MATERIALES Y MÉTODOS PARA EL CONTROL DE NEMATODOS

REFERENCIA CRUZADA CON UNA SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE. UU. con número de serie 62/422,918, presentada el 16 de noviembre de 2016, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Con el fin de aumentar los rendimientos y proteger los cultivos contra patógenos, plagas y enfermedades, los agricultores han recurrido extensivamente al uso de productos químicos sintéticos y fertilizantes químicos; sin embargo, cuando estas sustancias se usan en exceso o se aplican incorrectamente pueden dispersarse en las aguas superficiales, filtrarse en las aguas subterráneas y evaporarse en el aire. Estas sustancias, como fuentes contaminantes del aire y el agua, son objeto de un control cada vez más estricto, lo que hace que su uso responsable sea un imperativo ecológico y comercial. Incluso cuando se usan correctamente, la dependencia excesiva de ciertos fertilizantes químicos y plaguicidas y su uso a largo plazo pueden alterar perjudicialmente el ecosistema del suelo, reducir la tolerancia al estrés, aumentar la resistencia a las plagas y obstaculizar el crecimiento y la vitalidad de las plantas y animales.

Los nemátodos son una clase de gusanos redondos o gusanos filamentosos del filo Nemtoda. Los ejemplos en la clase son los nemátodos formadores de quistes del género *Heterodera* (por ejemplo, *H. glycines, H, avenae* y *H. shachtii*) y Globodera (por ejemplo, *G. rostochiens* y *G. pallida*), los nemátodos formadores de raíz achatada del género *Trichodorus*, los nemátodos del bulbo y tallo del género *Ditylenchus*, el nemátodo dorado, *Heterodera rosiochiensis*, los nemátodos agalladores de la raíz del género *Meloidogyne* (por ejemplo, *M. javanica, M. hapla, M. arenaria* y *M. incognita*), los nemátodos lesionadores de la raíz del género *Pratylenchus* (por ejemplo, *P. goodeyi, P. penetrans, P. bractrvurus, P. zeae, P. coffeae, P. bractrvurus* y *P. thornei*), los nemátodos de los cítricos del género *Tylenchulus* y los nemátodos de aguijón del género *Belonalaimus*.

Se sabe que los nemátodos infectan tanto a las plantas como a los animales. Estos gusanos microscópicos se pueden encontrar en casi todos los tipos de ambientes. Cuando residen en el suelo, los nemátodos se alimentan de las raíces de las plantas, causando un daño significativo a la estructura de la raíz y provocando un desarrollo inadecuado de las plantas. El daño generalmente se manifiesta por el crecimiento de agallas, nódulos en las raíces y otras anomalías. La agallamiento reduce el tamaño de la raíz y a la ineficacia del sistema radicular, lo que, a su vez, afecta gravemente a otras partes de la planta. Como resultado, la planta debilitada se vuelve vulnerable a los ataques de otros patógenos. Sin el tratamiento adecuado, la planta muere. Los nemátodos causan millones de dólares en daños cada año en céspedes, plantas ornamentales y cultivos alimentarios.

Los nemátodos agalladores de la raíz (*Meloidogyne* spp.) son uno de los tres géneros de nemátodos parasitarios de plantas que producen más daño desde el punto de vista económico en cultivos hortícolas y extensivos. Los nemátodos agalladores de la raíz se distribuyen en todo el mundo y son parásitos obligados de las raíces de miles de especies de plantas, incluidas las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, herbáceas y leñosas. Los cultivos de hortalizas que se cultivan en climas cálidos pueden experimentar graves pérdidas por los nemátodos agalladores de la raíz y, a menudo, se tratan con un nematicida químico. El daño del nemátodo agallador de la raíz provoca un crecimiento pobre, una disminución en la calidad y rendimiento del cultivo y una resistencia reducida a otros estreses (por ejemplo, sequía, otras enfermedades). Un alto nivel de daño puede llevar a la pérdida total del cultivo. Por ejemplo, anualmente se pierden aproximadamente US$ 1,5 mil millones sólo con los nemátodos formadores de quistes de la soja.

Los nematicidas convencionales utilizados para controlar los nemátodos se aplican en el surco de la semilla al momento de la siembra. Debido a la toxicidad para los animales cercanos, como las aves, han caído en desgracia los pivotes centrales en altura para la aplicación líquida de compuestos tóxicos como Nemacur, Temik, Furadan, Dazinat y Mocap.

Desde la década de 1960, los cultivadores han utilizado el bromuro de metilo para esterilizar efectivamente los campos antes de plantar, principalmente para controlar los nemátodos, así como también para tratar enfermedades y malezas; sin embargo, debido a que este compuesto tóxico se usa en forma de gas, más de la mitad de la cantidad inyectada en el

suelo puede terminar en la atmósfera y contribuir al adelgazamiento de la capa de ozono. En 2005, los países desarrollados prohibieron el bromuro de metilo en virtud del Protocolo de Montreal, que es un tratado internacional firmado en 1987 para proteger la capa de ozono estratosférica.

Según esta prohibición, el tratado permite el uso limitado de bromuro de metilo en fresas, almendras y otros cultivos que carecen de alternativas para el control efectivo y asequible de nemátodos, enfermedades y malezas. La extensión del uso autorizado disminuye cada año y probablemente terminará pronto. Por lo tanto, es una prioridad para los productores y las agencias reguladoras el encontrar alternativas al bromuro de metilo; sin embargo, no hay ningún producto que por sí solo proporcione el amplio espectro de control que ofrecen los bromuros de metilo.

El aumento de las normas reglamentarias que rigen la disponibilidad y el uso de productos químicos, así como las demandas de los consumidores por alimentos cultivados de forma sostenible y sin residuos están afectando a la industria y provocando una evolución en el pensamiento sobre cómo abordar la gran cantidad de desafíos. Si bien en este momento no es factible la eliminación total de químicos, los agricultores están adoptando cada vez más el uso de medidas biológicas como componentes viables de los programas de manejo integrado de nutrientes y manejo integrado de plagas.

Debido a las desventajas de los principales enfoques descritos anteriormente, está aumentando la demanda de plaguicidas más seguros y estrategias alternativas de control de plagas. En particular, en los últimos años, ha cobrado gran interés el control biológico de los nemátodos. Este método utiliza como plaguicidas agentes biológicos como microbios vivos, productos biológicos derivados de estos microbios y combinaciones de los mismos. Estos plaguicidas biológicos tienen ventajas importantes sobre otros plaguicidas convencionales. Por ejemplo, son menos dañinos en comparación con los plaguicidas químicos convencionales. Son más eficientes y específicos, y a menudo se biodegradan rápidamente, lo que genera una menor contaminación ambiental.

El uso de bioplaguicidas y otros agentes biológicos se ha visto muy limitado por las dificultades en la producción, transporte, administración, precios y eficacia. Por ejemplo,

muchos microbios son difíciles de cultivar y, posteriormente, emplear en sistemas de producción agrícola y forestal en cantidades suficientes para ser útiles. Este problema se ve agravado por la pérdida de viabilidad y/o actividad debido al procesamiento, formulación, almacenamiento y estabilización antes de la distribución, esporulación de células vegetativas como medio de estabilización, transporte y aplicación. Además, puede que los productos biológicos no proliferen una vez aplicados por varios motivos, entre los que se incluyen, por ejemplo, una densidad celular inicial insuficiente, la incapacidad de competir efectivamente con la microflora existente en un lugar en particular y su introducción al suelo y/u otras condiciones ambientales en las que los microbios no pueden florecer o ni siquiera sobrevivir.

Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar métodos y materiales para producir bioplaguicidas efectivos para controlar los nemátodos.

BREVE COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona composiciones y métodos para controlar nemátodos. Además, la presente invención proporciona métodos y composiciones para prevenir el daño a los cultivos producido por los nemátodos, lo que resulta en un aumento del rendimiento. Ventajosamente, los plaguicidas de acuerdo con la presente invención utilizan sustancias no tóxicas, tales como microbios y subproductos del cultivo microbiano.

En una forma de realización, la presente invención proporciona métodos para prevenir el daño por nemátodos y controlar los nemátodos, los que comprenden las etapas de: cultivar un microorganismo que produce un subproducto del crecimiento microbiano y poner en contacto los nemátodos, o su ambiente, con una cantidad efectiva del microbio y/o el subproducto del crecimiento microbiano.

En una forma de realización, el subproducto del crecimiento microbiano es un biosurfactante. En una forma de realización, el biosurfactante es un glicolípido tal como un ramnolípido, un soforolípido (SLP, por sus siglas en inglés), un lípido de trehalosa o un lípido de manosileritritol (MEL, por sus siglas en inglés). En formas de realización particularmente preferidas, el biosurfactante es un SLP y/o MEL.

Las composiciones nematicidas basadas en microbios de la presente invención se pueden obtener a través de procesos de cultivo que van desde pequeña a gran escala. Estos procesos de cultivo incluyen, pero no se limitan a, cultivo/fermentación sumergidos, cultivo de superficie, fermentación en estado sólido (SSF, por sus siglas en inglés) y combinaciones de los mismos. La composición nematicida puede ser, por ejemplo, el caldo de fermentación y/o los biosurfactantes purificados.

En algunas formas de realización, los microorganismos productores de biosurfactantes en la composición pueden cultivarse *in situ* y producir los biosurfactantes para uso directo en el control de los nemátodos. En consecuencia, se puede lograr una alta concentración de biosurfactante y/o microorganismos productores de biosurfactante en un sitio de tratamiento (por ejemplo, el suelo) de manera fácil y continua.

En una forma de realización, el sistema de acuerdo con la presente invención comprende un aspecto adicional que proporciona la aplicación de campo de los productos basados en microbios. Los productos basados en microbios de la presente invención se pueden aplicar, por ejemplo, a través de un sistema de riego, como un rociador, como un tratamiento para las semillas, a la superficie del suelo, a las superficies de las plantas y/o a las superficies de las plagas. También se facilita la aplicación mecánica a través de implementos convencionales o la aplicación robótica a través de “drones” aéreos o terrestres.

La composición nematicida se puede usar para proteger plantas, humanos o animales mediante el control de los nemátodos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS.

La **Figura 1** muestra la reducción de la movilidad del nemátodo después de 3 días de tratamiento en diversas condiciones: SD10 al 0,05% (v/v), 0,125% (v/v), 0,25% (v/v) y 0,5% (v/v), respectivamente; SD12 al 0,025% (v/v), 0,05% (v/v), 0,1% (v/v) y 0,2% (v/v), respectivamente; Nimitz® a 10 ppm ai; y control sin tratar. SD10 se refiere al tratamiento con SLP. SD12 se refiere al tratamiento con MEL.

La **Figura 2** muestra la tasa de mortalidad de nemátodos después de 3 días de tratamiento en diversas condiciones: SD10 al 0,05% (v/v), 0,125% (v/v), 0,25% (v/v) y 0,5%

(v/v), respectivamente; SD12 al 0,025% (v/v), 0,05% (v/v), 0,1% (v/v) y 0,2% (v/v), respectivamente; Nimitz® a 10 ppm ai; y control sin tratar.

La **Figura 3** muestra el recuento de nemátodos vivos después de 3, 14 y 23 días de varios tratamientos de suelo en pruebas de laboratorio de patología en tarros: SD10 a 0,25% (v/v) y 0,5% (v/v); SD12 al 0,1% (v/v) y 0,2% (v/v); SD10 (0,25% v/v /) + SD12 (0,1% v/v); Nimitz® a 10 ppm por hora; y control sin tratar.

La **Figura 4** muestra el control de nemátodos vivos (es decir, la muerte de nemátodos) después de 3, 14 y 23 días de varios tratamientos de suelo en pruebas de jarra de patologías en laboratorio: SD10 al 0,25% (v/v) y 0,5% (v/v); SD12 al 0,1% (v/v) y 0,2% (v/v); SD10 (0,25% v/v /) + SD12 (0,1% v/v); Nimitz® a 10 ppm pr; y control sin tratar.

La **Figura 5** muestra el recuento de nemátodos sin movilidad después de 3, 14 y 23 días de varios tratamientos de suelo en pruebas de jarra de patologías en laboratorio: SD10 al 0,25% (v/v) y 0,5% (v/v); SD12 al 0,1% (v/v) y 0,2% (v/v); SD10 (0,25% v/v /) + SD12 (0,1% v/v); Nimitz® a 10 ppm pr; y control sin tratar.

La **Figura 6** muestra el recuento de nemátodos vivos sin movilidad después de 3, 14 y 23 días de varios tratamientos de suelo en pruebas de jarra de patologías en laboratorio: SD10 al 0,25% (v/v) y 0,5% (v/v); SD12 al 0,1% (v/v) y 0,2% (v/v); SD10 (0,25% v/v /) + SD12 (0,1% v/v); Nimitz® a 10 ppm pr; y control sin tratar.

La **Figura 7** muestra la tasa de agallamiento al momento de la cosecha en una microparcela de pepino tratada con 5 tratamientos diferentes: control sin tratar; Nimitz® a 5 pt/a; SD12 al 0,2% (ai/v) un solo tratamiento; SD12 al 0,2% (ai/v) doble tratamiento; SD12 al 0,2% (ai/v) triple tratamiento.

La **Figura 8** muestra el recuento de nemátodos al momento de la cosecha en una microparcela de pepino tratada con 5 tratamientos diferentes: control sin tratar; Nimitz® a 5 pt/a; SD12 al 0,2% (ai/v) un solo tratamiento; SD12 al 0,2% (ai/v) doble tratamiento; SD12 al 0,2% (ai/v) triple tratamiento.

La **Figura 9** muestra una configuración de parcela para la evaluación de la eficacia de atracción de nemátodos, la que incluye las ubicaciones de la zona de inoculación de nemátodos y la zona de aplicación del atrayente.

La **Figura 10** muestra el porcentaje de infestación (de la población total de nemátodos en la parcela) en tres ubicaciones diferentes en las parcelas para la evaluación de atrayentes de nemátodos. “Centro” se refiere al centro de la zona de inoculación, “atrayente” se refiere a la zona del atrayente, y “sin tratamiento” se refiere a todas las demás áreas de la parcela.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona materiales y métodos para controlar los nemátodos. La presente invención también proporciona composiciones que pueden usarse como plaguicidas para controlar nemátodos. La presente invención proporciona además métodos para preparar dichas composiciones. Además, la presente invención proporciona métodos y composiciones para prevenir el daño de los cultivos provocado por nemátodos, lo que da como resultado aumentos en el rendimiento.

Los productos basados en microbios de la presente invención se pueden usar en ambientes que incluyen, entre otros, cultivos, ganado, silvicultura, manejo de césped, pastos y salud humana y animal.

En una forma de realización, la composición para controlar nemátodos de acuerdo con la presente invención comprende una cantidad efectiva de un biosurfactante microbiano y/o de un microorganismo que produce dicho biosurfactante.

En una forma de realización, el método para controlar los nemátodos comprende las etapas de obtener un biosurfactante microbiano y aplicar una cantidad efectiva del biosurfactante microbiano a los nemátodos o al lugar en que se encuentran.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención se pueden obtener, por ejemplo, mediante procesos de cultivo que van desde pequeña a gran escala. Estos procesos de cultivo incluyen, pero no están limitados a, cultivo/fermentación sumergidos, cultivo de superficie, fermentación en estado sólido (SSF) y combinación de los mismos.

El producto de la fermentación que contiene el biosurfactante microbiano se puede usar directamente para tratamientos de nemátodos sin extracción ni purificación. Si se desea, se puede lograr la extracción y purificación de los biosurfactantes como se describe en el presente documento. Ventajosamente, el método de cultivo de acuerdo con la invención es capaz de producir una alta concentración de microorganismos y una alta concentración de biosurfactante.

En ciertas formas de realización, los métodos y composiciones de acuerdo con la presente invención reducen el daño causado por nemátodos, en comparación con una planta no tratada, en alrededor de un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 70%, 80%, o 90% o más.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un método para aumentar los rendimientos de cultivos o plantas. En ciertas formas de realización, los métodos y composiciones de acuerdo con la presente invención aumentan el rendimiento de los cultivos en alrededor de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 70%, 80% o 90% o más en comparación a una planta no tratada.

En una forma de realización, los métodos de la presente invención reducen el número de huevos de nemátodos en las raíces de una planta en alrededor de un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 70%, 80%, o 90% o más en comparación con una planta no tratada.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona un método para aumentar el peso o el tamaño de la planta con respecto a una planta no tratada.

Definiciones seleccionadas

Tal como se usa en el presente documento, el término “control” utilizado en referencia a la actividad producida por los biosurfactantes o microorganismos productores de biosurfactantes se extiende al acto de matar, inhabilitar o inmovilizar plagas o lograr de laguna manera que las plagas sean sustancialmente incapaces de causar daño.

Como se usa en el presente documento, “nematicida” significa que tiene la capacidad de controlar nemátodos. Así, por ejemplo, matar nemátodos, reducir su movilidad y reducir los conteos de huevos son todos ejemplos de actividad nematicida.

Como se usa el presente documento, la referencia a una “composición basada en microbios” significa una composición que comprende componentes que se produjeron como resultado del crecimiento de microorganismos u otros cultivos celulares. Por lo tanto, la composición basada en microbios puede comprender los propios microbios y/o subproductos del crecimiento microbiano. Los microbios pueden estar en estado vegetativo, en forma de esporas, en forma de micelio, en cualquier otra forma de propágulo, o en una mezcla de estos. Los microbios pueden ser planctónicos o estar en forma de biopelícula, o una mezcla de ambos. Los subproductos del crecimiento pueden ser, por ejemplo, metabolitos, componentes de la membrana celular, proteínas expresadas y/u otros componentes celulares. Los microbios pueden estar intactos o lisados. En formas de realización preferidas, los microbios están presentes en la composición basada en microbios junto con el caldo en el que se cultivaron. Las células pueden estar presentes, por ejemplo, en una concentración de 1×10^4, 1×10^s, 1×10^6, 1×10^7, 1×10^8, 1×10^9, 1×10^{10}, o 1×10^{11} o más propágulos por mililitro de la composición. Como se usa en el presente documento, un propágulo es cualquier porción de un microorganismo a partir del cual se puede desarrollar un organismo nuevo y/o maduro, incluyendo, entre otros, células, esporas, micelios, brotes y semillas.

La presente invención proporciona además “productos basados en microbios”, que son productos que deben aplicarse en la práctica para lograr un resultado deseado. El producto basado en microbios puede ser simplemente la composición basada en microbios recolectada del proceso de cultivo de microbios. Alternativamente, el producto basado en microbios puede comprender ingredientes adicionales que han sido agregados. Estos ingredientes adicionales pueden incluir, por ejemplo, estabilizadores, tampones, portadores apropiados, tal como agua, soluciones salinas, o cualquier otro portador apropiado, nutrientes que se agregan para apoyar adicionalmente el crecimiento microbiano, potenciadores del crecimiento no nutritivos, como hormonas vegetales, y/o agentes que facilitan el seguimiento de los microbios y/o la composición en el ambiente en que se aplica. El producto basado en microbios también puede comprender mezclas de composiciones basadas en microbios. El

producto basado en microbios también puede comprender uno o más componentes de una composición basada en microbios que han sido procesados de alguna forma, tal como, por ejemplo, filtración, centrifugación, lisis, secado, purificación y similares.

Microorganismos

Los biosurfactantes microbianos son compuestos producidos por una variedad de microorganismos, como bacterias, hongos y levaduras.

En una forma de realización, los microorganismos son bacterias que incluyen bacterias grampositivas y gramnegativas. Estas bacterias pueden incluir, pero no están limitadas a, por ejemplo, *Escherichia coli, Rhizobium* (por ejemplo, *Rhizobium japonicum, Sinorhizobiiim meliloti, Sinorhizobiiim fredii, Rhizobium leguminosarum biovar irifolii,* y *Rhizobium etli*), *Bradyhizobium* (por ejemplo, *B. japanicum, and B. parasponia*), *Bacillus* (por ejemplo, *B. subtilis, B. firmus, B, laterosporus, B, pumillus, B. cereus, B. licheniformis, B. megaterium,* y *B. amyloliquifaciens*), *Azobacter* (por ejemplo, *A. vinelandii* y *A. chroococcum*), *Arthrobacter* (por ejemplo, *A. pascens*), *Agrobacterium* (por ejemplo, *A. radiobacter*), *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens (Kluyver), P. aeruginosa, P. putida, P. florescens, P. fragi* y *P. syringae*), *Flavobacterium* spp.; *Azospirillium* (por ejemplo, *A. brasiliensis*), *Azomonas, Derxia, Beijerinckia, Nocardia, Klebsiella, Clavibacter* (por ejemplo, *C. xyli* subsp. *xyli* y *C. xyli* subsp. *cynodontis*), *Cyanobacteria, Pantoea* (por ejemplo, *P. agglomerans*), *Sphingomonas* (por ejemplo, *S. paucimobilis*), *Streptomyces* (por ejemplo, *S. griseochromogenes, S. qriseus, S. cacaoi, S. aureus* y *S. kasugaenis*), *Streptoverticillium* (por ejemplo, *S. rimofaciens*), *Ralslonia* (por ejemplo, *R. eulropha*), *Rhodospirillum* (por ejemplo, *R.rubrum*), *Xanthomonas* (por ejemplo, *X. campestris*), *Erwinia* (por ejemplo, *E. carotovora*), *Clostridium* (por ejemplo, *C. butyricum, C. lyrobutyricum, C. acetobutyricum, C. beijerinckii, C. bravidaciens y C. malacusomae*), *Rhodococcus, Campylobacter, Cornybacterium,* y combinaciones de las mismas.

En otra forma de realización, el microorganismo es una levadura. Varias especies de levaduras son adecuadas para la producción de acuerdo con la presente invención, incluyendo, pero no limitadas a, *Saccharomyces* (por ejemplo, *S. cerevisiae, S. boulardii*

sequela y *S. torula*), *Debaromyces, Issalchenkia, Candida* (*C. albicans, C. rugosa, C. tropicalis, C. lipolytica y C. torulopsis*), *Kluyveromyces* (por ejemplo, *K. lactis, K. fragilis*), *Pichia* (por ejemplo, *Pichia pastoris*), *Wickerhamomyces, Starmerella* (por ejemplo, *Starmerella bombicola*), y/o combinaciones de las mismas.

En una forma de realización, la levadura es una levadura asesina o *killer*. Como se usa en el presente documento, el término "levadura asesina" corresponde a una cepa de levadura caracterizada por la secreción de proteínas o glicoproteínas tóxicas, a las cuales es inmune la cepa misma. Las exotoxinas secretadas por las levaduras asesinas son capaces de matar otras cepas de levaduras, hongos o bacterias. Por ejemplo, los microorganismos que pueden ser controlados por la levadura asesina incluyen *Fusarium* y otros hongos filamentosos. Ejemplos de levaduras asesinas de acuerdo con la presente invención son aquellas que pueden usarse de manera segura en las industrias de alimentos y fermentación, por ejemplo, cerveza, vino y panificación; aquellas que pueden usarse para controlar otros microorganismos que podrían contaminar tales procesos de producción; aquellas que pueden ser utilizadas en biocontrol para la conservación de alimentos; aquellas que pueden usarse para el tratamiento de infecciones por hongos en humanos y plantas; y aquellas que pueden usarse en la tecnología de ADN recombinante. Tales levaduras pueden incluir, pero no están limitadas a, *Wickerhamomyces, Pichia* (por ejemplo, *Pichia anomala, Pichia guielliermondii, Pichia kudrizvzevii*) *Hansenula, Saccharomyces, Hanseniaspora,* tal como *Hanseniaspora uvarum, Ustilago maydis, Debaryomyces hansenii, Candida, Cryptococcus, Kluyveromyces, Torulopsis, Ustilago, Williopsis, Zygosaccharomyces,* tal como *Zygosaccharomyces bailii*, y otras.

En una forma de realización, los microorganismos son hongos, que incluyen, pero no están limitados a, micorrizas (por ejemplo, Micorrizas vesiculares-arbusculares (VAM, por sus siglas en inglés), micorrizas arbusculares (AM, por sus siglas en inglés), *Mortierella, Phycomyces, Blakeslea, Thraastochytrium, Penicillium, Phythium, Entomophthora, A reobasidium pullulans, Fusarium venenalum, Aspergillus, Trichoderma (*por ejemplo, *T. reesei, T. harzianum, T. viride and T. hamatum), Rhizopus* spp, *endophytic fungi (*por ejemplo, *Piriformis indica)* y combinaciones de los mismos.

En una forma de realización adicional, los microorganismos son hongos micorrízicos tales como *Glomus* spp. y *Acaulospora* spp. En una forma de realización, el microorganismo es un hongo micorrízico arbuscular (AMF).

En formas de realización específicas, los microbios para la producción de SLP pueden ser *Candida* sp., *Slarmerella* sp., *Cryptococcus* sp., *Cyberlindnera samutprakarnensis* JP52 (T), *Pichia* sp., *Rhodotorula* sp., o *Wickerhamiella* sp.

En otras formas de realización específicas, los microbios para la producción de MEL pueden ser *Pseudozyma* sp., *Candida* sp., *Ustilago* sp., *Schizonella* sp. o *Kurtzmanomyces* sp.

En formas de realización preferidas, los microbios son levaduras. En formas de realización específicas, las levaduras son *Starmerella*, *Pichia* y/o *Pseudozyma*. Específicamente en el presente documento se ejemplifican *Starmerella bombicola*, *Pichia anomala (Wickerhamomyces anomalus)* y *Pseudozyma aphidis*.

Biosurfactantes

Los biosurfactantes forman una clase importante de metabolitos secundarios que se producen en muchos microorganismos. Los biosurfactantes son biodegradables y pueden producirse de manera fácil y económica utilizando organismos seleccionados sobre sustratos renovables. La mayoría de los organismos productores de biosurfactantes producen biosurfactantes en respuesta a la presencia de fuentes de hidrocarburos (por ejemplo, aceites, azúcar, glicerol, etc.) en los medios de cultivo. Otros componentes de los medios también pueden afectar significativamente la producción de biosurfactante. Por ejemplo, la producción de ramnolípidos por la bacteria *Pseiidomonas aeruginosa* puede aumentar si se usa nitrato como fuente de nitrógeno en lugar de amonio. La producción de ramnolípidos también puede verse afectada en gran medida por la concentración de hierro, magnesio, sodio y potasio; la relación carbono: fósforo; y la agitación.

Los biosurfactantes incluyen glicolípidos (GL) de bajo peso molecular, lipopéptidos (LP), flavolípidos (FL), fosfolípidos y polímeros de alto peso molecular como lipoproteínas, complejos de lipopolisacáridos-proteínas y complejos de polisacáridos-proteínas-ácidos

grasos. El resto lipófilo común de una molécula de biosurfactante es la cadena hidrocarbonada de un ácido graso, mientras que la parte hidrófila está formada por grupos éster o alcohol de los lípidos neutros, por el grupo carboxilato de ácidos grasos o aminoácidos (o péptidos), por ácido orgánico en el caso de los flavolípidos, o por carbohidratos en el caso de los glicolípidos.

De acuerdo con las formas de realización de esta invención, el biosurfactante es capaz de penetrar a través de los tejidos de las plagas y es efectivo en menores cantidades sin el uso de adyuvantes. Se ha encontrado que a concentraciones superiores a la concentración micelar crítica, los biosurfactantes pueden penetrar más efectivamente en los objetos tratados.

El desarrollo de los bioplaguicidas naturales de la presente invención, que pueden producirse en grandes cantidades, representa un avance significativo en la técnica. Las plagas se pueden controlar utilizando los organismos productores de biosurfactantes como agentes de control biológico o utilizando los biosurfactantes en sí. Además, el control de plagas se puede lograr mediante el uso de sustratos específicos para apoyar el crecimiento de los organismos productores de biosurfactantes, así como para producir agentes plaguicidas biosurfactantes. Ventajosamente, los biosurfactantes naturales son capaces de inhibir el crecimiento de organismos competidores y mejorar el crecimiento de los organismos específicos productores de biosurfactantes.

Además, estos biosurfactantes pueden jugar un papel importante en el tratamiento de enfermedades humanas y animales. Los animales se pueden tratar, por ejemplo, sumergiéndolos o bañándolos en una solución de biosurfactante solo, con o sin masa de células microbianas, y/o en presencia de otros compuestos como el cobre o el zinc.

Métodos para cultivar los microbios

La presente invención proporciona métodos para el cultivo de microorganismos y la producción de biosurfactantes y/u otros subproductos del crecimiento microbiano. Estos procesos de cultivo incluyen, pero no se limitan a, cultivo/fermentación sumergidos, cultivo de superficie, fermentación en estado sólido (SSF) y combinación de los mismos.

Los sistemas de cultivo microbiano normalmente podrían usar fermentación de cultivo sumergido; sin embargo, también se pueden utilizar sistemas de cultivo de superficie y sistemas híbridos. Como se usa en el presente documento, “fermentación” se refiere al cultivo de células, esporas, micelios y/u otros propágulos microbianos bajo condiciones controladas. El cultivo podría ser aeróbico o anaeróbico.

El recipiente de crecimiento microbiano utilizado de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier fermentador o reactor de cultivo para uso industrial. El proceso de cultivo se lleva a cabo en un recipiente que puede ser, por ejemplo, cónico o tubular. En una forma de realización, el recipiente puede tener opcionalmente controles/sensores funcionales o puede estar conectado a controles/sensores funcionales para medir factores importantes en el proceso de cultivo, tales como pH, oxígeno, presión, temperatura, potencia del eje del agitador, humedad, viscosidad y/o densidad microbiana y/o concentración de metabolitos.

En una forma de realización adicional, el recipiente también puede monitorear el crecimiento de microorganismos dentro del recipiente (por ejemplo, medición del número de células y las fases de crecimiento). Alternativamente, se puede tomar una muestra diaria del recipiente y someterlas a enumeración mediante técnicas conocidas en la técnica, como la técnica de siembra por dilución. La siembra por dilución es una técnica simple que se utiliza para estimar el número de bacterias en una muestra. La técnica también puede proporcionar un índice mediante el cual se pueden comparar diferentes ambientes o tratamientos.

En una forma de realización, el método incluye complementar el cultivo con una fuente de nitrógeno. La fuente de nitrógeno puede ser, por ejemplo, nitrato de potasio, nitrato de amonio, sulfato de amonio, fosfato de amonio, amoníaco, urea y/o cloruro de amonio. Estas fuentes de nitrógeno se pueden usar independientemente o en una combinación de dos o más.

El método puede proporcionar oxigenación al cultivo en crecimiento. Una forma de realización utiliza movimiento lento del aire para remover el aire que contiene poco oxígeno e introducir aire oxigenado. El aire oxigenado puede ser aire ambiente que se suplementa diariamente mediante mecanismos que incluyen impulsores para la agitación mecánica del

líquido, y rociadores de aire para suministrar burbujas de gas al líquido para disolver el oxígeno en el líquido.

El método puede comprender además suplementar el cultivo con una fuente de carbono. La fuente de carbono es típicamente un carbohidrato, tal como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, trehalosa, manosa, manitol y/o maltosa; ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido propiónico, ácido málico, ácido malónico y/o ácido pirúvico; alcoholes tales como etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, isobutanol y/o glicerol; grasas y aceites tales como aceite de soja, aceite de canola, aceite de coco, aceite de salvado de arroz, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de sésamo y/o aceite de linaza; Estas fuentes de carbono se pueden usar independientemente o combinando dos o más de ellas.

En una forma de realización, los factores de crecimiento y oligonutrientes para los microorganismos están incluidos en el medio. Esto es particularmente preferido cuando se cultivan microbios que son incapaces de producir todas las vitaminas que requieren. También pueden incluirse en el medio los nutrientes inorgánicos, incluidos los oligoelementos como hierro, zinc, cobre, manganeso, molibdeno y/o cobalto.

En una forma de realización, también se pueden incluir sales inorgánicas. Las sales inorgánicas utilizables pueden ser dihidrogenofosfato de potasio, hidrógenofosfato dipotásico, hidrógenofosfato disódico, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, sulfato de hierro, cloruro de hierro, sulfato de manganeso, cloruro de manganeso, sulfato de zinc, cloruro de plomo, sulfato de cobre, cloruro de calcio, carbonato de calcio. y/o carbonato de sodio. Estas sales inorgánicas se pueden usar independientemente o combinando dos o más de ellas.

En algunas formas de realización, el método para el cultivo puede comprender además añadir ácidos y/o antimicrobianos adicionales en el medio líquido antes y/o durante el proceso de cultivo. Los agentes antimicrobianos o antibióticos se utilizan para proteger el cultivo contra la contaminación. Además, también se pueden agregar agentes antiespumantes para prevenir la formación y/o acumulación de espuma cuando se produce gas durante el cultivo.

El pH de la mezcla debe ser adecuado para el microorganismo de interés. Para estabilizar el pH cerca de un valor preferido se pueden usar tampones y reguladores de pH, como carbonatos y fosfatos. Cuando hay iones metálicos presentes en altas concentraciones, puede ser necesario usar un agente quelante en el medio líquido.

El método y el equipo para el cultivo de los microorganismos y la producción de los subproductos microbianos se pueden realizar en un proceso discontinuo o por lotes, semicontinuo o continuo.

Los microbios se pueden cultivar en forma planctónica o como biopelícula. En el caso de la biopelícula, el recipiente puede tener dentro un sustrato sobre el cual los microbios pueden crecer en un estado de biopelícula. El sistema también puede tener, por ejemplo, la capacidad de aplicar estímulos (como la tensión de cizallamiento) que estimulan y/o mejoran las características de crecimiento de la biopelícula.

En una forma de realización, el método para el cultivo de microorganismos se lleva a cabo a alrededor de 5 ºC a alrededor de 100 ºC, preferiblemente, 15 a 60 ºC, más preferiblemente, 25 a 50 ºC. En una forma de realización adicional, el cultivo puede llevarse a cabo de forma continua a una temperatura constante. En otra forma de realización, el cultivo puede estar sujeto a cambios de temperatura.

En una forma de realización, el equipo utilizado en el método y el proceso de cultivo está estéril. El equipo de cultivo tal como el reactor/recipiente puede estar separado, pero conectado, a una unidad de esterilización, por ejemplo, un autoclave. El equipo de cultivo también puede tener una unidad de esterilización que esteriliza *in situ* antes de comenzar la inoculación. El aire puede ser esterilizado por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el aire ambiente puede hacerse pasar a través de al menos un filtro antes de introducirse en el recipiente. En otras formas de realización, el medio se puede pasteurizar u, opcionalmente, puede no adicionarse calor, en cuyo caso se puede aprovechar el uso de una baja actividad de agua y un bajo pH para controlar el crecimiento bacteriano.

El contenido de biomasa del caldo de fermentación puede ser, por ejemplo, de 5 g/l a 180 g/l o más. En una forma de realización, el contenido de sólidos del caldo es de 10 g/l a 150 g/l.

En una forma de realización, el método para producir un metabolito microbiano según la presente invención comprende las etapas de: 1) mezclar partículas hidrófobas e hidrófilas para formar una sustancia sólida formadora de matriz; 2) poner en contacto dicha sustancia sólida formadora de matriz con un medio inoculado con un microorganismo de interés, creando así una matriz de microreactores; y 3) cultivar dicho microorganismo dentro de dichos microreactores.

El subproducto del crecimiento microbiano producido por los microorganismos de interés puede ser retenido en los microorganismos o secretarse al medio líquido. En otra forma de realización, el método para producir un subproducto del crecimiento microbiano puede comprender además etapas de concentración y purificación del subproducto del crecimiento microbiano de interés. En una forma de realización adicional, el medio líquido puede contener compuestos que estabilizan la actividad del subproducto del crecimiento microbiano.

En una forma de realización, toda la composición de cultivo microbiano se elimina al finalizar el cultivo (por ejemplo, tras lograr, por ejemplo, una densidad celular deseada, o la densidad de un metabolito específico en el caldo). En este procedimiento discontinuo, después de la recolección del primer lote se inicia un lote completamente nuevo.

En otra forma de realización, solo una parte del producto de fermentación es removido en un momento dado. En esta forma de realización, la biomasa con células viables permanece en el recipiente como inoculante para un nuevo lote de cultivo. La composición que se elimina puede ser un caldo sin células o contener células. De esta manera, se crea un sistema semicontinuo.

En una forma de realización, los microbios se cultivan dentro de 100, 50, 25, 10, 5, 1 o menos millas (161; 80,5; 40,2; 16; 8; 1,6 kilómetros) de donde se usará el producto basado en microbios.

Preparación de productos basados en microbios

Un producto basado en microbios de la presente invención es simplemente el caldo de fermentación que contiene el microorganismo y/o los metabolitos microbianos (tales como los biosurfactantes) producidos por el microorganismo y/o cualquier nutriente residual. El producto de la fermentación se puede usar directamente sin extracción, aislamiento o purificación. Si se desea, la extracción, el aislamiento y/o la purificación se pueden lograr fácilmente usando métodos o técnicas estándares descritos aquí y/o en la literatura.

Los microorganismos en el producto basado en microbios pueden estar en forma activa o inactiva, en forma de célula, forma de espora y/o forma de micelio. Los productos basados en microbios pueden usarse sin estabilización, conservación y almacenamiento adicional. Ventajosamente, el uso directo de estos productos basados en microbios preserva una alta viabilidad de los microorganismos, reduce la posibilidad de contaminación por agentes extraños y microorganismos indeseables, y mantiene la actividad de los subproductos del crecimiento microbiano.

Los microbios y/o el caldo (incluidas las capas o fracciones discretas) que resultan del crecimiento microbiano pueden removerse del recipiente de crecimiento y transferirse a través de, por ejemplo, tuberías para su uso inmediato.

En otras formas de realización, la composición (microbios, caldos o microbios y caldos) se puede colocar en contenedores del tamaño apropiado, teniendo en cuenta, por ejemplo, el uso previsto, el método de aplicación contemplado, el tamaño del tanque de fermentación, y cualquier modo de transporte desde la instalación de cultivo de los microbios hasta la ubicación de uso. Por lo tanto, los contendedores en los que se coloca la composición basada en microbios pueden ser, por ejemplo, de 1 galón a 1.000 galones (3,8 litros a 3.785 litros) o más. En otras formas de realización, los contenedores son de 2 galones, 5 galones, 25 galones (7,6 litros, 18,9 litros, 94,6 litros) o más.

Como se usa en el presente documento, “caldo” incluye el caldo completo o fracciones del caldo completo.

Tras la recolección de la composición basada en microbios desde los recipientes de cultivo, se pueden agregar componentes adicionales a medida que el producto cosechado se coloca en contenedores y/o se canaliza (o se transporta de alguna manera para su uso). Los aditivos pueden ser, por ejemplo, tampones, portadores, otras composiciones basadas en microbios producidos en la misma o diferentes instalaciones, modificadores de viscosidad, conservantes, modificadores de pH, nutrientes para el crecimiento de microbios, nutrientes para el crecimiento de las plantas, agentes de seguimiento, plaguicidas, herbicidas, alimentos para animales, productos alimenticios y otros ingredientes específicos para un uso previsto.

Ventajosamente, de acuerdo con la presente invención, el producto basado en microbios puede comprender caldo en el que se cultivaron los microbios. El producto puede ser, por ejemplo, al menos, 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% o 100% en peso del caldo. La cantidad de biomasa en el producto, puede ser, por ejemplo, entre el 0% y el 100% en peso, incluyendo todos los porcentajes entre ellos.

Opcionalmente, el producto puede ser almacenado antes de su uso. El tiempo de almacenamiento es preferiblemente corto. Por lo tanto, el tiempo de almacenamiento puede ser inferior a 60 días, 45 días, 30 días, 20 días, 15 días, 10 días, 7 días, 5 días, 3 días, 2 días, 1 día o 12 horas. En una forma de realización preferida, si hay células vivas en el producto, el producto se almacena a una temperatura fresca como, por ejemplo, menos de 20 ºC, 15 ºC, 10 ºC o 5 ºC. Por otra parte, una composición de biosurfactante se puede normalmente almacenar por períodos más largos de tiempo y a temperaturas ambiente.

En una forma de realización, los productos del cultivo se pueden preparar como un producto de biomasa secado por pulverización. La biomasa se puede separar por métodos conocidos, como centrifugación, filtración, separación, decantación, una combinación de separación y decantación, ultrafiltración o microfiltración. El producto de biomasa puede separarse del medio de cultivo y secarse por pulverización.

Los productos basados en microbios pueden formularse de una variedad de formas, incluyendo productos líquidos, sólidos, granulados, en polvo o de liberación lenta por medios que entenderán los expertos en la técnica que gozan del beneficio de la presente divulgación.

Las formulaciones, para aplicaciones en humanos o animales, se pueden preparar en forma líquida, en pasta, en ungüento, en supositorio, en cápsulas o en comprimidos, y se pueden usar de manera similar a los medicamentos utilizados en la industria de medicamentos. Las formulaciones se pueden encapsular usando componentes conocidos en la industria farmacéutica. La encapsulación protege a los componentes de reacciones indeseables y ayuda a los ingredientes a resistir las condiciones adversas en el ambiente o en el objeto o cuerpo tratado, por ejemplo, el estómago.

Las formulaciones sólidas de la invención pueden tener diferentes formas y figuras tales como cilindros, barras, bloques, cápsulas, comprimidos, píldoras, pellets, tiras, espigas, etc. Las formulaciones sólidas también pueden molerse, granularse o pulverizarse. El material granulado o en polvo puede comprimirse en forma de comprimidos o usarse para rellenar cápsulas o cubiertas de gelatina prefabricadas. Las formulaciones semisólidas se pueden preparar en preparaciones de pasta, cera, gel o crema.

Las composiciones sólidas o semisólidas de la invención pueden recubrirse utilizando compuestos de recubrimiento de película usados en la industria farmacéutica, tales como polietilenglicol, gelatina, sorbitol, goma, azúcar o alcohol polivinílico. Esto es particularmente esencial para comprimidos o cápsulas usadas en formulaciones de plaguicidas. El recubrimiento de película puede proteger al manipulador del contacto directo con el ingrediente activo en las formulaciones. Además, un agente amargante, tal como el benzoato de denatonio o cuasina, también se puede incorporar en las formulaciones plaguicidas, en el recubrimiento, o en ambos.

Las composiciones de la invención también se pueden preparar en formulaciones en polvo y envasarse en cápsulas de gelatina prefabricadas.

Las concentraciones de los ingredientes en las formulaciones y la tasa de aplicación de las composiciones pueden variar ampliamente dependiendo de la plaga, planta o área tratada, o método de aplicación.

En formas de realización preferidas, la composición para controlar nemátodos de acuerdo con la presente invención comprende una cantidad efectiva de un biosurfactante microbiano.

En una forma de realización, el biosurfactante microbiano es un glicolípido tal como un ramnolípido, soforolípidos (SLP), lípido de trehalosa y/o lípido de manosileritritol (MEL).

En una forma de realización, la composición para controlar nemátodos de acuerdo con la presente invención comprende una cantidad efectiva de un solo biosurfactante microbiano y/o un solo microorganismo que produce el biosurfactante. En otra forma de realización, la composición para controlar nemátodos puede comprender una mezcla de biosurfactantes microbianos y/o una mezcla de microorganismos que producen estos biosurfactantes.

En una forma de realización, la composición para controlar nemátodos comprende SLP. El SLP puede estar en una forma purificada o en una mezcla de productos de fermentación. La composición contiene preferiblemente los componentes activos, tales como el SLP, en concentraciones de 0,01 a 90% en peso, preferiblemente 0,1 a 50% en peso, y más preferiblemente 0,1 a 20% en peso. En otra forma de realización, el SLP purificado puede estar en combinación con un portador aceptado, ya que el SLP puede estar presente en concentraciones de 0,001 a 50% (v/v), preferiblemente de 0,01 a 20% (v/v), más preferiblemente, 0,02 al 5% (v/v).

En una forma de realización, la composición para controlar nemátodos comprende MEL. El MEL puede estar en una forma purificada o en una mezcla de producto de fermentación. La composición contiene preferiblemente los componentes activos, tales como el MEL en concentraciones de 0,01 a 90% en peso, preferiblemente 0,1 a 50% en peso, y más preferiblemente 0,1 a 20% en peso. En otra forma de realización, el MEL purificado puede estar en combinación con un portador aceptado, ya que el MEL puede estar presente en concentraciones de 0,0001 a 50% (v/v), preferiblemente de 0,005 a 20% (v/v), más preferiblemente de 0,001 a 5% (v/v).

En otra forma de realización, la composición para controlar nemátodos comprende una mezcla de SLP y MEL. El SLP y el MEL se pueden mezclar en cualquier proporción siempre que la composición contenga los componentes activos, la combinación de SLP y MEL, a una concentración de 0,01 a 90 por ciento en peso, preferiblemente 0,1 a 50% en peso, y más preferiblemente 0,1 a 20% en peso. En otra forma de realización, el SLP y MEL purificados pueden estar en combinación con un portador aceptado, ya que el SLP puede estar presente en concentraciones de 0,0001 a 50% (v/v), preferiblemente, de 0,005 a 20% (v/v), más preferiblemente, 0,001 a 5% (v/v).

En una forma de realización adicional, la composición comprende SLP y/o MEL en combinación con una cepa de microorganismo que produce SLP y/o MEL, tal como, por ejemplo, especies de *Starmerella, Wickerhamomyces anomalus* o *Pseudozymas*.

Los biosurfactantes se pueden usar solos o combinados con otros componentes activos o inactivos aceptables. Estos componentes pueden ser, por ejemplo, un componente oleoso tal como aceite de canela, aceite de clavo de olor, aceite de semilla de algodón, aceite de ajo o aceite de romero; otro surfactante natural como las saponinas Yucca o Quillaja; o el componente puede ser un aldehído tal como el aldehído cinámico. Otros aceites que se pueden usar como un componente plaguicida o adyuvante incluyen: aceite de almendra, aceite de alcanfor, aceite de canola, aceite de ricino, aceite de cedro, aceite de citronela, aceite de cítricos, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de eucalipto, aceite de pescado, aceite de geranio, lecitina, aceite de hierba de limón, aceite de linaza, aceite mineral, aceite de menta o yerbabuena, aceite de oliva, aceite de pino, aceite de colza, aceite de cártamo, aceite de salvia, aceite de semilla de sésamo, aceite de naranja dulce, aceite de tomillo, aceite vegetal y aceite de gaulteria.

Otros componentes aceptables pueden ser, por ejemplo, sustancias atrayentes de nemátodos, tales como sustancias solubles y gaseosas producidas por las raíces de las plantas hospederas o por microorganismos asociados a la rizosfera. Un ejemplo de un atrayente de nemátodos, de acuerdo con la presente invención, es la raíz de valeriana (*Valeriana officianalis*). Particularmente, se pueden usar soluciones que comprenden extracto de raíz de valeriana, así como cualquier otro compuesto o subproducto asociado con las raíces de

plantas de valeriana, como un agente atrayente de acuerdo con las presentes composiciones y métodos.

Otros aditivos adecuados, que pueden estar contenidos en las formulaciones de acuerdo con la invención, incluyen sustancias que se usan habitualmente para tales preparaciones. Los ejemplos de dichos aditivos incluyen adyuvantes, surfactantes, agentes emulsionantes, nutrientes para plantas, rellenos, plastificantes, lubricantes, deslizantes, colorantes, pigmentos, agentes amargantes, agentes tamponantes, agentes que controlan la solubilidad, agentes de ajuste del pH, conservantes, estabilizadores y resistentes a la luz ultravioleta. También se pueden incorporar agentes rigidizadores o de endurecimiento para reforzar las formulaciones y hacerlas lo suficientemente fuertes para resistir la presión o la fuerza en ciertas aplicaciones como en suelos, raíces o comprimidos para inyección de árboles.

En una forma de realización, la composición puede comprender además agentes de tamponamiento que incluyen compuestos orgánicos y aminoácidos o sus sales. Los tampones adecuados incluyen citrato, gluconato, tartarato, malato, acetato, lactato, oxalato, aspartato, malonato, glucoheptonato, piruvato, galactarato, glucarato, tartronato, glutamato, glicina, lisina, glutamina, metionina, cisteína, arginina y una mezcla de estos. También se pueden usar ácidos fosfóricos y fosforosos o sus sales. Los tampones sintéticos son adecuados para su uso, pero es preferible usar tampones naturales tales como los orgánicos y los aminoácidos o sus sales enumeradas anteriormente.

En una forma de realización adicional, los agentes de ajuste del pH incluyen hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, carbonato o bicarbonato de potasio, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico o una mezcla.

En una forma de realización, se pueden incluir en la formulación componentes adicionales tales como bicarbonato o carbonato de sodio, sulfato de sodio, fosfato de sodio, bifosfato de sodio.

En una forma de realización, las composiciones pueden incluir uno o más compuestos químicos con actividad nematicida. Estos incluyen nematicidas antibióticos como la

abamectina; nematicidas de carbamato tales como benomil, carbofurano, carbosulfán y cleotocard; nematicidas de carbamato de oxima tales como alanicarb, aldicarb, aldoxicarb, oxamilo; nematicidas organofosforados tales como diamidafos, fenamifos, fostietán, fosfamidón, cadusafos, clorpirifos, diclofentión, dimetoato, etoprofos, fensulfotión, fostiazato, heterofos, isamidofos, isazofos, metomilo, forato, fosfocarb, terbufos, tiodicarb, tionazina, triazofos, imiciafos, y mecarfón. Otros compuestos con actividad nematicida incluyen acetoprol, benclotiazol, cloropicrin, dazomet, DB CP, DCIP, 1,2-dicloropropano, 1,3-dicloropropeno, furfural, yodometano, metam, bromuro de metilo, isotiocianato de metilo y xilenoles.

En una forma de realización, las composiciones pueden comprender además una cantidad efectiva de al menos un insecticida. Los insecticidas adecuados incluyen, pero no están limitados a, insecticidas neonicotinoides no nematicidas, tales como 1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidin-2-ilideneamina (imidacloprid); 3-(6-cloro-3-piridilmetil)-l, 3-tiazolidin-2-ilidenecianamida (tiacloprid); 1-(2-cloro-1,3-tiazol-5-ilmetil)-3-metil-2-nitroguanidina (clotianidina); niternpiran; N^1-[(6-cloro-3-piridil)metil]-N^2-ciano-N^1-metilacetamidina (acetamiprid); 3-(2-cloro-1,3-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-1,3,5-oxadiazinan-4-ilideno(nitro)amina (tiametoxam); y 1-metil-2-nitro-3-(tetrahidro-3-furilmetil)guanidina (dinotefurano).

Aplicación de los productos basados en microbios

En otro aspecto más, la presente invención incluye métodos, sistemas y dispositivos para aplicar los productos basados en microbios.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un método para mejorar la salud de las plantas y/o aumentar el rendimiento de los cultivos aplicando la composición descrita en el presente documento a partes del suelo, semillas o plantas. En otra forma de realización, la presente invención proporciona un método para aumentar el rendimiento de cultivos o plantas que comprende múltiples aplicaciones de la composición descrita en el presente documento.

Ventajosamente, el método puede controlar efectivamente los nemátodos y las correspondientes enfermedades causadas por plagas, al mismo tiempo que se logra un aumento del rendimiento y se evitan los efectos secundarios y los costos adicionales.

En una forma de realización, la composición se puede aplicar a una planta ya germinada y/o en crecimiento incluyendo raíces, tallos y hojas. La composición también se puede aplicar como un tratamiento para semillas. El uso como tratamiento para semillas es beneficioso porque la aplicación se puede lograr fácilmente y se puede reducir la cantidad utilizada para el tratamiento, lo que reduce aún más la toxicidad potencial, si la hay.

En una forma de realización, los microorganismos que producen biosurfactantes y/o los surfactantes biológicos se pueden agregar al suelo, al medio de cultivo de las plantas, a las plantas, al medio acuático o a cualquier área a tratar para prevenir el daño de la plaga. Los microorganismos pueden crecer *in situ* y producir los biosurfactantes para controlar los nemátodos en el mismo sitio. Además, los organismos productores de biosurfactantes naturales aplicados en el sitio de aplicación podrán crecer y producir el biosurfactante. En consecuencia, se puede lograr una alta concentración de biosurfactante y microorganismos productores de biosurfactante en el sitio de tratamiento (por ejemplo, el suelo) de manera fácil y continua.

También pueden agregarse sustancias que mejoran el crecimiento de los microorganismos y la producción de biosurfactantes a la composición y/o al sitio de tratamiento para apoyar el crecimiento de los organismos productores de biosurfactantes y también para producir los biosurfactantes deseados en el sitio y así lograr el objetivo de la invención. Estas sustancias incluyen, pero no están limitadas a, sustratos orgánicos o carbono, como aceite, glicerol, azúcar u otros nutrientes. Por ejemplo, los organismos productores de biosurfactantes pueden crecer sobre el sustrato para producir biosurfactantes *in situ* y controlar los nemátodos. Los organismos que producen biosurfactantes naturales en el sitio de aplicación (suelo, sistema acuático, partes de plantas, etc.) producirán biosurfactantes al utilizar el sustrato de carbono. Durante este proceso, el biosurfactante producido destruirá o paralizará las plagas en el área objetivo. De acuerdo con la invención, no es necesario inocular previamente el sitio objetivo o la mezcla de sustrato de carbono con organismos productores de biosurfactantes.

Los sustratos de carbono pueden incluir, pero no están limitados a, fuentes de carbono orgánico, como aceite natural o sintético, incluido el aceite para freír usado; grasa; lípidos; cera (natural o parafina); ácidos grasos tales como láuricos; mirístico, etc; alcohol de ácido graso tal como alcohol laurílico; ésteres anfifílicos de ácidos grasos con glicerol tal como gliceril monolaurato; ésteres de glicol de ácidos grasos tales como monoestearato de polietileno; aminas de ácidos grasos tales como lauril amina; amidas de ácidos grasos; hexanos; glicerol; glucosa; etc. Para fomentar la producción de los biosurfactantes es preferible utilizar un sustrato de carbono insoluble en agua.

Una forma de realización implica agregar al sustrato de carbono, o modificarlo con, una cantidad suficiente de biosurfactante específico para iniciar el proceso de emulsificación e inhibir o reducir el crecimiento de otros organismos competidores del organismo productor de biosurfactante, y para controlar los nemátodos. Por ejemplo, *Pseudomonas syringae* y *Bacillus subtilis* producen una serie de biosurfactantes lipopéptidos denominados formadores de poros o *porens*. Estos lipopéptidos formadores de poros incluyen pseudomicina, siringomicina, tabtoxina, faseolotoxina y surfactina. Algunos lipopéptidos son capaces de crear agujeros en las membranas celulares, las células y los tejidos.

La pseudomicina se puede aplicar como un tratamiento previo a la planta para el control de nemátodos en la producción de cultivos. Si se desea estimular el crecimiento de *Bacillus subtilis*, se agrega una pequeña cantidad de biosurfactante surfactina al medio de sustrato de carbono para ayudar al establecimiento de la población de *B. subtilis* y la producción de más surfactina en el sitio.

En una forma de realización, la composición se puede aplicar mediante pulverización, vertido, inmersión, en forma de líquidos concentrados o diluidos, soluciones, suspensiones, polvos y similares, que contengan las concentraciones de agente activo que sean más adecuadas para el propósito particular que se plantea. Se pueden aplicar como están o reconstituirse antes de su uso. Por ejemplo, se pueden aplicar mediante inyección directa en árboles o en los arranques de las raíces.

En una forma de realización, la composición de acuerdo con la presente invención puede aplicarse de alrededor de 0,0001 libras/acre (0,000112 kg/ha) a alrededor de 10 libras/acre (11,21 kg/ha), alrededor de 0,001 libras/acre (0,00112 kg/ha) a alrededor de 5 libras/acre (5,604 kg/ha), alrededor de 0,01 libras/acre (0,0112 kg/ha) a alrededor de 1 libra/acre (1,112 kg/ha), alrededor de 0,01 libras/acre (0,0112 kg/ha) a alrededor de 0,1 libras/acre (0,0112 kg/ha), o alrededor de 0,01 libras/acre (0,0112 kg/ha) a alrededor de 0,05 libras/acre (0,056 kg/ha).

En una forma de realización, la composición de acuerdo con la presente invención se aplica a la planta o cultivo desde alrededor de 1 a alrededor de 100 días, alrededor de 2 a alrededor de 50 días, alrededor de 10 a alrededor de 40 días, alrededor de 20 a alrededor de 30 días después de la aplicación inicial al suelo o semilla.

En formas de realización específicas, las composiciones pueden introducirse, por ejemplo, en un sistema de irrigación, pulverizarse desde una mochila o dispositivos similares, aplicarse mediante un dispositivo robótico terrestre o aéreo como un drone, y/o aplicarse con una semilla.

La aplicación en las semillas puede ser, por ejemplo, mediante un recubrimiento de semillas o aplicando la composición al suelo simultáneamente con la siembra de semillas. Esto puede automatizarse, por ejemplo, proporcionando un dispositivo o un sistema de irrigación que aplique la composición basada en microbios junto con, y/o adyacente a, las semillas en el momento de la siembra o cerca del momento de la siembra. Por lo tanto, la composición basada en microbios puede aplicarse, por ejemplo, 5, 4, 3, 2 o 1 día antes o después del momento de la siembra o simultáneamente con la siembra de las semillas.

En ciertas formas de realización, las composiciones proporcionadas en el presente documento se aplican a la superficie del suelo sin incorporación mecánica. El efecto beneficioso de la aplicación en el suelo se puede activar por medio de la lluvia, el riego por aspersión, inundación o goteo, y luego se puede entregar a, por ejemplo, plagas específicas para que sus niveles de población alcancen los umbrales aceptables o a las raíces de las plantas para influir en el microbioma de la raíz o facilitar la captación del producto microbiano en el sistema vascular del cultivo o la planta al que se aplica el producto

microbiano. En una forma de realización ilustrativa, las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden aplicarse eficientemente a través de un sistema de riego mediante un pivote central o con una pulverización sobre el surco de la semilla.

La referencia en el presente documento a la administración de la composición “en o cerca de” una plaga o una planta, o al “ambiente” de una plaga o planta, significa que la administración es tal, que la composición está suficientemente en contacto con la plaga o planta de manera tal que se logra el resultado deseado (por ejemplo, matar la plaga, aumentar el rendimiento, prevenir daños a la planta, regular los genes y/o las hormonas, etc.). Por lo general, esta puede ser dentro de, por ejemplo, 10, 5, 3, 2 o 1 pies (304,8; 152,4; 91,44; 60,96 o 30,48 centímetros) o menos de la plaga, planta, maleza u otro objetivo deseado.

El producto basado en microbios también se puede aplicar para promover la colonización de las raíces y/o rizosfera, así como el sistema vascular de la planta para promover la salud y vitalidad de la planta. Por lo tanto, se pueden promover microbios que fijan nutrientes como el rizobio y/o micorrizas, así como otros microbios endógenos (ya presentes en el suelo), así como microbios exógenos, o sus subproductos, que combaten plagas o enfermedades o de alguna manera promueven el crecimiento, la salud y/o el rendimiento del cultivo. El producto basado en microbios también puede apoyar el sistema vascular de una planta, por ejemplo, entrando y colonizando dicho sistema vascular y contribuyendo con metabolitos y nutrientes importantes para la salud y productividad de las plantas o con metabolitos que tienen propiedades para el control de plagas.

Ventajosamente, el método no requiere equipos complicados o un alto consumo de energía. Los microorganismos de interés pueden cultivarse a pequeña escala o gran escala en el sitio y utilizarse, incluso estando mezclados con sus medios. De manera similar, los metabolitos microbianos también pueden producirse en grandes cantidades en el sitio en que se los necesita.

Ventajosamente, los productos basados en microbios pueden producirse en lugares remotos. En una forma de realización, los productos basados en microbios pueden usarse para la nutrición humana y/o la prevención y/o el tratamiento de enfermedades.

Plagas objetivo

En formas de realización preferidas, pero no limitativas, de la invención, el nemátodo controlado se elige entre:

(1) un nemátodo que es un nemátodo patógeno de planta, como pero no limitado a: Nemátodos agalladores de la raíz (*Meloidogyne* spp.) en arroz (por ejemplo, *M. incognita*, *M. javanica* o *M. graminicola*), en soja (por ejemplo, *M. incognita* o *M. arenaria*), en algodón (por ejemplo, *M. incognita*), en papa (por ejemplo, *M. chitwoodi* o *M. hapla*), en tomate (por ejemplo, *M. chitwoodi*), en tabaco (por ejemplo, M. *incognita*, *M. javanica* o *M. arenaria*), y en maíz (por ejemplo, *M. incognita*); Nemátodos productores de quistes (*Heterodera spp*.) en arroz (por ejemplo, *H. oryzae*), en soja (por ejemplo, *H. glycines*) y en maíz (por ejemplo, *H. zeae*); Nemátodos productores de quistes (*Globodera* spp.) en papa (por ejemplo, *G. pallida* o *G. rostochiensis*); nemátodos reniformes (*Rotylenchulus* spp.) en algodón (por ejemplo, *R. reniformis*); Nemátodos lesionadores de la raíz (*Pratylenchus* spp.) en bananos (por ejemplo, *P. coffeae* o *P. goodeyi*); nemátodos barrenadores (*Radopholus* spp.) en bananos (por ejemplo, *R. similis*); y otros nemátodos dañinos para el arroz, tales como el nemátodo de las raíces del arroz (*Hirschmaniella* spp., por ejemplo, *H. oryzae*);

(2) un nemátodo capaz de infestar a los seres humanos como, por ejemplo, *Enterobius vermicularis*, el oxiuro que causa la enterobiasis; *Ascaris lumbridoides*, el gusano intestinal redondo y grande que causa la ascariasis; *Necator* y *Ancylostoma*, dos tipos de anquilostomas que causan ancilostomiasis; *Trichuris trichiura*, el gusano látigo que causa la tricuriasis; *Strongyloides stercoralis* que causa estrongiloidiasis; y *Trichonella spirae* que causa la triquinosis; *Brugia malayi* y *Wuchereria bancrofti*, los nemátodos filariales asociados con las infecciones por gusanos conocidas como filariasis linfática y su manifestación general, elefantiasis y *Onchocerca volvulus* que causa la ceguera de los ríos;

(3) un nemátodo capaz de infestar a animales como, entre otros, perros (anquilostomas, por ejemplo, *Ancylostoma caninum* o *Uncinaria stenocephala*, *Ascarids*, *Toxocara canis* o *Toxascaris leonina*, *o Whipworms*, *Trichuris vulpis*), gatos (anquilostomas, por ejemplo, *Ancylostoma tubaeforme*, *Ascarids*, por ejemplo, *Toxocara cati*), pescado (gusanos del arenque o gusanos del bacalao, por ejemplo, *Anisakid*, o tenia de los peces, por

ejemplo, *Diphyllobothrium*), ovejas (gusanos del alambre, por ejemplo, *Haemonchus contortus*) y ganado (por ejemplo, gusanos gastrointestinales, por ejemplo, *Ostertagia ostertagi, Cooperia oncophora*);

(4) un nemátodo que causa daños no deseados a sustratos o materiales, como nemátodos que atacan a productos alimenticios, semillas, madera, pintura, plástico, ropa, etc. Los ejemplos de dichos nemátodos incluyen, pero no están limitados a, los siguientes: *Meloidogyne* spp. (por ejemplo, *M. incognita, M. javanica, M. arenaria, M. graminicola, M. chitwoodi* o *M. hapla*); *Heterodera* spp. (por ejemplo, *H. oryzae, H. glycines, H. zeae* o *H. schachtii*); *Globodera* spp. (por ejemplo, *G. pallida* o *G. rostochiensis*); *Ditylenchus* spp. (por ejemplo, D. *dipsaci, D. destructor* o *D. angustus*); *Belonolaimus* spp.; *Rotylenchulus* spp. (por ejemplo, *R. reniformis*); *Pratylenchus* spp. (por ejemplo, *P. coffeae, P. goodeyi* o *P. zeae*); *Radopholus* spp. (por ejemplo, *R. Similis*); *Hirschmaniella* spp. (por ejemplo, *H. oryzae*); *Aphelenchoides* spp. (por ejemplo, *A. besseyi*); *Criconemoides* spp.; *Longidorus* spp.; *Helicotylenchus* spp.; *Hoplolaimus* spp.; *Xiphinema* spp.; *Paratrichodorus* spp. (por ejemplo, *P. minor*); *Tylenchorhynchus* spp;

(5) nemátodos transmisores de virus (por ejemplo, *Longidorus macrosoma*: transmite el virus de la mancha anular necrótica de los Prunus, *Xiphinema americanum*: transmite el virus de la mancha anular del tabaco, *Paratrichadorus teres*: transmite el virus del pardeamiento temprano de los guisantes, o *Trichodorus similis*: transmite el virus del estriado necrótico del tabaco.

Las plagas de nemátodos específicas incluyen:

Dracunculus medinensis, el gusano redondo que causa la dracunculiasis (enfermedad del gusano de Guinea); los nemátodos Loa loa (gusano del ojo africano), *Mansonella streptocerca* y *Onchocerca volvulus*, que causan la filariasis cutánea; *Mansonella perstans* y *Mansonella ozzardi*, que causan la filariasis de la cavidad corporal; *Trichinella*, incluyendo *T. pseudospiralis* (que infecta mamíferos y aves en todo el mundo), *T. nativa* (que infecta osos del Ártico), *T. nelsoni* (que infecta predadores y carroñeros) y *T. britovi* (que infecta carnívoros de Europa y Asia occidental), que causan Triquinelosis; *Angiostrongylus cantonensis* (el gusano pulmonar de rata), que es la causa más común de meningitis

eosinofílica humana; *Angiostrongylus costaricensis*, que causa angiostrongiliasis abdominal (o intestinal); *Toxocara*, que causa toxocariasis humana; *Gnatostoma spinigerum*, y raramente *G. hispidum*, que causa gnatostomiasis; y *Anisakis simplex*, o *Pseudoterranova decipiens*, que causa la anisaquiasis.

En formas de realización específicas, los métodos y composiciones de la presente invención se usan para controlar el nemátodo agallador de la raíz (*Meloidogyne incognital*), el nemátodo de aguijón (*Belonolaimus longicadatus*), el nemátodo de los quistes de la soja (*Heterodera glycines*), el nemátodo lesionador de la raíz (*Pratylenchus sp*.), nemátodo daga (*Xiphinema* sp.), y/o nemátodo de los cítricos (*Tylenchidus semipenetrans*).

Plantas objetivo

Las plantas que pueden beneficiar de la aplicación de los productos y métodos de la presente invención incluyen: cultivos en hileras (por ejemplo, maíz, soja, sorgo, cacahuetes, papas, etc.), cultivos extensivos (por ejemplo, alfalfa, trigo, granos, etc.), cultivos de árboles (por ejemplo, nogales, almendros, pecán, avellanos, pistachero, etc.), cultivos de cítricos (por ejemplo, naranjo, limón, pomelo, etc.), cultivos de frutas (por ejemplo, manzanas, peras, etc.), cultivos de césped, cultivos ornamentales (por ejemplo, flores, vides, etc.), hortalizas (por ejemplo, tomates, zanahorias, etc.), vides (por ejemplo, uvas, fresas, arándanos, moras, etc.), silvicultura (por ejemplo, pino, abeto, eucalipto, álamo, etc.), pasturas controladas (cualquier mezcla de plantas utilizadas para apoyar el pastoreo de animales).

El beneficio puede estar en la forma de, por ejemplo, mayor rendimiento, calidad, resistencia a enfermedades y plagas, reducción del estrés (por ejemplo, por sal, sequía, calor, etc.) y mejor uso del agua.

Otras plantas que pueden beneficiarse de los productos y métodos de la invención incluyen todas las plantas que pertenecen a la superfamilia *Viridiplantae*, en particular las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, incluyendo forraje o leguminosas forrajeras, plantas ornamentales, cultivos alimentarios, árboles o arbustos seleccionados de *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*. (por ejemplo, *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua var. sativa*, *Avena hybrida)*, *Averrhoa carambola*, *Bambusa* sp., *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsea*, *Beta vulgaris*, *Brassica* spp. (por ejemplo, *Brassica napus*, *Brassica rapa s*sp. [canola, colza oleaginosa, nabina]), *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 (*por ejemplo, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera)*, *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Erianthus* sp., *Eriobotrya japonica*, *Eucalyptus* sp., *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum* spp., *Fagus* spp., *Festuca arundinacea*, *Ficus carica*, *Fortunella* spp., *Fragaria* spp., *Ginkgo biloba*, *Glycine* spp. *(*por ejemplo, *Glycine max*, *Soja hispida* o *Soja max)*, *Gossypium hirsutum*, *Helianthus* spp. *(*por ejemplo, *Helianthus annuus)*, *Hemerocallis fulva*, *Hibiscus* spp., *Hordeum* spp. *(*por ejemplo, *Hordeum 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. *(*por ejemplo, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme)*, *Macrotyloma* spp., *Malus* spp., *Malpighia emarginata*, *Mammea americana*, *Mangifera indica*, *Manihot* spp., *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, *Melilotus* spp., *Mentha* spp., *Miscanthus sinensis*, *Momordica* spp., *Moms nigra*, *Musa* spp., *Nicotiana* spp., *Olea* spp., *Opuntia* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp. *(*por ejemplo, *Oryza sativa*, *Oryza latifolia)*, *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca sativa*, *Pennisetum* sp., *Persea* spp., *Petroselinum crispum*, *Phalaris arundinacea*, *Phaseolus* spp., *Phleum pratense*, *Phoenix* spp., *Phragmites 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., *Solatium* spp. *(*por ejemplo, *Solanum tuberosum*, *Solanum integrifolium* o *Solanum lycopersicum)*, *Sorghum bicolor*, *Spinacia* spp., *Syzygium* spp., *Tagetes* spp.,

Tamarindus indica, *Theobroma cacao*, *Trifolium* spp., *Tripsacum dactyloides*, *Triticosecale rimpaui*, *Triticum* spp. *(*por ejemplo, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum*, *Triticum monococcum* o *Triticum vulgare)*, *Tropaeolum minus*, *Tropaeolum majus*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vigna* spp., *Viola odorata*, *Vitis* spp., *Zea mays*, *Zizania palustris*, *Ziziphus* spp., entre otras.

Otros ejemplos de plantas de interés incluyen, pero no están limitadas a, maíz (*Zea mays*), *Brassica* sp. (por ejemplo, B. *napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), particularmente aquellas especies de Brassica útiles como fuentes de aceite de semilla, alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), mijo (por ejemplo, mijo perla *(Pennisetum glaucum*), mijo proso (*Panicum miliaceum*), mijo de cola de zorra (*Setaria italica*), mijo dedo (*Eleusine coracana*)), girasol (*Helianthus annuus*), cártamo (*Carthamus tinctor*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), papa (*Solanum tuberosum*), maní (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), batata (*Ipomoea batatus*), yuca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Ananas comosus*), cítricos (*Citrus* spp.), cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia sinensis*), plátano (*Musa* spp.), aguacate (*Persea americana*), higo (*Ficus casica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifera indica*), oliva (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), anacardo (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), caña de azúcar (*Saccharum* spp.), avena, cebada, verduras, ornamentales, y coníferas, vegetales, ornamentales, y coníferas.

Las verduras incluyen tomates (*Lycopersicon esculentum*), lechuga (por ejemplo, *Lactuca sativa*), judías verdes (*Phaseolus vulgaris*), habas (*Phaseolus limensis*), guisantes (*Lathyrus* spp.) y miembros del género *Cucumis* como el pepino (*C. sativus*), melón (*C. cantalupensis*) y melón (*C. melo*). Los ornamentales incluyen azalea (*Rhododendron* spp.), Hortensia (*Macrophylla hydrangea*), hibiscos (*Hibiscus rosasanensis*), rosas (*Rosa* spp.), tulipanes (*Tulipa* spp.), narcisos (*Narcissus* spp.), petunias (*Petunia hybrida*), clavel (*Dianthus caryophyllus*), flor de navidad (*Euphorbia pulcherrima*) y crisantemo. Las coníferas que pueden emplearse en la práctica de las formas de realización incluyen, por ejemplo, pinos como el pino taeda (*Pinus taeda*), el pino oblicuo (*Pinus elliotii*), el pino

ponderosa (*Pinus ponderosa*), pino contorta (Pinus contorta) y el pino de Monterrey (*Pinus radiata*); abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*); cicuta occidental (*Tsuga canadensis*); Picea de Sitka (*Picea glauca*); secoya (*Sequoia sempervirens*); abetos verdaderos como el abeto plateado (*Abies amabilis*) y el abeto balsámico (*Abies balsamea*); y cedros como el cedro rojo occidental (*Thuja plicata*) y el cedro amarillo de Alaska (*Chamaecyparis nootkatensis)*. Las plantas de las formas de realización incluyen plantas de cultivo (por ejemplo, maíz, alfalfa, girasol, brassica, soja, algodón, cártamo, maní, sorgo, trigo, mijo, tabaco, etc.), tales como plantas de maíz y soja.

Los céspedes incluyen, pero no se limitan a: pasto azul anual (*Poa annua*); ballica italiana (*Lolium multiflorum*); pasto azul de Canadá (Poa compressa); cañuela común (*Festuca rubra*); chépica alemana (*Agrostis tenuis*); césped rastrero (*Agrostis palustris*); pasto de trigo crestado (*Agropyron desertorum*); pasto de trigo (*Agropyron cristatum*); festuca dura (Festuca longifolia); pasto azul Kentucky (*Poa pratensis*); pasto ovillo (*Dactylis glomerate*); ballica perenne (*Lolium perenne*); festuca roja (*Festuca rubra*); redtop (*Agrostis alba*); pasto azul común (*Poa trivialis*); festuca de ovino (*festuca ovina*); bromé suave (*Bromus inermis*); festuca alta (*Festuca arundinacea*); Timoteo (*Phleum pretense*); césped de terciopelo (*Agrostis canino*); pasto álcali (*Puccinellia distans*); pasto de trigo occidental (*Agropyron smithii*); pasto bermuda (Cynodon spp.); Hierba de San Agustín (*Stenotaphrum secundatum*); pasto zoysia (Zoysia spp.); Pasto Bahía (*Paspalum notatum*); pasto alfombra (*Axonopus affinis*); grama ciempiés (*Eremochloa ophiuroides*); pasto kikuyu (*Pennisetum clandesinum*); cortadora (Paspalum vaginatum); grama azul (*Bouteloua gracilis*); hierba de búfalo (*Buchloe dactyloids*); pasto banderita (*Bouteloua curtipendula*).

Otras plantas de interés incluyen el cannabis (por ejemplo, sativa, indica y ruderalis) y el cáñamo industrial.

Las plantas de interés incluyen plantas de grano que proporcionan semillas de interés, plantas de semillas oleaginosas y leguminosas. Las semillas de interés incluyen semillas de granos, tales como maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, centeno, mijo, etc. Las plantas con semillas oleaginosas incluyen algodón, soja, cártamo, girasol, brassica, maíz, alfalfa, palma, coco, lino, ricino, oliva, etc. Las plantas leguminosas incluyen frijoles y guisantes. Los

frijoles incluyen guar, algarrobo, fenogreco, soja, frijoles, judía, frijol mungo, alubia, haba, lentejas, garbanzo, etc.

Todas las plantas y partes de plantas pueden tratarse de acuerdo con la invención. En este contexto, se entiende que las plantas significan todas las plantas y poblaciones de plantas, tales como plantas silvestres deseadas o no deseadas o plantas de cultivo (incluidas plantas de cultivo de origen natural). Las plantas de cultivo pueden ser plantas que pueden obtenerse mediante métodos tradicionales de reproducción y optimización o mediante métodos biotecnológicos y recombinantes, o combinaciones de estos métodos, incluidas las plantas transgénicas y las variedades de plantas.

Por partes de plantas se entienden todas las partes y órganos aéreos y subterráneos de las plantas, tales como brotes, hojas, flores y raíces, ejemplos que pueden mencionarse como hojas, agujas, tallos, vástagos, flores, cuerpos frutales, frutos y semillas, pero también raíces, tubérculos y rizomas. Las partes de la planta también incluyen material de cultivo y material de propagación vegetativa y generativa, por ejemplo, esquejes, tubérculos, rizomas, brotes y semillas.

EJEMPLOS

Debe entenderse que los ejemplos y formas de realización descritos en el presente documento tienen sólo fines ilustrativos y los expertos en la materia sabrán reconocer que se pueden realizar diversas modificaciones o cambios a la luz de estos mismos ejemplos o formas de realización, los que están incluidos dentro del espíritu y alcance de esta solicitud.

EJEMPLO 1 - FERMENTACIÓN DE *S. BOMBICOLA* PARA LA PRODUCCIÓN DE SOFOROLÍPIDOS (SLP) EN UN REACTOR DISTRIBUIBLE DE 110 L

Se utiliza un reactor tipo air-lift, totalmente cerrado, operado por PLC con filtración de agua, unidad de control de temperatura y un soplador de aire incorporado. El reactor tiene un volumen de trabajo de 90 L cuando se cultiva *Starmerella bombicola* para la producción de SLP.

En formas de realización preferidas, los nutrientes para la producción de SLP son glucosa, urea, extracto de levadura, aceite de canola, sulfato de magnesio y fosfato de potasio.

El reactor se inocula con 8 litros de cultivo líquido previamente cultivado en matraces. La duración del ciclo de cultivo para la producción de SLP es de 7-8 días, a 25 ºC y pH 3,5, el muestreo se realiza dos veces al día.

La concentración final de SLP es alrededor del 10% del volumen de trabajo, en este caso alrededor de 9 L de producto que contienen 300-400 gramos de SLP por litro.

EJEMPLO 2 - FERMENTACIÓN DE *S. BOMBICOLA* PARA LA PRODUCCIÓN DE SLP EN REACTOR DISTRIBUIBLE PORTÁTIL DE 14 L

Este reactor es un recipiente de vidrio con camisa autoclavable con purgador de aire e impulsor. Está equipado con sensor de oxígeno disuelto, pH, temperatura y espuma; tiene una estación de control integrada con una interfaz de pantalla táctil a color, bombas incorporadas, controladores de flujo de gas y controladores de pH/espuma/nivel. El volumen de trabajo del reactor es de 10 litros.

El medio nutritivo contiene glucosa, extracto de levadura, urea y aceite vegetal. El inóculo puede ser un cultivo de 1 a 2 días de *Starmerella bombicola* a alrededor del 5-10% del volumen total de cultivo. La duración del cultivo y la recolección de productos ya hechos continúan durante 5 a 14 días. La producción final de soforolípidos puede alcanzar 1-2 kilogramos por ciclo.

EJEMPLO 3: FERMENTACIÓN DE LEVADURAS *WICKERHAMOMYCES* Y/O *PICHIA* PARA LA PRODUCCIÓN DE SLP EN UN REACTOR DISTRIBUIBLE DE 450 L

Se utiliza un reactor tipo air-lift móvil operado por PLC con filtración de agua, unidad de control de temperatura y soplador de aire para una tener una aireación suficiente. El proceso puede llevarse a cabo como proceso de cultivo discontinuo o por lotes. El reactor tiene un volumen de trabajo de 400 L cuando se cultivan *Wickerhamomyces* o *Pichia* para la producción de SLP.

En formas de realización preferidas, los nutrientes para la producción de SLP son glucosa, urea, extracto de levadura, aceite de canola, sulfato de magnesio y fosfato de potasio.

La inoculación de este reactor requiere el cultivo líquido de semillas sea hasta un 5% del volumen de trabajo. La duración del ciclo de cultivo es de 7 días, a una temperatura de 25 ºC y pH 3,5, el muestreo se realiza dos veces al día.

La concentración final de SLP es alrededor del 20-25% del volumen de trabajo, en este caso más de 90 L de formas de producto.

EJEMPLO 4: FERMENTACIÓN DE LEVADURAS *WICKERHAMOMYCES* Y/O *PICHIA* PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES Y DE CÉLULAS SOLAS EN REACTOR DISTRIBUIBLE DE 900 L

Se utiliza un reactor portátil dividido en dos tanques recorridos por un air-lift central para ayudar a mezclar los dos tanques simultáneamente. El reactor tiene un volumen de trabajo de 600L cuando se cultivan *Wickerhamomyces* y/o *Pichia* para la producción de células.

En una forma de realización preferida, los nutrientes para la producción de células son glucosa o azúcar de cocción, urea, extracto de levadura, sulfato de magnesio y fosfato de potasio.

El reactor se inocula con 2% de cultivo de siembra. La fermentación continúa durante 48-72 horas sin estabilización del pH y una temperatura de 26 a 32 ºC.

La concentración final de las células será de 10 gramos de peso húmedo por litro. La concentración de biomasa húmeda puede alcanzar los 90 kilos por ciclo con una concentración de proteínas de hasta 45 kilos.

EJEMPLO 5 - FERMENTACIÓN DE LEVADURAS *WICKERHAMOMYCES* Y/O *PICHIA* PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS DE CÉLULAS Y CÉLULAS SOLAS EN UN REACTOR DISTRIBUIBLE DE 2000 L

Se utiliza un reactor portátil dividido en dos tanques cuadrados acompañados de 2 bucles para el intercambio de masa entre ellos. El reactor tiene un volumen de trabajo de 2000L cuando se cultivan *Wickerhamomyces* y/o *Pichia* para la producción de células.

En una forma de realización preferida, los nutrientes para la producción de células son glucosa o azúcar de cocción, urea, extracto de levadura, sulfato de magnesio y fosfato de potasio.

El reactor se inocula con 2% de cultivo de siembra. La fermentación continúa durante 48-72 horas sin estabilización del pH y una temperatura de 26 a 32 ºC.

La concentración final de células será de 100 g de peso húmedo por litro. La concentración de biomasa húmeda puede alcanzar hasta 200 kilos por ciclo con una concentración de proteínas de hasta 100 kilos.

EJEMPLO 6 - FERMENTACIÓN DE *PSEUDOZYMA APHIDIS* PARA LA PRODUCCIÓN DE LIPIDOS DE MANOSILERITRITOL (MEL) EN REACTOR DISTRIBUIBLE PORTÁTIL DE 14 L

Este es un recipiente de vidrio con camisa autoclavable a vapor con purgador de aire y un impulsor Rushton. Está equipado con sonda de DO, pH, temperatura y espuma. Cuenta con una estación de control integrada con una interfaz de pantalla táctil a color, bombas incorporadas, controladores de flujo de gas y controladores de pH/espuma DO/nivel. El volumen de trabajo del reactor es de 10 litros.

Composición del medio nutriente: nitrato de sodio, fosfato de potasio, sulfato de magnesio, extracto de levadura y aceite vegetal. El inóculo puede ser un cultivo de 1 a 2 días de *Pseudozyma aphidis*, en alrededor del 5-10% del volumen total del cultivo. Duración del cultivo y recolección de muestras: 9-15 días. Producción final de MEL: 800-1000 gramos.

EJEMPLO 7: USO DE SLP PARA REDUCIR LOS HUEVOS DE NEMÁTODOS AGALLADORES DE LA RAÍZ EN PLANTAS DE TOMATE

Se cultivó *Starmerella bombicola* como se describe anteriormente. Al final del cultivo de fermentación, el caldo se asienta y la mayor parte del SLP se separa como una capa de color marrón oscuro (concentración de alrededor de 500 g/l). Esta capa marrón contiene principalmente SLP y también algunas células. La capa se recoge y el pH se ajusta a pH 7.0, Esa solución luego se diluye con agua para lograr las concentraciones deseadas.

Día 1 Germinar semillas de tomate (Moneymaker)

Día 14 Preparar la arena/superficie (1:1) con 1% de fertilizante (osmocote), trasplantar las plántulas de tomate de 2 semanas

Día 28 Inocular los microbios mediante empapamiento del suelo de plantas de 4 semanas de edad. Fue suficiente 80-100 ml de cultivo para humedecer el suelo de cada maceta cuadrada de 10 cm x 10 cm.

Día 32 Los huevos de RKN se aplican (4000 huevos por maceta) a cada planta cuatro días después de la inoculación con microbios.

Día 76 Las plantas se cosechan seis semanas después de la inoculación de los huevos.

Después de la cosecha, las plantas se lavaron con agua del grifo para eliminar la arena/turba adherida a la raíz y se registró el peso fresco de las raíces. Posteriormente, las raíces se cortaron en trozos pequeños y se pusieron en una pequeña bolsa de plástico para el almuerzo. Después de agregar 200 ml de lejía al 5%, la bolsa se incubó y se agitó suavemente durante 15 minutos. Luego se contaron los huevos en muestras de 10 µl por triplicado bajo un microscopio estereoscópico. Se calculó el número total de huevos en cada raíz. Finalmente, se calculó el número de huevos en cada gramo de biomasa de la raíz.

Los SLP al 0,25% también muestran actividad contra el nemátodo agallador de la raíz (RNK) con una reducción de huevos de alrededor de un 52%.

EJEMPLO 8: COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD DE SLP, MEL Y NIMITZ® PARA CONTROLAR LOS NEMÁTODOS AGALLADORES DE LA RAÍZ, NEMÁTODOS LESIONADORES DE LA RAÍZ Y NEMÁTODOS DE AGUIJÓN

Nimitz® es el primer nematicida químico nuevo que se ha desarrollado en más de 20 años. Nimitz® provoca una actividad nematicida rápida e irreversible inmediatamente después de una aplicación. Una hora después del contacto, los nemátodos dejan de alimentarse y se paralizan rápidamente. Dentro de 24 a 48 horas, se produce la mortalidad de la plaga en lugar de la actividad nematostática temporal (inmovilizadora), como se observa con organofosforados y nematicidas de carbamatos.

Se cultivó *Psendozyma aphidis* como se describe anteriormente. Al final de la fermentación, se utilizó todo el caldo de cultivo, ya que el MEL es muy difícil de separar sin usar ningún disolvente. Luego el MEL se diluye con agua a las concentraciones deseadas inmediatamente antes de la aplicación.

Se cultivó *Starmerella bombicola* como se describe anteriormente. Al final del cultivo de fermentación, el caldo se asienta y la mayor parte de los SLP se separaron como una capa de color marrón oscuro (concentración de alrededor de 500 g/l). Esta capa marrón contiene principalmente SLP y algunas células también. La capa se recoge y el pH se ajusta a pH 7,0, Esa solución luego se diluye con agua para lograr las concentraciones deseadas.

Se realizó el siguiente ensayo biológico: Rellenar los portaobjetos de vidrio con cavidad con cantidades adecuadas de producto de prueba. Agregar una población conocida de juveniles de nemátodos a la solución que contiene nematicida. Mantener los portaobjetos con cavidad a temperatura ambiente. La mortalidad de los nemátodos se puede juzgar contando el número de nemátodos a las 24, 48 y 72 horas. El porcentaje de mortalidad se calculó como: [media del número de juveniles muertos en tratamiento/número total de juveniles en tratamiento] x 100.

A. Nemátodo agallador de la raíz

Se determinó la mortalidad del nemátodo agallador de la raíz (*Meloidogyne incognita*) (es decir, cuántos nemátodos se destruyeron) y la falta de movilidad (es decir, cuántos nemátodos estaban mortalmente enfermos) después de 3 días de tratamiento de SLP (SD10) o MEL (SD12) a diversas concentraciones y se comparó con el tratamiento de Nimitz® y el control sin tratar (figuras 1 y 2). El porcentaje de mortalidad se calculó por el

número de nemátodos muertos/el número de recuentos totales de nemátodos antes de la prueba. El porcentaje de nemátodos sin movilidad se calculó por el número de nemátodos sin movilidad/el número de nemátodos vivos. Por lo tanto, la movilidad se calcula como el porcentaje de aquellos nemátodos que no murieron pero que no presentaban movilidad.

El nivel alto de MEL (0,1% v/v) fue el tratamiento más efectivo en la prueba. Fue significativamente más efectivo que Nimitz® con respecto a la mortalidad. Se observó una clara respuesta a la dosis. Los resultados también muestran que el SLP fue tan efectivo como Nimitz® sobre la mortalidad del nemátodo agallador de la raíz y la falta de movilidad del mismo.

B. Nemátodo de aguijón

Se determinó las tasas de mortalidad y reducción de la movilidad del nemátodo de aguijón (*Belonolaimus longicaudatus*) después de 3 días de tratamiento con SLP o MEL en diversas concentraciones y se compararon con el tratamiento de Nimitz® y el control no tratado (Figuras 1 y 2).

Los resultados muestran que tanto el SLP como el MEL aumentan la mortalidad del nemátodo y la tasa de reducción de la movilidad de manera dependiente de la dosis. Los niveles altos de MEL (0,1% o 0,2% v/v) fueron el tratamiento más efectivo en la prueba. Ellos fueron tan efectivos como Nimitz® con respecto a la mortalidad y más efectivos que Nimitz® con respecto a la tasa de reducción de la movilidad.

C. Nemátodo lesionador de la raíz

Se determinaron las tasas de reducción de la movilidad y mortalidad del nemátodo lesionador de la raíz [*Pratylenchus* sp.] después de 3 días de tratamiento con SLP o MEL a diversas concentraciones y se compararon con el tratamiento de Nimitz® y el control no tratado (Figs. 1 y 2).

Los resultados muestran que tanto el SLP como el MEL aumentan la mortalidad de los nemátodos lesionadores de la raíz y la tasa de reducción de la movilidad de una manera

dependiente de la dosis. MEL fue más efectivo que SLP y comparable a Nimitz® en la prueba.

EJEMPLO 9: EVALUACIÓN DE VARIACIONES DE TRATAMIENTOS CONTRA NEMATODOS AGALLADORES DEL SUR EN PRUEBAS DE JARRA DE PATOLOGÍAS EN LABORATORIO

El tratamiento con SLP (SD10) y el tratamiento con MEL (SD12) aplicados directamente al suelo infectado con nemátodos se probaron a dos tasas, solos o juntos, y se compararon con Nimitz® y el control no tratado en la disminución de las poblaciones vivas de nemátodos agalladores de la raíz del sur. Los recuentos se realizaron en tres puntos temporales diferentes después del tratamiento.

Se realizaron seis réplicas de 7 tratamientos en jarras de vidrio que contenían 350 cm 3 de suelo arenoso al 99%. Los frascos se inocularon con 70 nemátodos agalladores de la raíz del sur adultos (*Meloidogyne incognita*). Se realizó una aplicación de tratamiento justo después de la inoculación de nemátodos, donde se vertieron a mano 85 ml de tratamiento en cada frasco. Las mezclas de tratamiento se prepararon de acuerdo con la Tabla 1 (a continuación). Los recuentos de nemátodos vivos y muertos se realizaron el día 3, el día 14 y el día 23 después del tratamiento. También se tabularon los recuentos de nemátodos sin movilidad como porcentaje del total de nemátodos vivos.

Tabla 1. Preparación de mezclas de tratamientos.

Nº Tto.	**Nombre del Tratamiento**	**Tipo de forma**	**Tasa**	**Unidad de tasa**	**Cantidad de producto a medir/**
1	SD10	L	0,25	% v/v	2,5 ml/mx
2	SD10	L	0,5	% v/v	4,999 ml/mx
3	SD12	L	0,1	% v/v	0,9999 ml/mx
4	SD12	L	0,2	% v/v	2,0 ml/mx
5	SD10 + SD12	L L	0,25 0,1	% v/v % v/v	2,5 ml/mx 0,9999 ml/mx
6	Nimitz®	L	10	ppm pr	9,999 ul/mx
7	Control no tratado				

Repeticiones: 6; Volumen de pulverización: 85 ml/artículo; Parcelas 4 x 20 pies (1,2 x 6,1 metros); Tamaño de la mezcla: 1 L (tamaño mezcla calculado 0 L). Mezcla: mx

Resultados

Los resultados de la prueba de jarra para los productos SD10 y SD12 sugieren una respuesta positiva a la dosis para la actividad contra los nemátodos agalladores de la raíz sureños. SD10 y SD12 aplicados juntos a una tasa baja no fueron tan efectivos como cada producto solo a una tasa más alta. Nimitz® proporcionó un control superior.

La FIG. 3 y la Tabla 2 (a continuación) muestran los recuentos de nemátodos vivos en cada tratamiento. La FIG. 4 y la Tabla 3 (a continuación) muestran el control de nemátodos vivos (es decir, la tasa de muerte de nemátodos) en cada tratamiento.

Tabla 2. Recuento de nemátodos vivos

Nº Tto.	**Nombre Tratamiento**	**Tasa**	**Unidad tasa**	**Código apli.**	**Recuento previo**		**3DA-A**		**14 DA-A**		**23 DA-A**	
1	SD10	0,25	% v/v	A	77,00	a	52,00	a	38,17	a	13,50	ab
2	SD10	0,5	% v/v	A	77,00	a	47,67	a	36,67	a	11,50	b
3	SD12	0,1	% v/v	A	77,00	a	46,33	a	36,00	a	11,83	b
4	SD12	0,2	% v/v	A	77,00	a	48,50	a	33,33	a	8,17	e
5	SD10+ SD12	0,25 0,1	% v/v % v/v	A A	77,00	a	46,00	a	36,50	a	11,83	b
6	Nimitz®	10	ppm pr	A	77,00	a	16,00	b	4,17	b	1,67	d
7	Control no tratado				77,00	a	50,50	a	39,83	a	15,33	a

Se registró un control significativamente más alto ya en el día 3 (3 DA-A) en las jarras tratadas con Nimitz® (10 ppm). Tanto para SD10 como para SD12, se observaron respuestas de dosis significativas para cada uno a 23 DA-A, en donde las muestras tratadas con una tasa mayor tenían recuentos de nemátodos más bajos que las muestras tratadas con una menor tasa. Cuando se aplicó tanto SD10 como SD12 en combinación a la tasa baja, la mortalidad de los nemátodos no aumentó significativamente a los niveles observados en los tratamientos con una mayor tasa.

Tabla 3. Control de nemátodos vivos %

Nº Tto.	Nombre Tratamiento	Tasa	Unidad tasa	Código apli.	3 DA-A		14 DA-A		23 DA-A	
1	SD10	0,25	%v/v	A	1,84	bc	9,09%	bc	15,56	cd
2	SD10	0,5	%v/v	A	8,29	bc	8,03%	bc	25,72	c
3	SD12	0,1	%v/v	A	8,84	bc	9,24%	bc	22,18	c
4	SD12	0,2	%v/v	A	9,39	b	18,64%	b	44,88	b
5	SD10 + SD12	0,25 0,1	%v/v %v/v	A A	10,88	b	11,40%	bc	20,90	c
6	Nimitz®	10	ppm pr	A	68,24	a	89,94%	a	89,77	a
7	Control no tratado				0,00	c	0,00%	c	0,00	d

La FIG. 5 y la Tabla 4 (abajo) muestran recuentos de nemátodos sin movilidad. La FIG. 6 y la tabla 5 (abajo) muestran el recuento de nemátodos vivos sin movilidad (%).

Tabla 4. Recuento de nemátodos sin movilidad

Nº Tto.	Nombre Tratamiento	Tasa	Unidad tasa	Código apli.	3 DA-A		14 DA-A		23 DA-A	
1	SD10	0,25	% v/v	A	3,33	e	4,67	bc	2,50	ab
2	SD10	0,5	% v/v	A	5,17	bc	4,67	bc	3,17	a
3	SD12	0,1	% v/v	A	7,33	**b**	4,67	bc	1,50	bc
4	SD12	0,2	% v/v	A	11,83	a	6,67	a	2,00	abc
5	SD10+ SD12	0,25 0,1	% v/v % v/v	A A	10,00	a	6,33	ab	3,17	a
6	Nimitz®	10	ppm pr	A	4,67	c	2,50	d	0,67	c
7	Control no tratado				2,83	c	3,33	cd	1,83	abc

Los recuentos de nemátodos sin movilidad fueron más bajos en las muestras tratadas con Nimitz®. A los 3 DA-A hubo un mayor porcentaje de nemátodos sin movilidad a medida que aumentaron las tasas de SD10 o SD12, lo que sugiere que la actividad temprana de los plaguicidas no dio como resultado una muerte inmediata. A los 14 DA-A, el porcentaje de nemátodos vivos clasificados como sin movilidad no fue diferente estadísticamente entre las jarras tratadas con SD.

Tabla 5. Recuento de nemátodos vivos sin movilidad (%)

Nº Tto.	Nombre Tratamiento	Tasa	Unidad tasa	Código apli.	3 DA-A		14 DA-A		23 DA-A	
1	SD10	0,25	% v/v	A	6,39	e	12,86	b	18,80	a
2	SD10	0,5	% v/v	A	11,18	de	12,55	b	28,61	a
3	SD12	0,1	% v/v	A	15,78	cd	13,51	b	13,16	a
4	SD12	0,2	% v/v	A	25,03	ab	20,85	b	22,59	a
5	SD10+ SD12	0,25 0,1	% v/v % v/v	A A	22,00	bc	17,89	b	27,85	a
6	Nimitz®	10	ppm pr	A	30,55	a	43,06	a	36,67	a
7	Control no tratado				5,91	e	8,54	b	13,01	a

EJEMPLO 10: USO DE MEL COMO NEMATICIDA EN UN SISTEMA DE MICROPARCELAS DE PLANTAS DE PEPINOS

Se utilizó una microparcela al aire libre situada en Thonotosassa, Florida, EE.UU., para estudiar el tratamiento de nemátodos con MEL en plantas de pepino en comparación con Nimitz® y un control no tratado. Se estudiaron seis grupos de tratamiento diferentes, cada uno compuesto por 8 plantas. Para los grupos que recibieron tratamiento con SD12 (0,2% ai/v), el tratamiento se aplicó al suelo una, dos o tres veces. Tanto el recuento de nemátodos como la tasa de agallamiento se midieron al momento de la cosecha. También se midieron el vigor de las plantas, el rendimiento y el peso de las plantas.

Las plantas que recibieron el tratamiento con Nimitz® (5 pt/a) se plantaron en el suelo tratado 7 días antes de la siembra (el tratamiento químico es demasiado fitotóxico para ser aplicado en la temporada de crecimiento). En todas las plantas que recibieron tratamiento con SD12, la primera aplicación de SD12 al suelo (60 ml para cada planta) ocurrió al momento de la siembra. Para las plantas que recibieron tratamiento doble y tratamiento triple con SD12, la segunda aplicación de 60 ml se realizó dos semanas después del primer tratamiento. Para las plantas que recibieron triple tratamiento con SD12, la tercera aplicación de 60 ml ocurrió cuatro semanas después del primer tratamiento.

Los recuentos de nemátodos y las tasas de agallamiento se midieron en todos los grupos 31 días después del tratamiento final con SD12 en el grupo de tratamiento triple. El

día siguiente se midió el vigor de la planta (0-10 índice/escala), el rendimiento (lbs.) Y el peso (lbs.) al día siguiente.

Resultados

Se observó la respuesta a la tasa en el agallamiento (Figura 7 y Tabla 6 (a continuación)) y en los recuentos de nemátodos posteriores al tratamiento (Figura 8 y Tabla 7 (a continuación)). SD12 se comportó según los estándares comerciales. No hubo separación significativa entre los tratamientos con SD12 y el tratamiento con Nimitz®, pero se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con SD12 y el control no tratado. El vigor, el rendimiento y el peso de la planta al momento de la cosecha se indican en la Tabla 8 a continuación.

Tabla 6. Tasa de agallamiento (índice/escala 1-10)

Nº tratamiento	**Nombre tratamiento**	**Tasa**	**Unidad de la tasa**	**Código apli.**	**Tasa de agallamiento**	
1	Sin tratamiento				2,9	a
2	Nirnitz®	5	pt/a	A	1,1	b
3	SD12 x 1	0.2	% ai/v	B	1,1	b
4	SD12 x 2	0.2	% ai/v	BC	0,7	b
5	SD12 x 3	0.2	% ai/v	BCD	0,3	b

LSD (P =0,05) = 0,88; SD = 0,86; CV = 69.39; X2 de Bartlett = 11,754; P (X2 sw Bartlett) = 0,019 *; Replica F = 3,712; Replica Prob (F) = 0,0061; Tratamiento F = 11,133; Tratamiento Prob (F) = 0,0001.

Tabla 7. Recuento de nemátodos

Nº tratamiento	**Nombre tratamiento**	**Tasa**	**Unidad de la tasa**	**Código apli.**	**Recuento de nemátodos**	
1	Sin tratamiento				59	a
2	Nimitz®	5	pt/a	A	27	b
3	SD12 x 1	0,2	% ai/v	B	20	b

Nº tratamiento	Nombre tratamiento	Tasa	Unidad de la tasa	Código apli.	Recuento de nemátodos	
4	SD12 x 2	0,2	% ai/v	BC	18	b
5	SD12 x 3	0,2	% ai/v	BCD	9	b

LSD (P =0,05) = 17,33; SD = 16,3; CV = 63,88; X2 de Bartlett = 17,263; P (X2 de Bartlett) = 0,002 *; Replica F = 2,774; Replica Prob (F) = 0,0261; Tratamiento F = 10,44; Tratamiento Prob (F) = 0,0001.

Tabla 8. Mediciones del vigor de la planta (0-10), rendimiento (libras (kilogramos)) y peso (libras (kilogramos)) en el momento de la cosecha de la planta.

Nº tratamiento	Nombre tratamiento	Tasa	Unidad de la tasa	Código apli.	Vigor		Rendimiento		Peso	
1	Sin tratamiento				6,2	b	2,188 (0,992)	a	1,131 (0,513)	a
2	Nimitz®	5	pt/a	A	8,0	a	3,063 (1,389)	a	1,550 (0,703)	a
3	SD12 x 1	0,2	% ai/v	B	8,1	a	2,438 (1,106)	a	1,288 (0,584)	a
4	SD12 x 2	0,2	% ai/v	BC	8,4	a	2,638 (1,197)	a	1,263 (0,573)	a
5	SD12 x 3	0,2	% ai/v	BCD	8,2	a	3,281 (1,488)	a	1,425 (0,646)	a

EJEMPLO 11 - EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL ATRAYENTE DE NEMATODOS

Los recuentos y los porcentajes de infestación de los nemátodos agalladores de la raíz del sur se tomaron en cuatro cámaras selladas de 11,6 pulgadas x 7,6 pulgadas (29,5 cm x 19,3 cm) que contenían tierra de arena fina enriquecida con un material atrayente. El extracto de raíz de valeriana comprado ya fabricado se mezcló con agua, glicerina vegetal y 20% de alcohol de grano para producir el atrayente.

Cada parcela se inoculó con nemátodos en una zona de 2 cm de diámetro. Se agregaron 10 ml del atrayente de nemátodos en una zona de 3 cm (l) x 1 cm (a), a 2 cm de la zona de inoculación (FIG. 9).

Los recuentos de nemátodos y los porcentajes de infestación se tomaron en tres lugares, 3 días después del tratamiento y 8 días después del tratamiento. Los tres lugares evaluados incluyeron el centro de la zona de inoculación, la zona atrayente y el área no tratada.

Resultados

Los resultados se resumen en la FIG. 10 y en la Tabla 9 (abajo). Las migraciones hacia el área atrayente o no tratada fueron significativamente diferentes como porcentaje de la población total en relación con el área de inoculación. En los eventos de muestreo de las 24 y 48 horas, hubo más nemátodos, más de 14%, contabilizados en la zona atrayente que en las áreas no tratadas de la cámara; sin embargo, la mayoría de los nemátodos estaban, en general, en la zona central donde se inocularon los nemátodos.

Tabla 9. Recuento de nemátodos y porcentaje de infestación en la evaluación de los agentes atrayentes

				Recuento				**Infest %**			
Nº Tto.	**Zona de tratamiento**	**Tasa**	**Unidad de tasa**	**3DA-A**		**8DA-A**		**3DA-A**		**8DA-A**	
1	Centro			63,50	a	22,50	a	62,17	a	76,52	a
2	Tratada- Atrayente	10	mL/item	27,50	b	6,00	b	28,67	b	18,66	b
3	No tratada			8,75	b	1,75	b	9,16	e	4,82	c

Todas las patentes, solicitudes de patentes, solicitudes provisionales y publicaciones mencionadas o citadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad, incluidas todas las figuras y tablas, en la medida en que no sean incompatibles con las enseñanzas explícitas de esta memoria descriptiva.

La descripción de cualquier aspecto o realización de la invención en el presente documento en que usa términos tales como “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” o

“que contiene” haciendo referencia a un elemento o elementos, tiene por objeto proporcionar sustento para un aspecto o forma de realización similar de la invención que “consiste en”, “consiste esencialmente en” o “comprende sustancialmente” ese elemento o elementos en particular, a menos que se establezca lo contrario o esté claramente contradicho por el contexto.