

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 240**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A01N 43/16 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2011 PCT/EP2011/059936**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2011 WO11157747**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2011 E 11725451 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2582247**

54 Título: **Proceso microbiano y composición para uso agrícola**

30 Prioridad:

16.06.2010 US 355447 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.06.2019

73 Titular/es:

**AGRINOS AS (100.0%)
Fornebuveien 1
1366 Lysaker, NO**

72 Inventor/es:

**LÓPEZ-CERVANTES, JAIME y
ROCHIN, KARL REINER FICK**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 716 240 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso microbiano y composición para uso agrícola

5 **Campo de la invención**

Se describen procesos microbianos y composiciones microbianas que mejoran la producción de cultivos, aumentan los procesos defensivos de la planta, disminuyen el nivel de patógenos de las plantas y reducen la cantidad de fertilizante utilizado.

10

Antecedentes de la invención

Los microbios se han utilizado anteriormente en la agricultura. Los ejemplos incluyen los desvelados en las patentes de Estados Unidos 4.952.229; 6.232.270 y 5.266.096.

15

La quitina también se ha utilizado en la agricultura, ya sea como un complejo de proteínas (patente de Estados Unidos 4.536.207) o en combinación con varios microbios (patentes de Estados Unidos 6.524.998 y 6.060.429).

20

El quitosano en combinación con otros componentes se ha utilizado en aplicaciones agrícolas. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 6.649.566; 4.812.159; 6.407.040; 5.374.627 y 5.733.851. También se ha utilizado para tratar semillas de cereales. Véase la patente de Estados Unidos 4.978.381. La patente de Estados Unidos 6.524.998 también describe que el quitosano se puede usar en combinación con microbios específicos para uso agrícola.

25

El documento WO 97/09879 informa sobre el uso de formulaciones de quitosano para tratar los sistemas de raíces de plántulas y plantas jóvenes. El documento WO 2009/031874 informa sobre el uso agrícola de una cepa de *Bacillus subtilis*. El documento EP 1142988 informa sobre microorganismos del género *Bacillus* que contienen quitina y/o quitosano en sus paredes celulares y se pueden usar para mejorar el suelo, para el tratamiento de residuos orgánicos por fermentación, para la fermentación de la soja y para reducir el amargor. El documento US 4915944 informa sobre un agente de control biológico que comprende el micoparásito *Trichoderma harzianum* T-315 (ATCC No. 20671) que tiene actividad fungicida contra hongos de los géneros *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium* y *Fusarium*.

30

35

No obstante lo anterior, existe la necesidad de proporcionar composiciones y procesos microbianos mejorados que mejoren el rendimiento de los cultivos y reduzcan la cantidad de fungicidas e insecticidas convencionales utilizados en aplicaciones agrícolas y hortícolas.

Sumario de la invención

40

Se desvelan composiciones microbianas que comprenden al menos dos componentes. El primer componente comprende HYTa, que es un consorcio de microbios derivados de suelos fértiles y fuentes comerciales. El segundo componente comprende al menos uno de quitina, quitosano, glucosamina y aminoácidos. Los diversos microbios en HYTa son capaces de fijar nitrógeno, digerir proteínas y otros biopolímeros como la quitina y el quitosano, proporcionar protección contra patógenos de plantas y complementar la flora microbiana del suelo. La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

45

También se desvelan procesos en los que las composiciones microbianas mencionadas anteriormente o sus componentes se utilizan para tratar el suelo, semillas, plántulas y/o follaje vegetal.

50

En realizaciones preferidas, HYTa se activa en una solución acuosa durante 24-168 horas para permitir que los microbios crezcan y se reproduzcan antes de usarse en el proceso. Las condiciones de la incubación influyen en las propiedades iniciales generales de HYTa.

55

En una realización preferida, HYTa se activa en presencia de quitina. Los microbios sensibles a la quitina en HYTa proliferan en este ambiente. Esto da como resultado HYTa que tiene todas las propiedades de HYTa. Sin embargo, tiene una capacidad mejorada contra la quitina que contiene patógenos de plantas.

60

En una realización preferida, el HYTa se activa en presencia de quitina, quitosano, glucosamina y aminoácidos. En esta realización, después del crecimiento, el HYTa puede contener quitina residual, quitosano, glucosamina y/o aminoácidos. En estas circunstancias, el cultivo constituye la composición microbiana desvelada y se puede aplicar directamente al suelo, las semillas, las plántulas o el follaje de las plantas. Como alternativa, se pueden agregar uno o más segundos componentes para complementar los segundos componentes que ya están en la composición o para cambiar los componentes presentes en la composición microbiana así formada.

65

En alguna divulgación en el presente documento, el HYTa activado se combina con uno o más segundos componentes y se aplica al suelo, las semillas, las plántulas o el follaje de las plantas o el HYTa y el segundo

componente o componentes se aplican por separado. Tales segundos componentes incluyen quitina, quitosano, glucosamina y aminoácidos.

5 La aplicación de las formulaciones microbianas desveladas permite la eliminación o reducción significativa en la cantidad de fertilizante, fungicida e insecticida utilizado en aplicaciones agrícolas. En alguna divulgación en el presente documento, el uso de las formulaciones microbianas da como resultado una disminución en la cantidad de emisiones de gases de efecto invernadero.

10 También se desvela la composición del suelo tratado que comprende suelo tratado con HYTa.

También se desvela una planta tratada que comprende una planta tratada con HYTa.

15 También se desvelan semillas tratadas, plántulas y plantas que comprenden semillas, plántulas o plantas tratadas con HYTa.

Breve descripción de los dibujos

20 La Figura 1 es un diagrama del área de prueba que implica el crecimiento de trigo duro en Sonora, México, donde se utilizaron HYTa y HYTb.

La Figura 2 es el mismo diagrama que la Figura 3 y muestra las zonas que se vieron comprometidas y sufrieron deterioro por factores externos durante el ensayo.

La Figura 3 muestra gráficamente los resultados del tratamiento del suelo y el follaje del trigo duro con HYTa y HYTb.

25 La Figura 4 muestra el rendimiento de melones en función del tamaño del suelo y el follaje que no fueron tratados o tratados con HYTa y HYTb.

La Figura 5 muestra el rendimiento de patatas con diámetros mayores a 42 mm que se trataron con HYTa, HYTb y HYTc en comparación con patatas sin tratar.

Descripción detallada

30 Se desvelan composiciones microbianas que comprenden HYTa y un segundo componente. HYTa es un consorcio de microbios derivados de otros suelos y fuentes comerciales. El segundo componente comprende al menos uno de quitina, quitosano, glucosamina y aminoácidos. Los diversos microbios en HYTa son capaces de fijar nitrógeno, digerir proteínas y otros biopolímeros como la quitina y el quitosano, proporcionar protección contra patógenos de plantas y complementar la flora microbiana del suelo. Las composiciones microbianas o sus componentes se utilizan para tratar el suelo, semillas, plántulas y/o follaje vegetal.

HYTa

40 Como se usa en el presente documento, el término "HYTa" se refiere a un consorcio de microbios derivados de muestras de suelo fértil y fuentes comerciales. HYTa se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATTC), Rockville, Maryland, el 19 de mayo de 2010 con una designación de depósito asignada de PTA-10973.

45 La Tabla 1 identifica algunos de los microbios en HYTa que se cree que son responsables de los efectos beneficiosos observados cuando se usa para tratar el suelo y/o el follaje.

Tabla 1

<p><u>Bacterias</u></p> <p>I. Azotobacter</p> <p>1. <i>Azotobacter vinlandii</i></p> <p>II. Clostridium</p> <p>1. <i>Clostridium pasteurianum</i></p> <p>2. <i>Clostridium beijerinckii</i></p> <p>3. <i>Clostridium sphenoides</i></p> <p>4. <i>Clostridium bifementans</i></p> <p>III. Lactobacillus</p> <p>1. <i>Lactobacillus paracasei</i> ss. <i>paracasei</i></p> <p>2. <i>Lactobacillus acidophilus</i></p> <p>3. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ss. <i>Bulgaricus</i></p> <p>4. <i>Lactobacillus brevis</i></p>
--

(continuación)

<p>IV. Bacillus</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (<i>Bacillus subtilis</i> (SILOSil® BS) 2. <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstakii</i> (<i>Bacillus thuringiensis</i> (Cepas HD-1)) 3. <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>canadensis</i> (grupo de <i>Bacillus cereus</i>) 4. <i>Bacillus pasteurii</i> (grupo de <i>Bacillus cereus</i>) 5. <i>Bacillus sphaericus</i> (subgrupo I, III y IV) 6. <i>Bacillus megaterium</i> (subgrupo A)
<p>V. Acetobacter o Gluconacetobacter</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Acetobacter aceti</i> ss. <i>licuefaciens</i> 2. <i>Acetobacter aceti</i> ss. <i>xylimum</i>
<p>VI. Enterococcus</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Enterococcus faecium</i> (subgrupo A)
<p>VII. Pediococcus</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Pediococcus pentosaceus</i>
<p>VII. Rhizobium</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Rhizobium japonicum</i>
<p>Hongos</p> <p>I. Saccharomyces</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <p>II. Penicillium</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Penicillium roqueforti</i> <p>III. Monascus</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Monascus ruber</i> <p>IV. Aspergillus</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Aspergillus oryzae</i> <p>V. Trichoderma</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Trichoderma harzianum</i> (TRICHOSIL)
<p>Plantae</p> <p>I. Arthrospiro</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Arthrospira platensis</i> <p>II. Ascophyllum</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Ascophyllum nodosum</i>

Otros microorganismos contenidos en HYTa: *Nitrobacter*, *Nitrosomonads*, *Nitrococcus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus luteus*, *Actinomycece*, *Azotobacter vinelandii*, *Lactobacillus casei*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Streptomyces*.

5 Los microbios activos en HYTa incluyen microorganismos fijadores de nitrógeno nativos del suelo. Estos son *Azotobacter vinelandii* y *Clostridium pasteurianum*. *Bacillus subtilis* proporciona enzimas para descomponer los residuos de las plantas. *Bacillus cereus* proporciona enzimas adicionales para descomponer los residuos vegetales y penicilinas para eliminar las bacterias no deseadas. *Bacillus megaterium* degrada los azúcares complejos después de la descomposición de los residuos del cultivo. *Lactobacillus* proporciona alimento para los microbios en HYTa y controla el pH del ambiente. Los organismos *Nitrobacter* oxidan el amoníaco a nitrito (NO₂), mientras que los microbios de *Nitrosomonas* oxidan el nitrito a nitrato (NO₃).

15 Una propiedad importante de HYTa es la fijación del nitrógeno atmosférico. La capacidad de fijación de nitrógeno de los microbios en HYTa se ve incrementada por la asistencia de otros organismos en HYTa. La fijación de nitrógeno requiere que el fósforo (P), el potasio (K) y el carbono (C) estén disponibles. HYTa contiene microbios que son capaces de descomponer P, K y C dentro del suelo. Además, las bacterias fijadoras de nitrógeno proporcionan una fuente de nitrógeno para los otros microbios en HYTa.

20 La fijación de nitrógeno puede producirse de manera no simbiótica por las bacterias *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*,

Azotobacter vinelandii y *Clostridium pasteurinum* están presentes en HYTa o de forma simbiótica, como ocurre en los nódulos de la raíz a través de la bacteria *Rhizobium*.

5 El carbono requerido por los microbios fijadores de nitrógeno en HYTa es proporcionado por los descomponedores de C que convierten los compuestos orgánicos complejos en el suelo en compuestos simples como azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos. Los descomponedores de C incluyen muchos de los microbios identificados anteriormente.

10 El fósforo es necesario para que los microbios fijadores de nitrógeno proliferen y se obtiene de la actividad metabólica de los descomponedores de P que convierten el fósforo inmovilizado en el suelo en un nutriente de fósforo biodisponible. Los descomponedores de P en HYTa incluyen *Azotobacter*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Micrococcus luteus*.

15 El potasio requerido por los fijadores de nitrógeno es proporcionado por los microbios descomponedores de K presentes en HYTa que activan el potasio del suelo. Los descomponedores de K en HYTa incluyen *Pseudomonas fluorescens*.

20 Tres microbios importantes en HYTa son *Bacillus subtilis* (SILoSIL® BS), cepas de *Bacillus thuringiensis* HD-1 y HD-73 (SILoSIL® BT) y *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL). Estos organismos están presentes en el depósito de ATTC PTA-10973. Se obtuvieron originalmente de Biotecnología Agroindustrial S.A. DE C.V., Morelia, Michoacán, Méjico.

25 *Bacillus subtilis* ((SILoSIL® BS) es una bacteria Grampositiva que es mesofílica y crece a una temperatura óptima entre 25 y 35 °C. Es aeróbica y puede crecer en condiciones anaeróbicas y utiliza una amplia variedad de fuentes de carbono. Contiene dos nitrato reductasas, una de los cuales se utiliza para la asimilación de nitrógeno. Es capaz de secretar amilasa, proteasas, pullulasas, quitinasas, xilanasas y lipasas.

30 *Bacillus thuringiensis* (cepas HD-1 y HD-73 (SILoSIL® BT)) son bacterias grampositivas facultativas anaerobias, en forma de flagelos peritricos. Las cepas HD-1 y HD-73 sintetizan cristales con diversas formas geométricas de actividad proteica e insecticida durante el período de esporas. Las cepas HD-1 y HD-73 secretan exoquitinasas cuando están en un medio que contiene quitina y pueden utilizarse para la degradación de los residuos de crustáceos durante la producción de quitooligosacáridos.

35 *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL) es un hongo saprófito. Presenta acción antibiótica y competencia biológica y por esta razón tiene propiedades de control biológico. Produce enzimas que degradan las paredes celulares o una combinación de tales actividades. Produce glucanasas, quitinasas, lipasas y proteasas extracelulares cuando interacciona con algunos hongos patógenos, tal como *Fusarium*.

40 Como se muestra anteriormente, el metabolismo de cada grupo de bacterias es muy interdependiente y vive en una asociación simbiótica cercana para el desempeño adecuado de HYTa.

45 Además de carbono, hidrógeno, fósforo, potasio, azufre y diversos oligoelementos, una mezcla de factores de crecimiento especiales, tal como el complejo B, L-aminoácidos libres y oligoelementos ultrasolubles son importantes para el crecimiento bacteriano óptimo. Las levaduras de fermentación se incorporan a HYTa para proporcionar estos componentes. El proceso de fijación de N₂ requiere grandes cantidades de ATP. La cantidad de ATP presente de forma natural no es suficiente para alimentar la fijación biológica de N₂. La fermentación de la levadura en HYTa compensa el gran déficit energético. Durante la fermentación, los ácidos orgánicos se forman en el proceso respiratorio y junto con el fósforo liberado por los descomponedores de P, forman ATP. El ATP se utiliza en el proceso de fijación biológica de nitrógeno.

50 HYTa contiene enzimas y microorganismos beneficiosos para el suelo que reemplazan a los que se han agotado debido al uso excesivo de productos químicos, lo que reduce los rendimientos de los cultivos. Al aumentar la actividad microbiana en el suelo con HYTa, la bacteria hace que los nutrientes y los microelementos sean absorbidos (mineralizados) de manera más eficiente y efectiva por las plantas.

55 El humus es transformado por algunos de los microorganismos en HYTa que impregnan el suelo y el aparato radical de la planta. Este proceso proporciona mayor nutrición a la planta. Esto aumenta los nutrientes y los elementos esenciales disponibles en el suelo que pueden ser absorbidos por las plantas.

60 El uso de HYTa solo o en combinación con quitina, quitosano, glucosamina y/o aminoácidos (1) proporcionan nutrientes y elementos en el suelo que aumentan los rendimientos de los cultivos en un 25-55 %, (2) reduce las emisiones de gases de efecto invernadero, (3) aumenta la eficiencia de los fertilizantes minerales (3) reduce el uso de fungicidas convencionales y otros pesticidas, (4) aumenta la producción de reguladores del crecimiento de las plantas, (5) mejora la estructura del suelo, capacidad de labranza y penetración y retención de agua, (6) limpia los residuos químicos y (7) cambia el pH del suelo hacia un pH neutro.

65

COMPOSICIONES MICROBIANAS

Se puede usar HYTa, solo o en combinación, con uno o más componentes seleccionados del grupo de uno o más aminoácidos, quitina, quitosano y/o glucosamina. En algunos casos, la acetil-D-glucosamina se puede incluir en la composición microbiana. La composición microbiana incluye cualquiera y todas las combinaciones de los componentes mencionados anteriormente. Las combinaciones particularmente preferidas incluyen: (1) HYTA y quitina; (2) HYTA y quitosano; (3) HYTa y glucosamina; (4) HYTa y aminoácidos; (5) HYTA, quitina y aminoácidos; (6) HYTA, quitina, quitosano y aminoácidos; (7) HYTA, quitosano, glucosamina y aminoácidos; (8) HYTA, quitosano y glucosamina y (9) HYTa, quitina, quitosano, glucosamina y aminoácidos, siendo este último particularmente preferido.

Cuando HYTa se cultiva en presencia de quitina, quitosano y/o aminoácidos puede contener quitina residual, quitosano y/o aminoácidos. En estas circunstancias, el cultivo de HYTa constituye la composición microbiana desvelada y se puede aplicar directamente al suelo, las semillas, las plántulas o el follaje de las plantas. Como alternativa, se pueden agregar uno o más de los segundos componentes para complementar los segundos componentes en la composición o para cambiar su composición.

Como se usa en el presente documento, el término "aminoácidos" se refiere a una composición que contiene dos o más aminoácidos. Los aminoácidos incluyen triptófano, histidina, treonina, tirosina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina, lisina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, serina, glicina, alanina, prolina, asparagina y arginina. En las realizaciones preferidas, los aminoácidos se proporcionan mediante el uso de HYTb (ver más adelante).

Como se usa en el presente documento, el término "quitina" se refiere a un biopolímero que consiste predominantemente en unidades repetitivas de N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces beta-1-4. La quitina se encuentra en el ambiente natural como un material estructural primario del exoesqueleto de animales tales como *Arthropoda*, por ejemplo, crustáceos, insectos, arañas, etc., *Mollusca*, por ejemplo, caracoles, calamar, etc., *Coelentara*, por ejemplo, organismos tales como los hidroides y medusas, y *Nematoda*, tal como los gusanos no segmentados. La quitina también se encuentra en varios hongos, incluidos los miembros del género *Fusarium*. La quitina se puede extraer de estas fuentes naturales mediante tratamiento con álcali o mediante un proceso de biodegradación. El peso molecular de la quitina varía dependiendo de su fuente y método de aislamiento. En las realizaciones preferidas, la quitina se deriva como un sólido de la biodegradación de artrópodos que contienen quitina como se describe en las aplicaciones de Bioderpac. Se prefiere que la quitina tenga un diámetro de aproximadamente 50 a 75 micrómetros para facilitar su aplicación a través de sistemas de riego por goteo y aspersión.

Como se usa en el presente documento, el término "quitosano" es un polisacárido que consiste predominantemente en unidades repetitivas de D-glucosamina. El quitosano se obtiene por desacetilación de la quitina. El grado de desacetilación en comparación con la quitina es, preferentemente, superior al 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % y 95 %. Se prefiere que el nivel de desacetilación sea suficiente para hacer que el quitosano sea soluble en agua a pH ácido. El peso molecular del quitosano varía según su fuente y método de aislamiento. El quitosano incluye oligómeros de quitosano. En las realizaciones preferidas, el quitosano se precipita a pH 9,0 de la fracción acuosa obtenida de la biodegradación de artrópodos que contienen quitina, tal como se describe en las aplicaciones de Bioderpac.

Como se usa en el presente documento, el término "oligómero de quitosano" se refiere al quitosano que tiene 2 o más unidades repetitivas de D-glucosamina y, en caso de desacetilación incompleta de quitina, una o más unidades de N-acetil-D-glucosamina. En las realizaciones preferidas, los oligómeros de quitosano derivan de la fracción acuosa generada en la biodegradación de quitina contenida en artrópodos, tal como se describe en las aplicaciones Bioderpac. En algunas realizaciones, se usan oligómeros de quitosano como el segundo componente de la composición microbiana.

Como se usa en el presente documento, el término "glucosamina" se refiere a un amino monosacárido. En realizaciones preferidas, es el residuo de azúcar que forma el esqueleto de los biopolímeros quitina y quitosano. La glucosamina está presente en la fracción acuosa generada durante la biodegradación de los artrópodos que contienen quitina, como se describe en las aplicaciones de Bioderpac. La glucosamina induce a las plantas a hacer quitinasa como una defensa contra los patógenos que contienen quitina.

HYTb y HYTc

Como se usa en el presente documento, el término "HYTb" se refiere a la fracción acuosa y "HYTc" se refiere a la fracción sólida obtenida de la biodegradación de artrópodos como los residuos de camarón, derivado de la biodegradación de quitina contenida en artrópodos, tal como se describe en la solicitud de patente estadounidense con número de serie 61/289.706, archivado el 12/23/09 titulado "Biodegradation of Crustacean By-products", solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 61/299,869, presentada el 29 de enero de 2010, titulada "Biodegradation Process and Microbial Composition" y solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 61/355.365 presentada el

ES 2 716 240 T3

16 de junio 2010 titulada "Biodegradation Process and Composition".

5 Brevemente, en el proceso de biodegradación de artrópodos se utiliza una composición microbiana para degradar los componentes de artrópodos o residuos del artrópodo. Es un proceso de fermentación láctica. La composición microbiana contiene microbios que producen enzimas que pueden degradar los componentes que contienen quitina del artrópodo a quitina, quitosano, N-acetil glucosamina y glucosamina. También contiene microbios que producen enzimas que pueden degradar proteínas y grasas para producir aminoácidos y lípidos. Una composición microbiana preferida para la degradación de artrópodos se denomina HQE. HQE se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) Manassas, VA, EE.UU. el 27 de abril de 2010 y recibió la designación de depósito de patente 10 PTA-10861.

En una realización preferida, El artrópodo marino es un crustáceo y el crustáceo preferido es el camarón. El subproducto del camarón comprende el cefalotórax y/o el exoesqueleto del camarón.

15 En el proceso de biodegradación, Se prefiere que la fermentación sea la fermentación aeróbica facultativa. También se prefiere que la fermentación se lleve a cabo a una temperatura de aproximadamente 30 °C a 40 °C. El pH es, preferentemente, menor que aproximadamente 6, más preferentemente menor que aproximadamente 5,5. Sin embargo, el pH debe mantenerse por encima de aproximadamente 4,3. La fermentación se realiza durante aproximadamente 24-96 horas. En algunas realizaciones, la fermentación se lleva a cabo durante aproximadamente 20 24-48 horas y, más preferentemente, 24-36 horas. Estos tiempos de fermentación son mucho más cortos que los tiempos de fermentación típicos de la técnica anterior de 10 a 15 días para lograr sustancialmente la misma cantidad de digestión, aunque sin formación detectable de quitosano y glucosamina.

La separación de la mezcla es, preferentemente, por centrifugación, (por ejemplo a aproximadamente 920 g). La separación por gravedad también se puede usar, pero no se prefiere debido al tiempo requerido para lograr la separación.

La mezcla se separa en tres fracciones: sólida, acuosas y lipídica. La fracción sólida comprende quitina y se designa 30 HYTc. La fracción acuosa comprende hidrolizado de proteína, aminoácidos, quitosano y glucosamina y se designa HYTb. La fracción lipídica comprende esteroides, vitamina A y E y pigmentos carotenoides como la astaxantina.

Es preferible que el HYTb previamente preparado se agregue a HQE o al caldo de fermentación. En otras realizaciones, es preferente que el HYTb preparado previamente se añada a HQE o al caldo de fermentación. Como se ha descrito anteriormente, HYTb contiene aminoácidos, quitosano, glucosamina y oligoelementos, incluyendo calcio, magnesio, cinc, cobre, hierro y manganeso. HYTb también contiene enzimas tales como enzimas lácticas, proteasas, lipasas, quitinasas, ácido láctico, polipéptidos y otros hidratos de carbono. HYTb también puede contener microorganismos inactivos de un proceso de biodegradación anterior. Tales microorganismos pueden reactivarse y, en combinación con HQE, contribuir a un proceso de biodegradación más robusto en comparación con cuando se usa HQE por sí mismo como se describe en este documento.

Más particularmente, el proceso incluye las siguientes etapas:

- a. Activación de las células microbianas en una solución de base de azúcar para mejorar su crecimiento y la formación de biomasa.
- 45 b. Molienda de los subproductos del camarón (cefalotórax y exoesqueleto) para hacer una pasta homogénea.
- c. Mezcla homogénea de la pasta de subproducto de camarón con al menos el 10 % del inóculo activado.
- d. Ajuste de los valores de pH a menos de 6,0 en la mezcla usando una solución de ácido cítrico para inhibir el crecimiento de microorganismos y promover el desarrollo de células microbianas que constituyen el inóculo.
- 50 e. Fermentación de la mezcla en un sistema agitado no continuo a temperaturas dentro de un rango de 30 a 40 °C al menos durante al menos 96 horas manteniendo el pH a menos de 5,0. El pH se monitoriza periódicamente. Si el pH sube por encima de 5,0, se añade un tampón de ácido cítrico en una cantidad para mantener el pH por debajo de 5,0.
- f. Centrifugación del fermento para separar las tres fracciones principales: quitina, líquido hidrolizado y pasta pigmentada.
- 55 g. Enjuague de la quitina cruda y recolección del agua de enjuague para recuperar sólidos finos o minerales.
- h. Secado de la quitina y almacenamiento.
- i. Secado y almacenamiento del hidrolizado líquido.
- j. La pasta pigmentada (fracción lipídica) se almacena en recipientes cerrados para su conservación.

60 El proceso y los fundamentos operativos se entienden mejor con referencia a la siguiente descripción detallada.

Activación de células microbianas

65 Como inóculo se usa una composición microbiana como se desvela en el presente documento. El inóculo de HQE tiene una concentración de microbios de aproximadamente 2,5 a 3,0 % (p/v). El HQE se activa por dilución al 5 % en una solución de caña de azúcar (concentración final de caña de azúcar del 3,75 %) y se incuba a 37 °C durante 5

días. Preferentemente se añade HYTb (10 ml por litro de cultivo) para proporcionar una fuente de minerales y aminoácidos de origen natural. El crecimiento celular de los microorganismos se estimó por la densidad óptica medida a 540 nm. La activación se completa a una densidad óptica de aproximadamente 1,7. La concentración de microbios después de la activación es de aproximadamente 1,9 a 3,0 % (p/v).

5

Preparación de muestras

Las muestras de subproductos de camarón se obtienen de plantas de procesamiento de camarón. El residuo ligeramente descongelado y picado (1500 g por lote) se mezcla con 99 gramos de caña de azúcar (concentración final 6,6 % en peso) y 85,5 ml de HQE activado al 5 % (v/w) (densidad óptica de la celda = 1,7). A continuación, el pH se ajusta a 5,5 usando ácido cítrico 2M.

10

Control de fermentación

La mezcla se incuba a 36 °C con agitación no continua durante 96 h. Durante el proceso de fermentación, el pH se controla mediante un potenciómetro y la acidez titulable total (TTA, %) se determinó mediante titulación con NaOH 0,1 N hasta obtener un pH de 8,5. El TTA se expresa como un porcentaje de ácido láctico.

15

Condiciones de separación

El producto de fermentación es un ensilado viscoso que tiene un color naranja intenso, debido a la presencia de astaxantinas. El ensilaje se centrifuga (5 °C) a 1250 rpm (930 g) durante 15 minutos para obtener la quitina, los hidrolizados líquidos y la pasta de pigmento. La fase superior (pasta de pigmento) se separa manualmente. Los hidrolizados líquidos se separan por decantación y el sedimento que constituye la quitina cruda se lava con agua destilada para separar los sólidos finos. El líquido resultante se recoge y se seca. La quitina cruda, los hidrolizados líquidos y los sólidos finos se secan a 60 °C. Todas las fracciones se almacenan para protegerlas de la luz.

20

25

Otras composiciones microbianas para la producción de HYTb y HYTc se exponen en la siguiente Tabla 2.

30 **Tabla 2**

Composición del cultivo										
Microorganismo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Bacillus subtilis</i>	X	X	X	X		X	X	X		X
<i>Bacillus cereus</i>	X	X		X		X		X		X
<i>Bacillus megaterium</i>	X	X								
<i>Azotobacter vinelandii</i>	X	X		X		X		X		X
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	X	X	X	X	X		X	X	X	
<i>Lactobacillus casei</i>	X	X		X	X			X	X	
<i>Trichoderma harzianum</i>	X	X	X	X		X	X	X		X
<i>Rhizobium japonicum</i>	X	X		X		X		X		X
<i>Clostridium pasteurianum</i>	X	X			X	X			X	X
<i>Bacillus licheniformis</i>	X	X	X		X	X	X		X	X
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	X	X	X		X	X				
<i>Bacillus thuringiensis</i>	X					X	X	X	X	X
<i>Streptomyces</i>	X				X	X	X	X	X	X
<i>Nitrobacter</i>	X						X	X	X	X

(continuación)

Composición del cultivo										
Microorganismo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Micrococcus</i>	X						X	X	X	X
<i>Proteus vulgaris</i>	X						X	X	X	X

Estos microorganismos se derivan preferentemente de HQE y se denominan *Bacillus subtilis* ((SILoSIL® BS), *Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008), *Bacillus megaterium* (Bioderpac, 2008), *Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008), *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL), *Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008), *Clostridium pasteurianum* (Bioderpac, 2008), *Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008), *Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008), cepas de *Bacillus thuringiensis* HD-1 y HD-73 (SILoSIL® BT), *Streptomyces* (Bioderpac, 2008), *Micrococcus* (Bioderpac, 2008), *Nitrobacter* (Bioderpac, 2008) y *Proteus* (Bioderpac, 2008). Cada uno de estos organismos se puede aislar fácilmente de HQE y se puede recombinar para formar la composición microbiana desvelada para degradar los artrópodos para hacer HYTb y HYTc.

HYTb contiene aminoácidos (aproximadamente el 12 % en peso), quitosano (aproximadamente 1,2 % en peso), glucosamina (aproximadamente 1 % en peso) y oligoelementos (aproximadamente 6 % en peso) incluyendo calcio, magnesio, cinc, cobre, hierro y manganeso. También contiene enzimas, tales como enzimas lácticas, proteasas, lipasas, quitinasas entre otras, ácido láctico, polipéptidos y otros hidratos de carbono. La gravedad específica de HYTb es normalmente de alrededor de 1,050-1,054. El contenido promedio de aminoácidos en HYTb para ciertos aminoácidos se muestra en la Tabla 2.

Tabla 3

Perfil de aminoácidos de hidrolizados en polvo seco (mg por g de peso seco)

Aminoácido	Polvo seco
Acido aspártico	38
Acido glutámico	39
Serina	16
Histidina	9
Glicina	28
Treonina	14
Alanina	36,1
Prolina	25,8
Tirosina	70
Arginina	22,2
Valina	20
Metionina	16,4
Isoleucina	18,3
Triptófano	3,1
Leucina	23
Fenilalanina	39
Lisina	13
Aminoácido	Hidrolizados en polvo seco
Total	431

En algunas realizaciones, HYTb puede constituir un segundo componente que se combina con HYTa o se usa por separado como enmienda del suelo y/o como pulverización del follaje.

El componente principal de HYTc es la quitina. Tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2300 daltons y constituye aproximadamente el 64 % en peso de la composición. Aproximadamente el 6 % de HYTc contiene minerales que incluyen calcio, magnesio, cinc, cobre, hierro y manganeso, aproximadamente el 24 % en

peso de proteína y el 6 % de agua. Tiene una densidad específica de aproximadamente 272 Kg/m³. En algunas realizaciones, HYTc puede constituir un segundo componente que se combina con HYTa o se usa por separado como enmienda del suelo y/o como pulverización de follaje.

- 5 HYTa se usa, preferentemente, con HYTb y HYTc, ya sea en combinación o por separado, como enmienda del suelo o pulverización de follaje.

Los microbios en HYTa requieren los oligoelementos calcio, magnesio, azufre, boro, manganeso, cinc, molibdeno, hierro, cobre, sodio, y silicio. Estos oligoelementos importantes pueden obtenerse a menudo de reacciones químicas tóxicas que no son adecuadas para productos certificados orgánicos. Por consiguiente, se prefiere que estos oligoelementos se obtengan de una fuente orgánica tal como HYTb y/o HYTc.

Activación de HYTa

- 15 Las composiciones microbianas mencionadas anteriormente se pueden usar para tratar el suelo, semillas, plántulas y/o follaje vegetal. Sin embargo, HYTa se activa primero antes de usar.

En las realizaciones preferidas, HYTa se activa al incubar un inóculo de HYTa en una solución acuosa durante 24-168 horas para permitir que los microbios crezcan y se reproduzcan antes de ser utilizados en el proceso de tratamiento del suelo, semillas, plántulas y/o follaje vegetal. Las condiciones de la incubación influyen en las propiedades iniciales generales de HYTa.

En una realización, un inóculo de HYTa se diluye con agua en una proporción de 1/100 y se deja incubar a una temperatura de aproximadamente 36 °C a un pH de 6,8-7,1 durante aproximadamente 24 a aproximadamente 168 horas (7 días). HYTb puede usarse opcionalmente durante esta activación. Los microbios fijadores de nitrógeno *Azotobacter vinelandii* y *Clostridium pasteurianum* proliferan en condiciones de crecimiento de nitrógeno reducido. Además, a medida que la concentración de oxígeno disminuye, Los lactobacilos, incluyendo *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*, proliferan. Las unidades formadoras de colonias (UFC) para algunas de las bacterias en HYTa activadas se exponen en la Tabla 3:

Tabla 4

<i>Azotobacter vinelandii</i>	101.050.000 UFC/ml
<i>Clostridium pasteurianum</i>	104.275.000 UFC/ml
<i>Bacillus subtilis</i>	1.100.000 UFC/ml
<i>Bacillus cereus</i>	25.000 UFC/ml
<i>Bacillus megaterium</i>	10.000 UFC/ml
<i>Lactobacillus</i>	500.000 UFC/ml
<i>Nitrobacter</i>	5.000 UFC/ml
<i>Nitrosomonas</i>	2.500 UFC/ml
Total	206.967.000 UFC/ml

El HYTa obtenido después de esta incubación conserva las propiedades beneficiosas de HYTa, pero es particularmente adecuado como enmienda del suelo para el tratamiento de suelos sin nitrógeno debido a las capacidades de fijación de nitrógeno de *Azotobacter vinelandii* y *Clostridium pasteurianum*.

Si hay patógenos del suelo como hongos filamentosos del género *Fusarium* o nematodos, o se cree que están presentes, HYTa puede activarse sustancialmente en las mismas condiciones pero en presencia de quitina. La quitina estimula la expansión de los microbios sensibles a la quitina, como *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces sp.*, *Nitrobacter sp.*, *Micrococcus sp.* y *Bacillus subtilis*. HYTa obtenido en estas condiciones tiene propiedades antifúngicas, fungicidas, antinematodo, nematocidas e insecticidas en la medida en que tales patógenos contengan quitina. Tales composiciones microbianas se pueden aplicar directamente al suelo o a la semilla, plántulas y/o follaje vegetal. Dichas composiciones microbianas también tienen la capacidad de fijar nitrógeno como en la incubación mencionada en ausencia de quitina.

Además de incubar con quitina, HYTa se puede activar con quitina y aminoácidos. Una fuente preferida de quitina es HYTc. Cuando se usa HYTc, las proteínas y los minerales en HYTc también están presentes durante la activación.

Además, HYTa se puede activar en presencia de aminoácidos y quitosano. Una fuente preferida de aminoácidos y quitosano es HYTb. Cuando se usa HYTb, la glucosa y otros componentes de HYTb también están presentes durante la activación.

Opcionalmente, HYTA se puede incubar con quitina, aminoácidos y quitosano. Una fuente preferida de quitina es HYTc. Una fuente preferida de aminoácidos y quitosano es HYTb. Cuando se usan HYTb y HYTc, los otros componentes en estas formulaciones también están presentes durante la activación.

5 Uso de HYTa activado

HYTa activado se puede usar solo o en combinación con otros componentes, tales como quitina, quitosano, glucosamina y aminoácidos para tratar el suelo, las semillas, las plántulas o el follaje.

10 En algunas realizaciones, las combinaciones de estos componentes se pueden aplicar como una mezcla. En otras realizaciones, se pueden aplicar por separado. En otras realizaciones más, los componentes se pueden aplicar en diferentes momentos.

15 En una realización, el HYTa activado se puede aplicar al suelo, las semillas o las plántulas, o utilizar en aplicaciones foliares por aplicación directa al follaje. Sin embargo, cuando los patógenos de las plantas están presentes, se prefiere que la composición microbiana comprenda HYTa activado, quitina y/o quitosano. Como alternativa, el HYTa puede activarse en presencia de quitina. Se sabe que el quitosano tiene propiedades bactericidas, fungicidas y antivirales, así como capacidad para estimular el crecimiento de las plantas y para inducir la resistencia de las plantas a los patógenos. En otras realizaciones, la glucosamina es una parte de la composición microbiana.

20 En una realización preferida, el HYTa activado solo o en combinación con quitina (preferentemente HYTc) y/o quitina, quitosano y aminoácidos (preferentemente HYTb y HYTc), se aplica al suelo, semillas, plántulas y/o follaje. Se prefiere que HYTa se use en combinación con quitina, quitosano, glucosamina y aminoácidos. HYTc es la fuente preferida de quitina, mientras que HYTb es la fuente preferida de quitosano, glucosamina y aminoácidos. Sin embargo, los componentes de la composición microbiana, a saber HYTa, quitina, quitosano, glucosamina y aminoácidos pueden aplicarse por separado o en cualquier combinación o subcombinación. Se pueden aplicar al mismo tiempo o secuencialmente, en cualquier orden dado. Sin embargo, el modo preferido de aplicación es aplicar inicialmente todo al mismo tiempo. La aplicación de los componentes anteriores contempla el tratamiento directo de patógenos de plantas, la inducción de vías de resistencia a patógenos de plantas y la nutrición de los microbios HYTa, la flora autóctona no patógena del suelo y la planta.

35 Cuando el suelo se trata inicialmente con una composición microbiana que comprende HYTa activado solo, los microbios presentes en la composición tienen la oportunidad de poblar el suelo y alterar su composición taxonómica. En algunas situaciones, la colonización inicial por HYTa proporciona poco o ningún nutriente a la planta. En dichos casos, es importante mantener una reserva de nutrientes para sostener tanto el crecimiento de los microbios mientras se coloniza la rizosfera como el crecimiento de las plantas en el suelo. Puede ser necesario repetir la aplicación de HYTa, dependiendo del ciclo de crecimiento y el régimen nutricional de la planta. En otros casos, puede ser suficiente para proporcionar aplicaciones adicionales de aminoácidos, quitina y/o quitosano, por ejemplo, HYTB y HYTc, al suelo previamente tratado.

40 Cuando se usa HYTa en combinación con, por ejemplo, HYTB y HYTc, además, los microbios HYTa y las plantas presentes en el suelo tratado disponen de nutrientes.

45 La Tabla 5 presenta un programa típico de catorce semanas para la aplicación de HYTa, HYTb y HYTc para goteo de cultivos de regadío cultivados en suelo. Los valores son por hectárea. Para HYTa y HYTb, los valores representan litros por semana. Para HYTc, los valores representan kilogramos por semana.

Tabla 5

Lts/kg/semana	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14
HYT-A	3	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
HYT-B	10	5	0	3	2	3	2	3	2	3	2	3	2	3
HYT-C	1			1				1				1		

50 El pulso en el que se inyecta la composición microbiana al sistema de irrigación debe ser uno en el que la composición microbiana pueda alcanzar el sistema radicular y permanecer allí durante la noche mientras el sistema está apagado. Para el máximo rendimiento de HYTc, debe aplicarse al mismo tiempo que una mezcla con HYTa. El protocolo debe continuar mientras la planta continúe en producción. Este protocolo cubre todas las etapas de la planta incluyendo la germinación, la formación de raíces, el crecimiento de la planta, la floración, el cuajado de la fruta, la recolección de la fruta y la re-recolección. Este protocolo está diseñado para el máximo potencial de rendimiento cubriendo aspectos nutricionales, aspectos de la bioestimulación y protección contra enfermedades, tales como nematodos y hongos.

El proceso puede llevarse a cabo poniendo en contacto el suelo para formar un suelo tratado. En algunos casos el proceso se repite. En algunos casos, las plantas, las plántulas o las semillas ya están presentes en el suelo antes del tratamiento con la composición microbiana. En otros casos, las plantas, las plántulas o las semillas se trasplantan al suelo después del tratamiento con la composición microbiana.

5 En general, antes de la aplicación se determina el número de hectáreas o acres a tratar. Luego, la cantidad recomendada de HYTa activado por hectárea o acre se multiplica por el área a tratar y se diluye en agua suficiente para irrigar o pulverizar el suelo o el cultivo en el área a tratar. Se puede seguir el mismo procedimiento para HYTb líquido. El HYTc, siendo un sólido, puede aplicarse directamente como un sólido o como una suspensión en agua. El
10 HYTc, preferentemente, se muele a partículas de tamaño micrométrico antes de su uso.

El proceso se puede realizar con suelo estéril. Tales suelos generalmente son aquellos que tenían al menos uno de baja capacidad de intercambio catiónico, baja capacidad de retención de agua, bajo contenido de materia orgánica y bajos niveles de nutrientes disponibles. En general, el suelo infértil no soporta el crecimiento enérgico de las plantas
15 y/o produce bajos rendimientos de cultivos.

Para sistemas sin suelo, como los hidropónicos, se aplica el mismo protocolo pero con una distribución diaria siguiendo el programa de fertilización-riregación.

20 Las composiciones microbianas se pueden usar en relación con cualquier planta que incluye, entre otras, alfalfa, plátano, cebada, brécol, zanahorias, maíz, pepino, ajo, uvas, puerro, melón, cebolla, patata, frambuesa, arroz, soja, calabaza, fresa, caña de azúcar, tomate y sandía.

25 Cuando se aplica como una enmienda del suelo, la composición microbiana que contiene HYTa, quitina, aminoácidos y quitosano aumenta la producción de cultivos en un promedio entre un 25 % y un 55 % en comparación con el aumento de 15-25 % en la producción de cultivos observada para E2001. De Karl Co. SA de CV, Navojoa, Sonora, Méjico.

30 Los compuestos microbianos también pueden dar como resultado una disminución en la cantidad de quitina utilizada. Por ejemplo, la quitina se ha utilizado como enmienda del suelo en la técnica anterior. Normalmente, se utilizaron aproximadamente 600 kg de quitina por hectárea. Sin embargo, los efectos beneficiosos de tal uso no se observaron hasta por seis meses. Cuando se activó HYTa en presencia de quitina y luego se combinó con quitina y se aplicó como enmienda del suelo, los efectos beneficiosos se observaron después de siete días con el uso de solo
35 4-6 kg de quitina por hectárea.

Aunque la divulgación se refiere principalmente al uso de las composiciones microbianas desveladas para aplicaciones agrícolas, tales composiciones o sus componentes y procesos también pueden usarse en aplicaciones hortícolas para mejorar la producción de follaje y flores y disminuir el uso de insecticidas y fungicidas convencionales.
40

Cuando HYTa activado se aplica al suelo, semillas, plántulas o follaje, forma suelo tratado, semilla tratada, plántula tratada, follaje tratado y plantas tratadas. HYTa es una novedosa composición microbiana. Por lo tanto el suelo, las semillas, las plántulas, el follaje y las plantas tratadas con HYTa también son novedosas.

45 El suelo tratado se define como el suelo que contiene uno o más microbios que son exclusivos de HYTa dispersos dentro del suelo tratado. Dichos microbios pueden detectarse genéticamente en el suelo tratado utilizando un BioChip que detecta poblaciones microbianas basadas en el ADN. Véase, por ejemplo, en la publicación de patente de Estados Unidos 2007/0015175, otros métodos, tales como PCR, que los expertos en la técnica también pueden usar. Los microbios en HYTa que son particularmente preferidos son *Bacillus subtilis* (SiLoSil® BS), *Bacillus thuringiensis*, cepa HD-1, *Bacillus thuringiensis*, cepa HD-73 (SiLoSil® BT) y *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL),
50 cada una de las cuales se puede aislar del depósito de HYTa u obtener de Biotecnología Agroindustrial S.A. DE C.V., Morelia, Michoacán, Méjico. *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL) es el más preferido, ya que es importante durante la activación de HYTa, ya que causa sinergias entre componentes entre los otros microbios en HYTa. La identificación de uno o más de estos microorganismos se puede combinar adicionalmente con la identificación de
55 otros microbios en HYTa, si es necesario, para confirmar la presencia de HYTa o que HYTa estaba presente. Cada una de las cepas de *Bacillus subtilis* (SiLoSil® BS), las cepas de *Bacillus thuringiensis* HD-1 y HD-73 (SiLoSil® BT) y *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL) se depositaron en la ATCC.

60 Las semillas, plántulas, follaje y plantas tratados se definen de manera similar. En estos casos, los microbios de HYTa se encuentran en las superficies de las semillas, plántula,s follaje y plantas tratadas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "que consiste esencialmente en" en relación con HYTa, HYTb y HYTc significa cualquiera de HYTa, HYTb y/o HYTc solos o en combinación sin microbios adicionales.

65

Ejemplo 1

El siguiente ejemplo compara el crecimiento de plantas de pepino persa usando HYTa, HYTb y quitosano en comparación con un control que no se trató con HYTa, HYTb y quitosano.

5 Durante el desarrollo de las plántulas de pepino persa, las semillas se incubaron durante tres horas en una mezcla de 1 litro de agua y 250 gramos de HYTc. Una bolsa de musgo de turba y 250 gramos de quitina micronizada de malla 200 (aproximadamente 75 micrones de diámetro) (HYTc) por bolsa de musgo de turba se mezclaron. Las semillas se sembraron en la mezcla de turba/quitina a 18-24 °C. El desarrollo de la planta después de cinco días
10 después del tratamiento con HYTc fue comparable a los 9 días de desarrollo sin el tratamiento.

Las plántulas tratadas y de control se trasplantaron en 1 hectárea de suelo en un invernadero. El HYTa y el suelo de control se trataron como se indica en la Tabla 5.

15

Tabla 6

	HYT-A	Control
Fertilizante de nitrógeno	150 kg	280 kg
Potasa	160 kg	250 kg
Calcio	80 kg	130 kg
Fósforo	200 kg	320 kg
Magnesio	20 kg	45 kg
Oligoelementos	10 litros	22 litros
Fungicidas	0	20 litros
Insecticidas	0	16 litros
Jabón agrícola de aceite de palma y aceite de oliva	10 litros	0

El suelo que contenía las plántulas tratadas con HYTa se trató con 2 litros de HYTa y 7 litros de HYTb a lo largo del tiempo.

20 HYTa se diluyó en 200 litros de agua y se activó sin la presencia de HYTb o HYTc.

En la segunda semana, se aplicaron un litro de HYTa y tres litros de HYTb al suelo y dos litros de HYTb se aplicaron al follaje de las plantas tratadas con HYT.

25 Hubo un aumento significativo en el rendimiento de pepinos sobre el control. Las plantas de control produjeron 3.000 cajas de veinticinco libras mientras que las plantas tratadas con HYT produjeron 4.300 cajas. Por consiguiente, este ejemplo demuestra un aumento significativo en el rendimiento con HYT y una disminución en la cantidad de fertilizante, insecticidas, fungicidas y otros componentes necesarios.

30 **Ejemplo 2**

La hoja de septoria y el tizón temprano, así como la infección de los tomates de tipo Roma y de tipo beefsteak con *Phytophthora infestans* pueden tratarse mediante el protocolo que se presenta en la Tabla 7. Todos los valores son por hectárea.

35

Tabla 7

	Inicio	Por día	Duración	Aplicación
HYTa	3 litros	0	10 días	Pulverización
HYTa	2 litros	0	10 días	Sistema de goteo
HYTc	20 kg	2 kg	10 días	Pulverización
HYTc	500 g	0	0	Sistema de goteo
HYTb	1 litro	1 litro	10 días	Pulverización

HYTa se diluyó en 200 litros de agua y se activó con HYTc.

Este tratamiento dio como resultado el control de estas infecciones.

5 **Ejemplo 3**

Se trataron 10 acres de tomates Roma con 4 litros de HTA, 10 litros de HYTb y 30 libras de quitina.

El protocolo de aplicación fue el siguiente para 10 acres:

10

Tabla 8

L/lb/Semana			S3	S4	S5		S7
*HYT-A	3	0	0	0	1	0	0
**HYT-A	2	0	0	0	1	0	0
*HYT-B	6		5		5	0	
**HYT-B	4		2	2			
*HYT-C	5				5		
**HYT-C	10		5		5		

*Sistema de riego: Pulverización (follaje)

**Sistema de irrigación: Cinta de goteo

15 Los valores están en litros para HYTa y HYTb y libras para HYTc. El rendimiento del cultivo fue de 46 toneladas de tomates por acre en comparación con 31 toneladas por acre para el control. Esto es un aumento del 36 % en el rendimiento.

Ejemplo 4

20

Nematodo del nudo de la raíz *Meloidogyne spp.* y la enfermedad del moho blanco causada por *Sclerotiniasclerotiorum* se identificaron como problemáticas para el crecimiento de las zanahorias. La Figura 2A muestra el follaje y las zanahorias obtenidas de dicho suelo.

25 El siguiente protocolo se utilizó para tratar una hectárea. Se aplicó un kg de HYTc al suelo en el momento del trasplante. Dos semanas después se aplicaron 1 kg de HYTc y 1,5 litros de HYTa. Dos semanas después se aplicaron 2 kg de HYTc y 1 litro de HYTb. Treinta días después se aplicaron 1,5 kg de HYTc, 1 litro de HYTb y 1 litro de HYTa.

30 Las agallas de la raíz causadas por la infección del nematodo ya no estaban presentes en las zanahorias después del tratamiento. La pudrición blanda algodonosa causada por el moho blanco también estuvo ausente de las zanahorias después del tratamiento.

Ejemplo 5

35

HYTa, HYTb y HYTc se pueden usar para erradicar y controlar la ROYA (*Puccinia dracunculina*) en estragón (*Artemisia dracunculus* L.). Se aplicó un total de 6 litros de HYTb, 15 litros de HYTb y 900 gramos de HYTc a cada hectárea.

40 Se utilizó el siguiente protocolo:

Tabla 9

Producto	Dosificaciones	tiempo	Aplicación
HYTa	2 litros	5 días	pulverización
HYTb	5 litros	5 días	pulverización
HYTc	300 g	5 días	pulverización

El protocolo se repitió dos veces. Este tratamiento redujo el daño de ROYA en el follaje tratado.

Ejemplo 6

5 Este ejemplo desvela un resumen de las pruebas realizadas en cooperación con y bajo la supervisión del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (conocido y referido aquí como el "CIMMYT") <http://www.cimmyt.org/>.

Este ejemplo presenta los datos finales de la cosecha de los diferentes tratamientos. El personal del CIMMYT realizó la recolección de muestras de acuerdo con sus metodologías científicas e información.

10 Estas pruebas se diseñaron para demostrar los siguientes beneficios clave de usar HYTa solo o en combinación con HYTb: (1) la capacidad para mantener un crecimiento de alto rendimiento con diferentes regímenes de fertilizantes y minerales, (2) mejorar el rendimiento del sistema mediante el uso de HYTa o HYTa en combinación con HYTb, y (3) la capacidad para restaurar el suelo de la salud del suelo y aumentar los niveles de fertilidad mediante el uso repetido de los programas de HYT.

El objetivo de la prueba fue determinar el efecto de los niveles de labranza y el manejo de la paja en dos ambientes diferentes de suelos (vecindario y aluvión), investigar la eficiencia de las diferentes formas, tipos y dosis de fertilizantes minerales en combinación con HYT de Agrinos para hacer un uso más eficiente de estos insumos para aumentar la rentabilidad del cultivo de trigo para el productor.

Áreas de prueba

25 Estos ensayos se realizaron en un campo agrícola asociado con el cesionario que se ha utilizado ampliamente para el desarrollo de productos de remediación de suelos, así como para la producción de cultivos comerciales. Este campo agrícola se trató durante los últimos once años con E2001 y productos relacionados de Karl Co. SA de CV, Navojoa, Sonora, Méjico y más recientemente con HYTa y HYTb.

30 Esta área de ensayos está identificada por el CIMMYT con el código de cupón Z 702 Módulo Agrinos-CIMMYT y se encuentra en el Distrito de riego Nr. 38, módulo 4, apartado 15, rollos de riego 1049-0 y 1115-0.

Uno de las principales características de los productos HYT™ es su capacidad para mejorar (en lugar de degradar) los suelos agrícolas con un uso continuo. Para demostrar esta característica del producto HYT™, los ensayos han incluido un área de prueba que no fue tratada con minerales, E 2001 o cualquier producto HYT. El rendimiento de las plantas del cultivo en esta área depende completamente del estado del suelo antes de plantar.

Otra información

- Tipos de cultivos: trigo
- 40 - Variedad: ATIL (trigo duro)
- Fecha de siembra: 23 de diciembre en suelo seco y suelo húmedo en las áreas 2 y 1 de la Figura 3. La siembra se retrasó hasta el 14 de enero, del año siguiente debido a una inundación causada por un problema de irrigación en la parcela contigua.
- Fecha de cosecha: 20-23 de mayo, (aproximadamente 4 meses después de la siembra)
- 45 - Tamaño del área de prueba: 15 hectáreas
- Fertilización mineral. se usó como base para la fertilización, que se considera la mejor práctica de la desosificación de nutrientes minerales NPK generalmente aceptados en la región (BNFP = Mejor práctica de fertilizante nitrogenado).

50 **Tabla 10**

Fertilizantes minerales y protocolos HYT™

Tratamiento	Descripción	Aplicación inicial	Segunda aplicación	Tercera aplicación
Tratamiento 1	Área de control; sin fertilizante	0 unidades de NPK, 0 litros de HYTA o HYTb	0 unidades de NPK, 0 litros de HYTA o HYTb	0 unidades de NPK, 0 litros de HYTA o HYTb
Tratamiento HYTb 2	50 % de HYTA y HYTb	103 unidades de 52 unidades de 1 litro de HYTa	1 litro de HTA; 1 litro de HYTb	1 litro de HTA; 1 litro de HYTb
Tratamiento 3	HYTa + HYTb	1 litro de HYTb	1 litro de HTA; 1 litro de HYTb	1 litro de HTA; 1 litro de HYTb

Tratamiento	Descripción	Aplicación inicial	Segunda aplicación	Tercera aplicación
Tratamiento 4	100 % de BNFP	149 unidades de	61 unidades de	

52 unidades de P

Además de los principales protocolos descritos anteriormente, algunas áreas fueron probadas y cosechadas por separado con algún componente adicional, con el objetivo de obtener un punto de referencia extra y ampliar las posibilidades de análisis. La prueba designada fue la siguiente:

- 5 TRT 5: Tratamiento biológico HYT más 100 % del programa de fertilización mineral tradicional: aplicación inicial: 1 litro de HYT + 103-52-0 (NPK), segunda aplicación 1 litro de HYT + 1 litro de HYT B + 61-0-0 (NPK), tercera implementación 1 litro de HYT B. Este tratamiento adicional fue recomendado por el CIMMYT para observar el comportamiento del programa tradicional del programa de nitrógeno mineral más completo HYT a + b en el rendimiento del grano de trigo. Solo se dedicó un área de 4 filas a este tratamiento y la información fue recopilada solo por el personal del CIMMYT.

Un diagrama del área de prueba se muestra en la Figura 1 donde "TRT" se refiere al tratamiento identificado anteriormente.

15 Factores externos en el área de prueba

Algunas áreas de la zona de prueba se vieron comprometidas y sufrieron deterioro por factores externos. Los resultados de estas áreas se han excluido de los resultados finales de la cosecha para permitir una comparación fiable. Se hace referencia a la figura 2. Estos factores externos fueron los siguientes:

- 20 Área resaltada 1 (Zona 1): La variedad de trigo utilizada es muy susceptible a "Chahuistle". Debido a la proximidad de las áreas 1 y 5 a líneas eléctricas de alta tensión, el avión no pudo aplicar el producto en estas áreas y, en consecuencia, estas áreas sufrieron una mayor incidencia del patógeno, causando una pérdida significativa de rendimiento potencial.

- 25 Las áreas resaltadas 1 y 2 (Zona 2) sufrieron inundaciones debido a problemas de irrigación en las parcelas circundantes, retrasar la siembra en 20 días y verse afectado por el "chahuistle".

- 30 Las áreas resaltadas 9 y 10 (Zona 3) sufrieron una irrigación irregular debido a la topografía del terreno, lo que hace que el rendimiento errático del cultivo que tiene áreas altas y bajas provoque una irrigación no uniforme que afecte el promedio del rendimiento.

Tabla 11

Datos finales de cosecha total reportados para diferentes tratamientos.

Parcela	toneladas métricas por hectárea	Parcela	toneladas métricas por hectárea
Área 1	4,1 *	Área 9	5,4:6,6*
Área 2	4,1 *	Área 10	6,2 *
Área 3	7,8	Área 11	6,8
Área 4	8,3	Área 12	8,3
Área 5	4 *	Área 13	8,3
Área 6	7,1	Área 14	7,7
Área 7	7,4	Área 15	8,2
Área 8	7,9	Área 16	9,0

* Factores externos afectaron a este resultado.

Tabla 12
Resultados del ensayo

Rendimiento			
Toneladas/Ha *	Arcilla*	Aluvial*	Promedio*
100 % de BNFP (Tratamiento 4)	7,45	7,40	7,4
50 % de BNFP más HYTa y HYTb (Tratamiento 2)	7,40	7,20	7,8
Control (Tratamiento 1)	7,90	8,30	8,2
Solo HYTa y HYTb (Tratamiento 3)	8,30	6,50	8,7
*Los resultados de las áreas donde los factores externos afectaron a los resultados no están incluidos			

5 En comparación con el rendimiento promedio de trigo esperado en la región, el uso histórico repetido E 2001 y HYT™ ha contribuido al aumento significativo en el rendimiento del 36 % en comparación con la fertilización estándar solamente. Véase la figura 3. Esto sucedió sin agregar ningún elemento adicional de NPK o HYT durante este ciclo agrícola, dado que las aplicaciones anteriores de E 2001 y HYT ya habían restablecido la actividad y la biodiversidad de las colonias de microbios benignos del suelo, creando altos niveles de materia orgánica y nutrientes disponibles en el suelo.

10 La adición de HYTa y HYTb al sistema de ciclo suelo-planta continúa la mejora de la capacidad del suelo para proporcionar nutrientes a las plantas, incrementando la capacidad de fijación biológica de nitrógeno. Véase la figura 3.

15 Varias combinaciones de regímenes de fertilización estándar, solo o en combinación con HYTa y HYTb no parecen mejorar los resultados en comparación con el uso de HYTa y HYTb. Esto puede deberse a la existencia de suficientes nutrientes almacenados como biomasa en el suelo de años anteriores.

20 Cuando el suelo y el ecosistema tienen suficientes nutrientes disponibles, ya sea a través de FBN y/o altos niveles de biomasa en el suelo, la adición de más fertilizante (NPK) desestabilizó el equilibrio biológico e interfirió con los patrones de absorción de nutrientes de las plantas, posiblemente cambiando la capacidad del cultivo de guiar su propio programa nutricional dados los recursos disponibles en el suelo y la biomasa activa en sus raíces.

Ejemplo 7

25 Los experimentos de campo se realizaron en Pantnagar, India, en el marco del proyecto "Evaluación agronómica de HYT (HYTa, HYTb y HYTc y pulverización foliar de Suryamin). Los detalles se dan a continuación.

Cultivo: TRIGO

30 **Diseño utilizado:** RBD

Replicación: 3

35 **Fecha de siembra:** 19/11/2010

Variedad: PBW-550

Tamaño bruto de la parcela: 6,0 m x 4,0 m=24 m²

40 **Tratamientos:** 12

Detalles del tratamiento

- 45 T-1: Dosis recomendada de NPK
- T-2 T-1 + aplicación en suelo de HYTa (activada durante 72 h) @ 1L en el momento de la siembra
- T-3: T - 1+ aplicación foliar de HYTb @ 2L en el momento de la iniciación de la flor/iniciación de la panícula)
- T-4: T-1 + aplicación en suelo de HYTc @ 2 kg en el momento de la siembra
- T-5: T - 1 + HYTa (activado durante 72 h) @ 1Liter + HYTc @ 2 kg/ha como aplicación de suelo en la siembra
- 50 T-6: T - 1 + aplicación foliar de HYTb @ en el momento de inicio de la floración/iniciación de la panícula + 2L + HYTc @ 2 kg/ha como aplicación de suelo en la siembra
- T-7: T-1 + HYTa (activado durante 72 h) @ 1L + HYTb @ 2L en el momento del inicio de la flor/iniciación de la panícula + HYTc @ 2 kg/ha como aplicación de suelo en la siembra
- T-8: 1/2 dosis NPK + HYTa (activada por 72 h) @ 1L + aplicación foliar de HYTb @ 2L + HYTc @ 2 kg/ha como aplicación de suelo en la siembra

ES 2 716 240 T3

T-9: T-1 + aplicación en suelo de HYTa (activada durante 72 h) @ 2L/ha + aplicación foliar de HYTb @ 5L + HYTc a 5 kg/ha en la siembra

T-10: 1/2 dosis NPK + HYTa (activada por 72 h) @ 2L + aplicación foliar de HYTb @ 5L + HYT-C @ 5 kg/ha como aplicación de suelo en la siembra

T-11: T-1 + 1L/ha de Shriram Suryamin como aplicación foliar en el inicio de la floración

T-12: T-1 + 1L/ha de Shriram Suryamin como aplicación foliar cada uno en maceración y en el inicio de la flor. los rendimientos de grano y paja se exponen en la Tabla 13.

Tabla 13

Efecto de diferentes productos orgánicos HYT sobre rendimiento biológico, grano y rendimiento de paja de la cosecha de trigo.			
Tratamientos	Rendimiento biológico (q/ha)	Rendimiento de grano (q/ha)	Rendimiento de paja (q/ha)
T ₁ : Rec. NPK	82,63	32,00	50,63
T ₂ : T ₁ + HYT-A @ 1,0 l/ha	85,43	33,99	51,50
Tratamientos	Rendimiento biológico (q/ha)	Rendimiento de grano (q/ha)	Rendimiento de paja (q/ha)
T ₃ : T ₁ + HYT-B@ 2,0 l/ha	87,50	35,30	52,20
T ₄ : T ₁ + HYT-C @ 2,0 kg/ha	76,40	31,33	45,07
T ₅ : T ₁ + HYT-A +C	87,63	37,90	49,73
T ₆ : T ₁ + HYT-B+C	84,53	34,80	49,73
T ₇ : T ₁ + HYT-A +B+C	86,93	35,80	51,93
T ₈ : ½ NPK + HYT-A + B + C	56,90	27,13	29,77
T ₉ : T ₁ + HYT-A +B+C (dosis más alta)	88,60	40,27	48,33
T ₁₀ : 1/2 NPK + HYT-A + B + C (dosis más alta)	58,37	28,30	30,07
T ₁₁ : T ₁ + Suryamin (una pulverización)	82,87	32,93	49,93
T ₁₂ : T ₁ + Suryamin (dos pulverizaciones)	83,57	33,17	50,40
S.Em (5 %)	4,33	0,92	4,27
CD (5 %)	12,68	2,71	12,54

La Tabla 14 compara los resultados de rendimiento de grano para los diversos tratamientos con los diferentes componentes y combinaciones de HYT.

Tabla 14

	Rendimiento de grano superior a 32 kilo/hectárea.	CD 2.71	Error est. 0,92
Control	0		
HYTa	1,99	NS	*
HYTb	3,3	*	*
HYTc	-0,67	NS	NS
HYTa + c	5,9	*	*
HYTb + c	2,8	*	*
HYTa + b + c (1L/2L/2Kg)	3,8	*	*
HYTa + b + c (dosis alta de a, b y C: 2 l/5 l/5 kg)	8,27	*	*

NS = No es estadísticamente significativo en comparación con el control
 * = Estadísticamente significativo en comparación con el control

Tal como se puede observar, el uso separado de HYTa y HYTb mejoró el rendimiento de grano en 1,99 y 3,3 kilo por hectárea respectivamente, mientras que el uso de HYTc solo causó una disminución en el rendimiento. Cuando se combinó HYTa con HYTc, el aumento del rendimiento fue de 5,9 kilo por hectárea, que es mayor que la suma de los resultados cuando se utiliza por separado. El uso de HYTb y HYTc dio como resultado un aumento de 2,8 kilo por hectárea y el uso de HYTa, HYTb y HYTc causó un aumento de 3,8 kilo por hectárea. El mayor incremento en el rendimiento de grano se observó para HYTa, HYTb y HYTc utilizados a las dosis más altas indicadas. Esto resultó en un aumento de más del 25 % en el rendimiento de grano sobre el control, es decir, un aumento de 8,3 kilos por

hectárea.

Ejemplo 8

5 Este ejemplo presenta los resultados del crecimiento de la calabacín en el suelo infértil.

En estos experimentos, las plántulas de calabacín se plantaron en macetas de 5 galones que contenían arena "Superstition" infértil. Las combinaciones de HYT A, B y C se aplicaron como se establece en la Tabla 16. Las plántulas se sembraron el 21 de diciembre y la cosecha comenzó el 20 de enero y continuó hasta el 27 de febrero del año siguiente.

10

Tabla 15

Fecha	Tasas de tratamiento aplicadas
16 de diciembre	200 ml de HYT A activado, 10 ml de HYT B y 200 g de HYT C por maceta.
23 de diciembre	10 ml de HYT B por maceta.
30 de diciembre	5 ml de HYT B por maceta.
Enero 5	5 ml de HYT A y 5 ml de HYT B por maceta.
Enero 19	10 ml de HYT B por maceta.
Enero 27	10 ml de HYT A y HYT B por maceta.
3 de febrero	10 ml de HYT B por maceta.
10 de febrero	10 ml HYT A y 10 ml HYT B
17 de febrero	Se aplicaron 5 ml de HYT A y 5 ml de HYT B en cada maceta.
25 de febrero	Se aplicaron 5 ml de HYT B a cada maceta.
1 de marzo	Se aplicaron 5 ml de HYT A y 5 ml de HYT B en cada maceta.

Los resultados se muestran en la tabla 16.

15

Tabla 16

Tratamiento	Rendimiento (g/maceta)
Control 0	0
HYTa	251,6
HYTb	137,9
HYTc	62,6
HYTa + HYTb	472,1
HYTA + HYTc	0
HYTb + HYTc	0
HYTa + HYTb + HYTc	62,3
Estat. A	**
B	**
C	NS
A*B	NS
A*C	**

Tratamiento	Rendimiento (g/maceta)
B*C	NS
NS no es significativo en P <0,05. *, ** son estadísticamente significativos a P <0,05 y P <0,01, respectivamente.	

Tal como se puede observar, hubo un aumento sustancial en el rendimiento del calabacín cuando se usaron por separado HYTa y HYTb y cuando se usaron HYTa y HYTb en combinación.

5 Ejemplo 9

El siguiente protocolo se usó para tratar melones.

Tabla 16

PRODUCTO	ETAPA	► COMIENZO		FLORACIÓN				MADURACIÓN		15 DIAS DESPUES		Listo para cosechar		
		Dosis (kg o l/Ha)												
HYT-a	Tierra	3	0,3	0,25			1		0,5		0,25	0,25		
	Foliar			1		1	1		1		1			
HYT-b	Tierra	3	1	1			3		2		2	2		

10

Los resultados se exponen en la Tabla 17 y la Figura 4.

Tabla 17

CON TRATAMIENTO HYTA Y HYTB							
ACUMULADO				INFORMACION POR HA			
TAMAÑO	PIEZAS	LBS	CAJAS		PIEZAS	LBS	CAJAS
9	299	1.289,860	33		7.407	31.958,395	823
12	838	2.859,835	70		20.790	71.007,580	1.733
15	543	1.719,652	36		13.593	43.059,160	906
18	241	604,131	13		6,074	15.266,914	337
TOTAL	1.921	6.473	153		47.864	161.292	3.799

SIN TRATAMIENTO							
ACUMULADO				INFORMACION POR HA			
TAMAÑO	PIEZAS	LBS	CAJAS		PIEZAS	LBS	CAJAS
9	181	727,936	20		4.481	18.026,691	498
12	493	1.650,330	41		12.247	41.030.815	1.021

15

SIN TRATAMIENTO							
ACUMULADO				INFORMACION POR HA			
TAMAÑO	PIEZAS	LBS	CAJAS		PIEZAS	LBS	CAJAS
15	463	1.489,587	31		11.568	37.168,321	771
18	176	465,597	10		4.432	11.725,728	246
TOTAL	1.313	4.333	102		32.728	107.952	2.536

PORCENTAJE	46,2	49,41 %	49,8
AUMENTO POR HA	5 %		1 %

Ejemplo 10

- 5 Los calabacines se cultivaron según el siguiente protocolo.

Tabla 18

PRODUCTO	SOLICITUD	DOSIS POR HECTÁREA					
		03:07	03:10	03:18	04:04	04:11	04:18
Hyt-a	Suelo	2			1		
Hyt-b	Foliar		1	1	3	1	1
	Suelo	1	1	1		1	1

Los resultados se exponen en la Tabla 19

10

Tabla 19

TAMAÑO	CAJAS/HA		DIFERENCIA EN CAJAS/HA	DIFERENCIA EN %
	CONTROL	TRATADO.		
X	188	228	40	17,54 %
XX	63	145	82	56,55 %
XXX	47	95	48	50,52 %
BRUCE	29	30	1	3,33 %

Ejemplo 11

- 15 Un ensayo con HYTa y HYTb se llevó a cabo en Noruega en un cultivo de patata. Las pruebas con y sin HYTa y HYTb se trataron con 50 o 100 kg de fertilizante nitrogenado/ha. Los pesticidas se usaron en cantidades normales.

En el momento de la primera aparición (14 de junio), Se aplicaron 0,2 litros de HYTa y 0,6 litros de HYTb por decárea. Tras la última aplicación de la suciedad (20 de julio), 0,2 litros de HYTa, se aplicaron 0,2 litros de HYTb y 50 gramos de HYTc a cada hectárea. En la figura 5 se muestran los resultados.

20

El uso de HYTa y HYTb dio un aumento de rendimiento de hasta un 17 % en comparación con el control. Además, hubo menos tizón de la patata en el cultivo tratado con HYTa y HYTb en comparación con el control.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición microbiana que comprende (i) HYTa y (ii) al menos uno de quitina, quitosano, glucosamina y aminoácidos, en la que dicho HYTa comprende los microbios en la designación de depósito de patente ATCC PTA-10973.
2. La composición microbiana de la reivindicación 1 que comprende HYTa y al menos dos, tres o todas de quitina, quitosano, glucosamina, y aminoácidos.
- 10 3. La composición microbiana de las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicha quitina se deriva como un sólido de la biodegradación de artrópodos que contienen quitina, y dichos quitosano, glucosamina y aminoácidos se derivan de la fracción acuosa de la biodegradación de los artrópodos que contienen quitina.
- 15 4. La composición microbiana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha composición comprende quitina y en donde dicha quitina es de HYTc, en donde dicho HYTc comprende la fracción sólida obtenida de la biodegradación de artrópodos que contienen quitina con una composición microbiana que comprende los microbios en HQE, y en donde dicha HQE comprende los microbios en la designación de depósito de patente ATCC PTA-10861.
- 20 5. La composición microbiana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha composición comprende uno o más de quitosano, glucosamina, y aminoácidos, y en donde el quitosano, la glucosamina y los aminoácidos son de HYTb, en donde dicho HYTb comprende la fracción acuosa obtenida de la biodegradación de artrópodos que contienen quitina con una composición microbiana que comprende los microbios en HQE, y en donde dicho HQE comprende los microbios en la designación de depósito de patente ATCC PTA-10861.
- 25 6. Una composición microbiana que comprende HYTa y al menos uno de HYTb y HYTc, en la que dicho HYTb comprende la fracción acuosa obtenida de la biodegradación de artrópodos que contienen quitina con una composición microbiana que comprende los microbios en HQE, en la que dicho HQE comprende los microbios en la designación de depósito de patente ATCC PTA-10861 y dicho HYTc comprende la fracción sólida obtenida de la biodegradación de artrópodos que contienen quitina con una composición microbiana que comprende los microbios en HQE.
- 30 7. La composición microbiana de la reivindicación 6, en donde la composición comprende HYTa, HYTb y HYTc.
- 35 8. La composición microbiana de las reivindicaciones 6 o 7, en donde la composición consiste en HYTa, HYTb y HYTc.
- 40 9. Un proceso que comprende el contacto con el suelo, las semillas, las plántulas o el follaje de la planta con (i) HYTa, en el que dicho HYTa comprende los microbios en la designación de depósito de patente ATCC PTA-10973, o (ii) una composición microbiana como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
10. El proceso de la reivindicación 9, en el que el HYTa es activado en una solución acuosa durante 24-168 horas antes de dicho contacto.
- 45 11. HYTa activado preparado incubando una composición microbiana que comprende HYTa durante 24-168 horas, preparado preferentemente incubando una composición microbiana que comprende HYTa en presencia de HYTc durante 24-168 horas, en donde dicho HYTa comprende una composición microbiana que comprende los microbios en la designación de depósito de patente ATCC PTA-10973 y en donde dicho HYTc comprende la fracción sólida obtenida de la biodegradación de artrópodos que contienen quitina con una composición microbiana que comprende HQE, en donde dicho HQE comprende los microbios en la designación de depósito de patente ATCC PTA-10861.
- 50 12. Un proceso que comprende aplicar una mezcla del HYTa activado de la reivindicación 11 y al menos uno de HYTb y HYTc al suelo, al follaje, a las semillas o a las plántulas.
- 55 13. El proceso de la reivindicación 12, que comprende aplicar el HYTa activado de la reivindicación 11, HYTb y HYTc al suelo, al follaje, a las semillas o a las plántulas.
- 60 14. Una composición que comprende suelo, una planta, semillas o una plántula y una composición microbiana que comprende los microbios en HYTa, en donde los microbios en HYTa comprenden los microbios en la designación de depósito de patente ATCC PTA-10973.

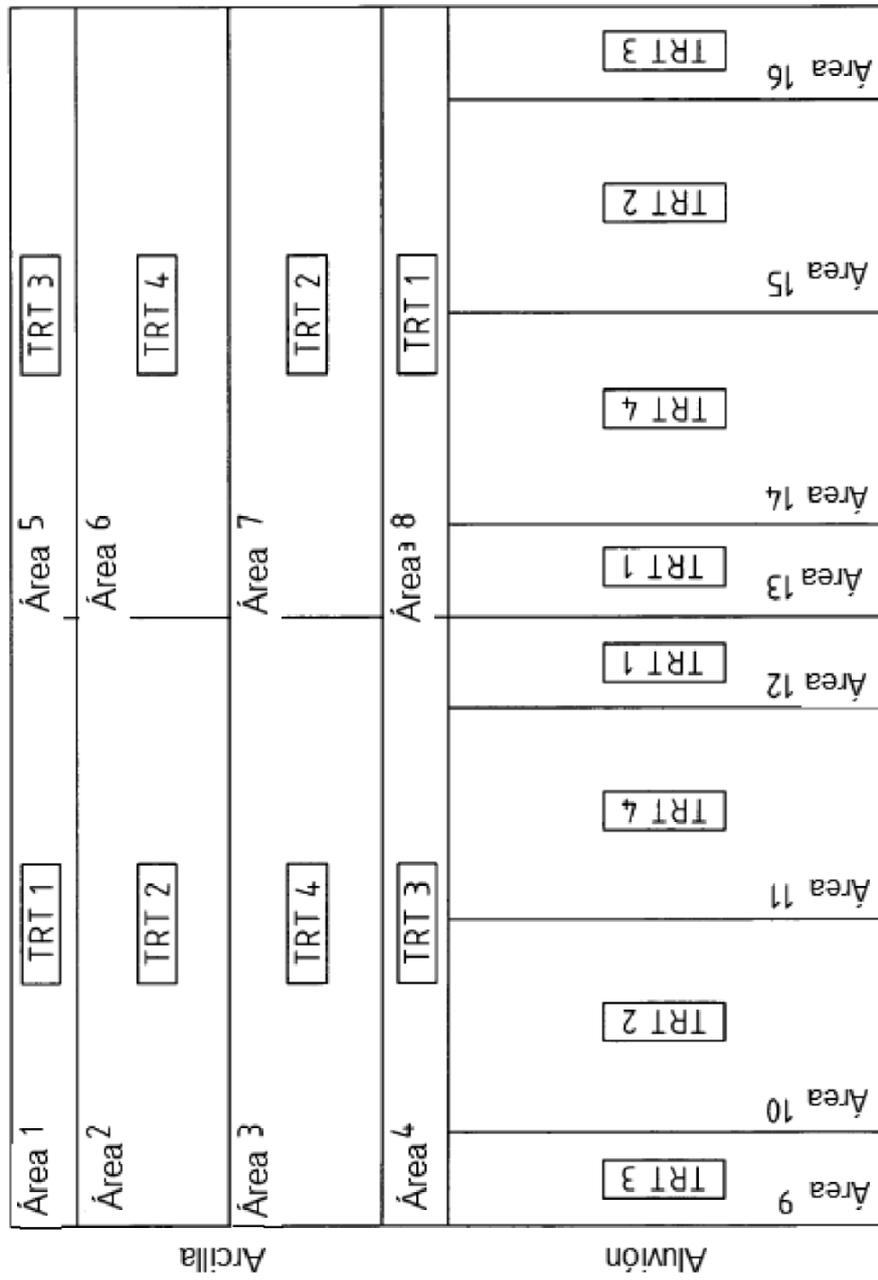


FIG. 1

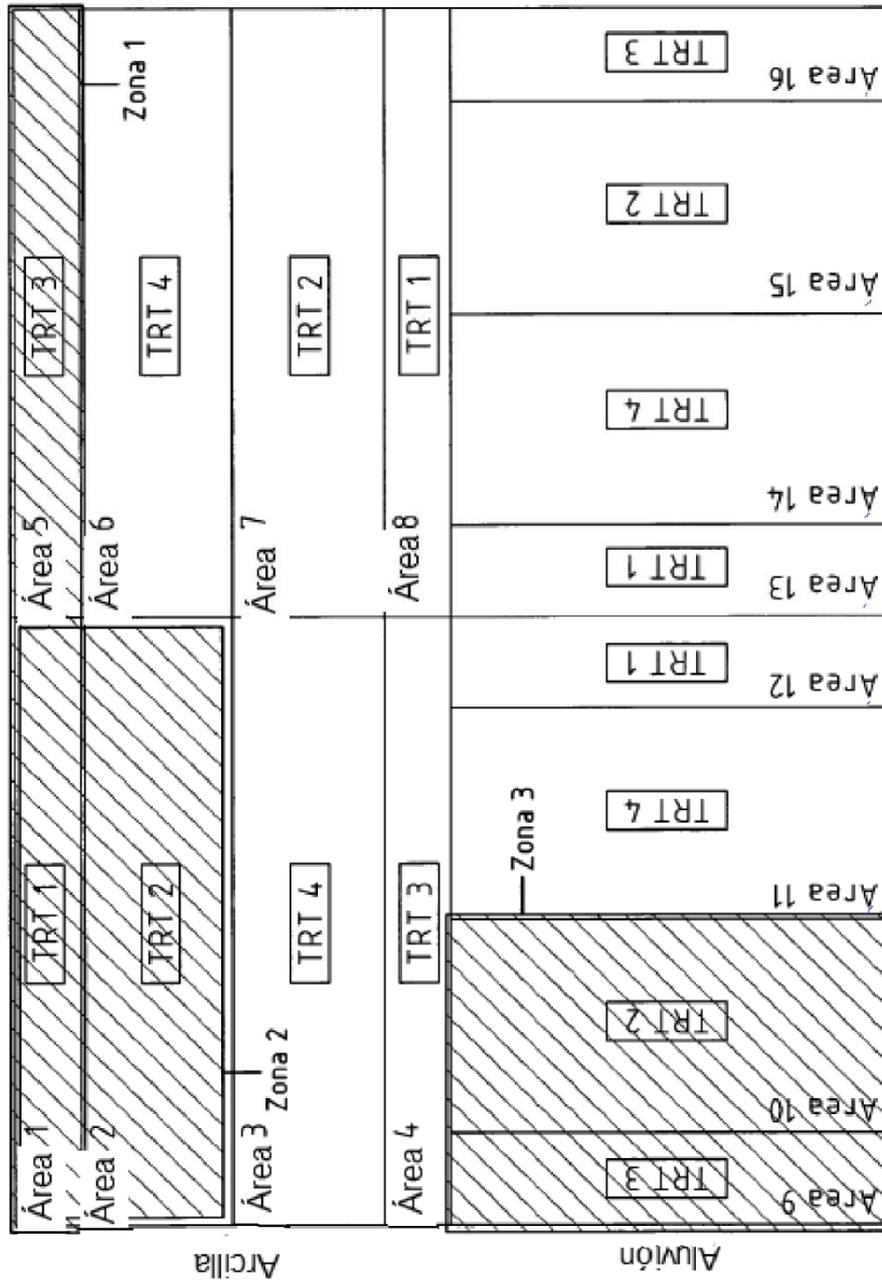


FIG. 2

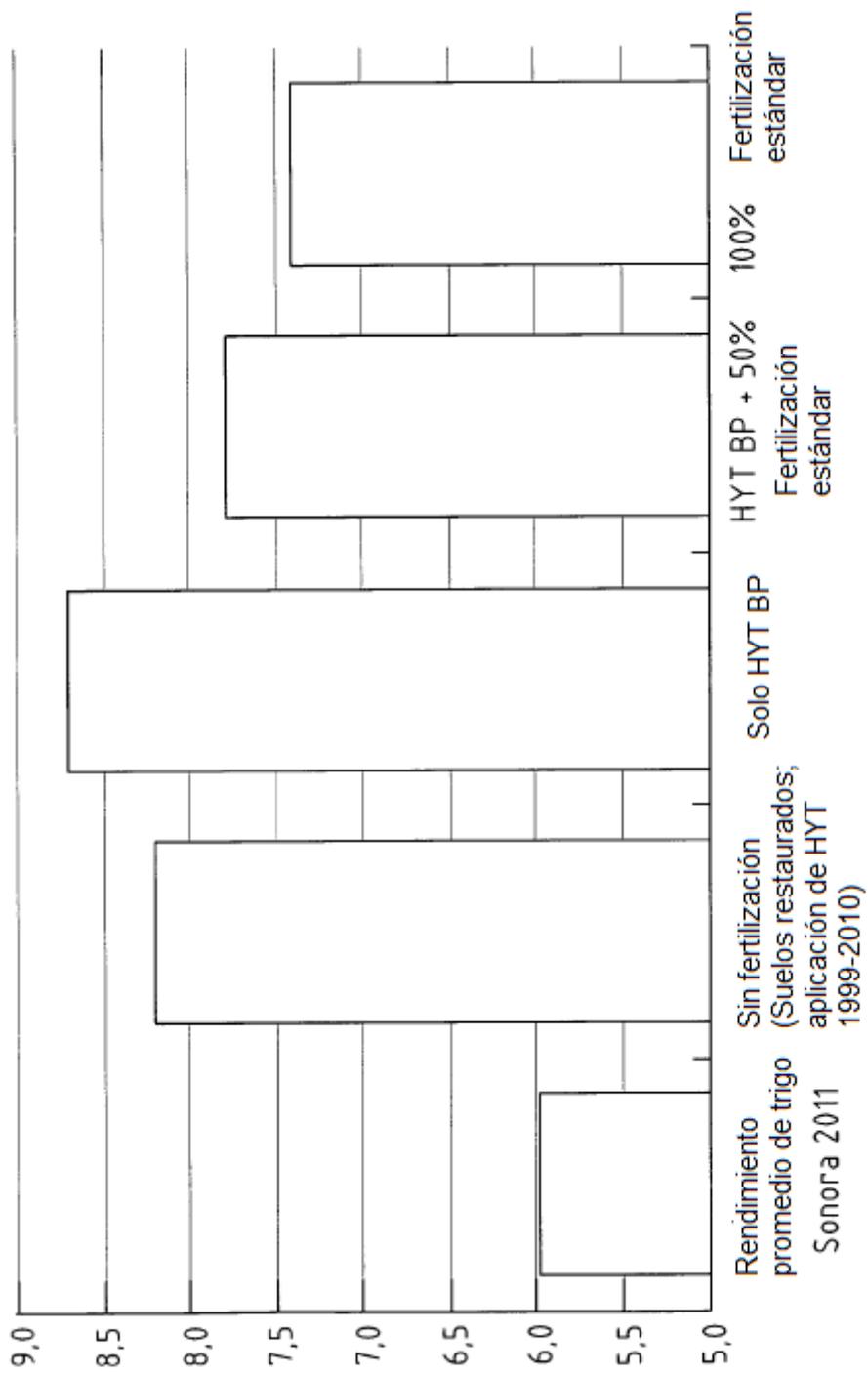


FIG. 3

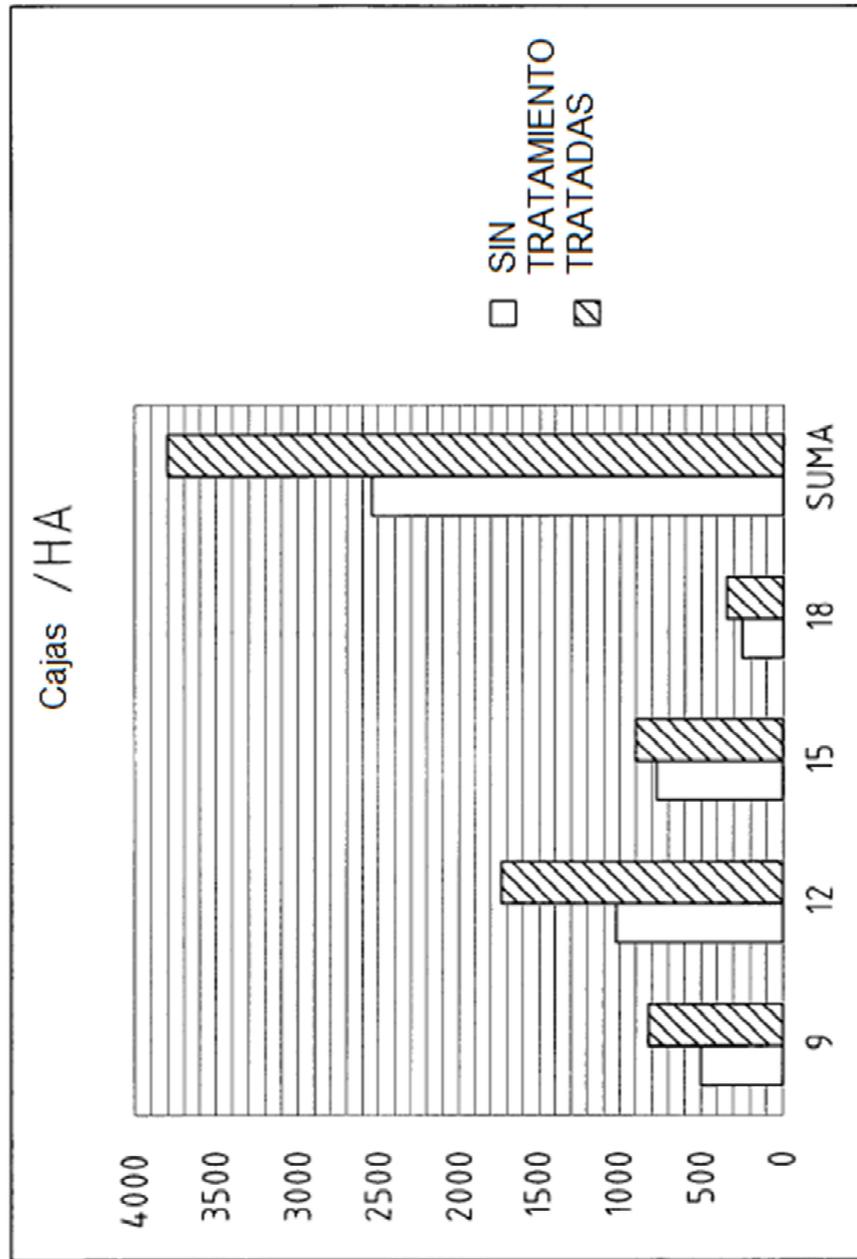


FIG. 4

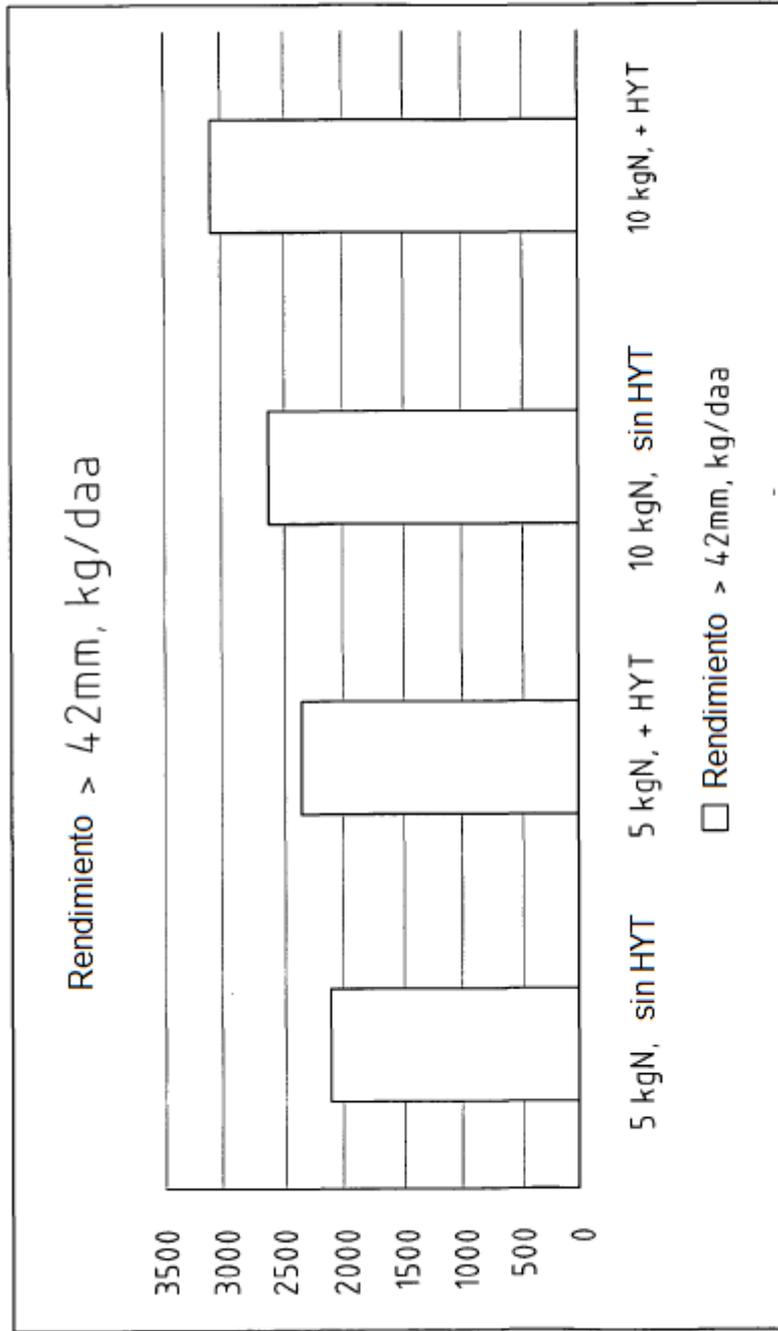


FIG. 5