dưa lưới (*C. melo*). Các cây trang trí bao gồm đỗ quyên (*Rhododendron* spp.), hoa cẩm tú cầu (*Macrophylla hydrangea*), hoa dâm bụt (*Hibiscus rosasanensis*), hoa hồng (*Rosa* spp.), tulip (*Tulipa* spp.), hoa thủy tiên (*Narcissus* spp.), dã yên thảo (*Petunia hybrida*), hoa cẩm chướng (*Dianthus caryophyllus*), cây trạng nguyên (*Euphorbia pulcherrima*), và hoa cúc. Các loài cây lá kim có thể được sử dụng trong việc thực hiện các phương án bao gồm, ví dụ, các loại thông như thông loblolly (*Pinus taeda*), thông slash (*Pinus elliotii*), thông ponderosa (*Pinus ponderosa*), thông lodgepole (*Pinus contorta*), và thông Monterey (*Pinus radiata*); linh sam Douglas (*Pseudotsuga menziesii*); cây độc cần tây (*Tsuga canadensis*); vân sam Sitka (*Picea glauca*); gỗ đỏ (*Sequoia sempervirens*); linh sam như sinh sam bạc (*Abies amabilis*) và linh sam thơm (*Abies balsamea*); và các loại tuyết tùng như tuyết tùng đỏ phương Tây (*Thuja plicata*) và tuyết tùng vàng Alaska (*Chamaecyparis nootkatensis*). Các thực vật của các phương án bao gồm các cây trồng (ví dụ, ngô, cỏ linh lăng, hướng dương, cải,

đậu nành, bông, nghệ tây, đậu phộng, lúa miến, lúa mì, kê, thuốc lá, v.v.), như các cây ngô và cây đậu tương.

Các loài cỏ bao gồm nhưng không giới hạn ở cỏ xanh hằng năm (*Poa annua*); cỏ lúa mạch đen hằng năm (*Lolium multiflorum*); cỏ xanh Canada (*Poa compressa*); cỏ đuôi trâu Chewings (*Festuca rubra*); cỏ ống thuộc địa (*Agrostis tenuis*); cỏ ống leo (*Agrostis palustris*); cỏ mạch mào (*Agropyron desertorum*); cỏ lúa mì lồng (*Agropyron cristatum*); cỏ đuôi trâu cứng (*Festuca longifolia*); cỏ xanh Kentucky (*Poa pratensis*); cỏ nón (*Dactylis glomerate*); cỏ lúa mạch đen lâu năm (*Lolium perenne*); cỏ đuôi trâu đỏ (*Festuca rubra*); cỏ ngọn đỏ (*Agrostis alba*); cỏ xanh nhám (*Poa trivialis*); cỏ đuôi trâu cừu (*Festuca ovine*); cỏ dứa trơn (*Bromus inermis*); cỏ đuôi trâu cao (*Festuca arundinacea*); cỏ đuôi mèo (*Phleum pretense*); cỏ ống nhung (*Agrostis canine*); cỏ weeping alkaligrass (*Puccinellia distans*); cỏ lúa mì phương tây (*Agropyron smithii*); Bermuda grass (*Cynodon spp.*); cỏ St. Augustine grass (*Stenotaphrum secundatum*); cỏ zoysia (*Zoysia spp.*); cỏ Bahia (*Paspalum notatum*); cỏ thảm (*Axonopus affinis*); cỏ rét (*Eremochloa ophiuroides*); cỏ kikuyu (*Pennisetum clandestinum*); cỏ paspalum ở bờ biển (*Paspalum vaginatum*); cỏ xanh gramma (*Bouteloua gracilis*); cỏ trâu (*Buchloe dactyloids*); cỏ gramma yên mạch (*Bouteloua curtipendula*).

Các thực vật quan tâm bao gồm các thực vật ngũ cốc cung cấp hạt giống quan tâm, thực vật hạt dầu và thực vật họ đậu. Hạt giống quan tâm bao gồm hạt ngũ cốc, chẳng hạn như ngô, lúa mì, lúa mạch, gạo, lúa miến, lúa mạch đen, kê, v.v.. Thực vật hạt dầu bao gồm bông, đậu nành, nghệ tây, hướng dương, cải, ngô, cỏ linh lăng, cọ, dừa, hạt lanh, thầu dầu, ô liu, v.v.. Thực vật họ đậu bao gồm đậu và đậu Hà Lan. Đậu bao gồm guar, đậu châu chấu, cỏ ca ri, đậu tương, đậu vườn, đậu dũa, đậu xanh, đậu lima, đậu fava, đậu lăng, đậu gà, v.v..

Sản xuất tại chỗ các sản phẩm gốc vi sinh vật

Trong các phương án nhất định của sáng chế, thiết bị sinh trưởng vi sinh vật tạo ra các vi sinh vật tươi, mật độ cao và/hoặc các sản phẩm phụ sinh trưởng của vi sinh vật được quan tâm ở quy mô mong muốn. Thiết bị sinh trưởng vi sinh vật có thể được đặt tại hoặc gần nơi áp dụng. Thiết bị sản xuất các chế phẩm gốc vi sinh vật mật độ cao theo mẻ, nuôi cấy gần như liên tục hoặc nuôi cấy liên tục.

Thiết bị sinh trưởng vi sinh vật theo sáng chế có thể được đặt tại vị trí sẽ sử dụng

sản phẩm gốc vi sinh vật (ví dụ, trang trại nuôi cá). Ví dụ, thiết bị sinh trưởng vi sinh vật có thể cách xa ít hơn 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 15, 10, 5, 3 hoặc 1 dặm (1 dặm = 1,609 km) từ vị trí sử dụng.

Do sản phẩm gốc vi sinh vật được tạo ra tại chỗ hoặc gần nơi áp dụng, không có yêu cầu ổn định, bảo quản, lưu trữ kéo dài và quy trình vận chuyển kéo dài của sản xuất thông thường, mật độ vi sinh vật sống cao hơn nhiều có thể được tạo ra, do đó đòi hỏi khối lượng nhỏ hơn nhiều của sản phẩm gốc vi sinh vật để sử dụng áp dụng tại chỗ. Điều này cho phép giảm quy mô thiết bị phản ứng sinh học (ví dụ, bể lên men, nguồn cung cấp vật liệu ban đầu, các chất dinh dưỡng, chất kiểm soát độ pH và chất khử bọt, v.v. nhỏ hơn), giúp hệ thống hoạt động hiệu quả. Hơn nữa, thiết bị sản xuất tại chỗ tạo điều kiện cho tính di động của sản phẩm.

Sự hình thành của sản phẩm gốc vi sinh vật tại chỗ cũng tạo điều kiện cho việc đưa canh sinh trưởng vào sản phẩm. Canh có thể chứa các chất được sản xuất trong quá trình lên men đặc biệt phù hợp để sử dụng tại chỗ.

Sản phẩm được sản xuất tại chỗ với mật độ cao, nuôi cấy vi sinh vật khỏe mạnh có hiệu quả hơn trong khu vực này so với những vi sinh vật đã trải qua quá trình ổn định tế bào hoặc được cung cấp sẵn trong một thời gian. Các sản phẩm gốc vi sinh vật của sáng chế đặc biệt có hiệu quả so với các sản phẩm truyền thống trong đó các tế bào đã được tách ra khỏi các chất chuyển hóa và các chất dinh dưỡng có trong môi trường sinh trưởng lên men. Giảm thời gian vận chuyển cho phép sản xuất và cung cấp các mẻ vi khuẩn tươi và/hoặc chất chuyển hóa của chúng tại thời điểm và khối lượng theo yêu cầu tại chỗ.

Các thiết bị sinh trưởng vi sinh vật của sáng chế đã tạo ra các chế phẩm tươi, gốc vi sinh vật, bao gồm chính các vi sinh vật, các chất chuyển hóa của vi sinh vật và/hoặc các thành phần khác của canh trong đó các vi sinh vật được nuôi cấy. Nếu muốn, các chế phẩm có thể có mật độ tế bào sinh dưỡng, tế bào bất hoạt hoặc hỗn hợp tế bào sinh dưỡng, tế bào bất hoạt, bào tử sinh sản, sợi nấm và/hoặc các mầm giống vi khuẩn khác cao. Ngoài ra, các chế phẩm có thể được tùy chỉnh để sử dụng tại địa điểm cụ thể. Trong một phương án, thiết bị sinh trưởng vi sinh vật được đặt tại hoặc gần địa điểm nơi các sản phẩm gốc vi sinh vật sẽ được sử dụng.

Hơn nữa, các thiết bị sinh trưởng vi sinh vật cung cấp giải pháp cho vấn đề hiện

tại là dựa vào các nhà sản xuất quy mô công nghiệp ở xa mà chất lượng sản phẩm bị ảnh hưởng do chậm trễ xử lý ngược dòng, tắc nghẽn chuỗi cung ứng, lưu trữ không đúng cách và các tình huống ngẫu nhiên khác gây cản trở việc cung cấp kịp thời và áp dụng, ví dụ, sản phẩm sống, có số lượng tế bào và/hoặc mầm giống cao và canh và các chất chuyển hóa có liên quan trong đó các vi sinh vật được sinh trưởng ban đầu.

Hơn nữa, trong các phương án được ưu tiên, các hệ thống của sáng chế đã khai thác khả năng của các vi sinh vật bản địa xuất hiện tự nhiên và các sản phẩm phụ trao đổi chất của chúng để xử lý vi khuẩn gây bệnh thực vật. Vi sinh vật bản địa có thể được xác định dựa trên, ví dụ, khả năng chịu mặn, khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ cao và sử dụng xác định di truyền của các trình tự. Ngoài ra, các thiết bị sinh trưởng vi sinh vật cung cấp tính linh hoạt trong sản xuất bằng khả năng điều chỉnh các sản phẩm gốc vi sinh vật để cải thiện sự hiệp đồng với các khu vực địa lý đích.

Thời gian nuôi cấy cho các bể riêng biệt có thể, ví dụ, từ 1 ngày đến 2 tuần hoặc lâu hơn. Sản phẩm nuôi cấy có thể được thu hoạch theo bất kỳ cách nào.

Sản xuất và phân phối tại chỗ, ví dụ, 24 giờ lên men tạo thành chế phẩm với độ tinh khiết, mật độ vi sinh vật cao và chi phí vận chuyển thấp hơn đáng kể. Đưa ra triển vọng cho sự tiến bộ nhanh chóng trong sự phát triển các chế phẩm vi sinh mạnh và hiệu quả hơn, người tiêu dùng sẽ được thu được rất nhiều lợi ích từ khả năng này để nhanh chóng cung cấp các sản phẩm gốc vi sinh vật.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế và các ưu điểm của nó có thể được hiểu rõ ràng hơn thông qua các ví dụ dưới đây được đưa ra để minh họa. Các ví dụ dưới đây minh họa cho một số phương pháp, ứng dụng, phương án và các biến thể của sáng chế. Chúng không được xem là giới hạn sáng chế. Nhiều thay đổi và biến đổi có thể được thực hiện đối với sáng chế.

Ví dụ 1: Lên men sophorolipit

Đối với sáng chế, hỗn hợp tự nhiên của các sophorolipit được tổng hợp bằng cách lên men *S. bombicola* trong môi trường lên men chứa 100 g glucoza, 5 g chiết xuất nấm men, 1 g ure và 100 g dầu hạt cải trong 1000 ml nước. Sau 5-7 ngày lên men, sophorolipit được thu thập bằng cách kết tủa. Sau khi thêm một lượng bổ sung của cùng môi trường dinh dưỡng, quá trình lên men tiếp tục trong 3 ngày nữa, sau đó một phần SLP khác

được thu thập.

Hai sản phẩm khác nhau được sản xuất từ quá trình lên men này: một sản phẩm bao gồm SLP nguyên chất và một sản phẩm bao gồm môi trường nuôi cấy *S. bombicola* chứa SLP.

Ví dụ 2: Điều chế dung dịch SLP để điều trị cho lá

SLP kết tủa thu được từ quá trình lên men *S. bombicola* có thể được sử dụng để sản xuất sản phẩm để điều trị thực vật cho tất cả các loại virus khảm. SLP kết tủa thường chứa tới 50% nước; tuy nhiên, không cần cô đặc hơn nữa để điều chế loại sản phẩm điều trị này. Sản phẩm điều trị chứa từ 0,1 đến 0,5% (v/v) SLP chưa được lọc.

Ví dụ 3: Điều chế dung dịch SLP chứa *S. bombicola* để điều trị cho lá

Loại sản phẩm điều trị khác có thể sử dụng môi trường nuôi cấy *S. bombicola* để điều trị virus khảm, cũng như các mầm bệnh vi sinh vật khác, chẳng hạn như vi khuẩn gram dương gây bệnh. Môi trường nuôi cấy có thể được sản xuất trong các thiết bị phản ứng phân phối di động, có thể cung cấp cho sản xuất sản phẩm tại chỗ gần với địa điểm áp dụng.

Quá trình nuôi cấy tạo ra 250 gallon (946,25 L) môi trường nuôi cấy *S. bombicola* tinh khiết chứa tới 4 g/L SLP. Môi trường nuôi cấy thu được được pha loãng ít nhất 10 lần, tạo ra ít nhất 2.500 gallon (9462,5 L) sản phẩm xử lý.

Ví dụ 4: Điều trị cây dưa chuột nhiễm virus khảm

Sáng chế đã được sử dụng để điều trị các cây dưa chuột bị nhiễm virus khảm. Lá của cây dưa chuột được điều trị với chế phẩm bao gồm 0,2% SLP. Chế phẩm SLP được phun lên bề mặt của lá trong thời gian ba ngày.

Các đốm khảm trên lá biến mất và lá trông khỏe mạnh trong vòng chưa đầy năm ngày sau khi bắt đầu điều trị.

Ví dụ 5: SLP điều trị vi khuẩn gram dương

Các đĩa petri với lượng vi khuẩn gram dương *Bacillus subtilis* được điều trị bằng dung dịch SLP 0,5%. Trong 2 ngày sau khi điều trị, quần thể không có sự sinh trưởng nuôi cấy (đường kính hơn nửa inch (12,7 cm)) đã được quan sát.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp điều trị các bệnh ở thực vật gây ra bởi virus khảm, trong đó phương pháp bao gồm cho thực vật bị nhiễm bệnh do virus khảm tiếp xúc với chế phẩm chứa vi sinh vật có lợi và/hoặc sản phẩm sinh trưởng của chúng, trong đó vi sinh vật có lợi là *Starmerella bombicola* hoặc *Wickerhamomyces anomalus* và trong đó sản phẩm sinh trưởng là chất hoạt động bề mặt sinh học, trong đó chất hoạt động bề mặt sinh học là glycolipit được chọn từ các sophorolipit.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chế phẩm áp dụng cho lá hoặc tán lá của thực vật.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chế phẩm chứa canh lên men chứa vi sinh vật và/hoặc sản phẩm phụ sinh trưởng được sản xuất trong đó.
4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó phương pháp bao gồm việc cho thực vật tiếp xúc với canh lên men đã tách vi sinh vật có lợi.
5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất hoạt động bề mặt sinh học là sophorolipit với nồng độ 0,1% đến 0,5%.
6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm áp dụng chất kết dính vào thực vật cùng với chế phẩm.
7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó chất kết dính là polysacarit.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó polysacarit là gôm xanthan ở nồng độ 0,001% (w/v).