

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 612**

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C05F 11/08 (2006.01)
C05F 1/00 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
C12R 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2016** **PCT/IB2016/051085**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2016** **WO16135700**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2016** **E 16710333 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019** **EP 3262013**

54 Título: **Consortios microbianos**

30 Prioridad:

27.02.2015 US 201562126343 P

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

26.03.2020

73 Titular/es:

AGRINOS AS (100.0%)
Aker Brygge Business Village, Grundingen 6, 3rd
Floor
0250 Oslo, NO

72 Inventor/es:

YOON, SUNG-YONG H.;
SWORDS, KATHLEEN;
WAGNER, D. RY;
JOHNSON, BRENT;
THORPE, DARRELL T. y
RAJAGOPAL, SELVASUNDARAM

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 750 612 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

Consortrios microbianos

5 **Campo**

Esta divulgación se refiere a consorcios microbianos y a los métodos de uso de los microbios incluidos en los consorcios, particularmente para los procesos y usos de biodegradación y agrícolas.

10 **Antecedentes**

La demanda de alimentos mundial continua creciendo bajo la presión de un crecimiento de la población en aumento. Sin embargo, los trabajadores agrícolas se enfrentan a cantidades reducidas de tierra disponible para la agricultura, agotamiento del suelo y cambio de las condiciones ambientales, entre otros desafíos. Así, existe una necesidad de desarrollar composiciones y técnicas que puedan aumentar la producción de alimentos, disminuyendo también a la vez el uso de herbicidas, insecticidas y fungicidas potencialmente perjudiciales.

Sumario

20 El alcance de la invención en el presente documento se define mediante las reivindicaciones.

Se divulgan en el presente documento consorcios y composiciones microbianas para su uso en aplicaciones de agricultura o biodegradación. En algunas realizaciones, una composición microbiana de la presente divulgación es el consorcio microbiano depositado con la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) el 25 de noviembre de 2014 y el número de depósito asignado PTA-121755 (denominado en el presente documento A1006) o una composición que incluye todos los microbios en A1006. En otros aspectos, una composición de la presente divulgación incluye los microbios de cinco o más especies microbianas seleccionadas entre *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Desulfococcus spp.*, *Desulfotomaculum spp.*, *Marinobacter spp.*, *Nitrosopumilus spp.*, *Ruminococcus spp.*, *Leptospirillum spp.*, *Halorhabdus spp.*, *Clostridium spp.*, *Xenococcus spp.*, *Cytophaga spp.*, y *Candidatus spp.* En algunos aspectos, la composición incluye además uno o más de *Microbacterium spp.*, *Sporosarcina spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Nesterenkonia spp.*, *Agrococcus spp.*, y *Acremonium spp.* En aspectos adicionales, la composición incluye microbios de cinco o más (tal como 5, 10, 15, 20, 25, o más) de los microbios relacionados en Tabla 1. Las composiciones divulgadas pueden también incluir componentes adicionales, incluyendo, aunque no de forma limitativa una o más de las especies de microbios adicionales, quitina, quitosano, glucosamina, y/o aminoácidos.

Se divulgan también usos agrícolas de los consorcios o composiciones microbianas divulgadas. En algunas realizaciones, los métodos (usos) incluyen poner en contacto el suelo, plantas, y/o partes de plantas (tales como semillas, plántulas, brotes, hojas, tallos, o ramas) con un consorcio microbiano divulgado (tal como A1006), una composición que incluye todos los microbios del A1006. Los consorcios microbianos o las composiciones que contienen los microbios pueden aplicarse al suelo, plantas, y/o partes de plantas solos o en combinación con componentes adicionales (tales como microbios adicionales, quitina, quitosano, glucosamina, aminoácidos, y/o suplementos del suelo o fertilizante, tal como fertilizante líquido).

En realizaciones adicionales, los consorcios o composiciones microbianas divulgadas que incluyen microbios se usan en los métodos de degradar materiales biológicos, tales como los materiales biológicos que contienen quitina. En algunos ejemplos, los materiales que contienen quitina se mezclan con un consorcio microbiano (tal como A 1006) o una composición que incluye cinco o más de las especies microbianas relacionadas en la Tabla 1 y fermentadas para producir una mezcla fermentada. La mezcla fermentada se puede separar opcionalmente en fracciones sólidas y líquidas. Las mezclas o las fracciones fermentadas producidas de la anterior se pueden usar en aplicaciones agrícolas en combinación con los consorcios o composiciones microbianas divulgadas o se pueden usar en procesos de degradación adicionales, por ejemplo, para producir niveles aumentado de productos de degradación en las fracciones.

Las anteriores y otras características de la divulgación serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

60 La Fig. 1 es un esquema que muestra un proceso de fermentación ilustrativo utilizado para obtener el consorcio microbiano A1006.

La Fig. 2 es un esquema que muestra un proceso ilustrativo para la biodegradación de un material biológico que contiene quitina (ilustrado como desechos de camarones) con un consorcio microbiano o una composición microbiana divulgados.

65 La Fig. 3 es un esquema que muestra un proceso ilustrativo para la biodegradación de la quitina con un consorcio microbiano o composición microbiana divulgados (tal como A1006).

Las Figs. 4A-4C son gráficos que muestran las curvas de crecimiento de A1006 expuesto a un fertilizante de urea-nitrato amónico líquido (UAN 32) o un cultivo de control a 4 °C (FIG. 4A) o 23 °C (Fig. 4B) y a continuación cultivado en condiciones aerobias o anaerobias.

La Fig. 4C incluye datos de la Fig. 4B, más la curva de crecimiento de A1006 expuesta a fertilizante líquido de fosfato de amonio (AP) 10-34-0 a 23 °C antes del cultivo aerobio o anaerobio.

Las Figs. 5A-5G son gráficos que muestran el efecto sobre el rendimiento del tratamiento del maíz con una composición microbiana (Figs. 5A- 5C y 5E), HYTb (Figs. 5D y 5F), o una composición microbiana en condiciones de estrés hídrico (Fig. 5G).

Las Figs. 6A-6D muestran el efecto sobre el rendimiento del tratamiento del trigo con una composición antimicrobiana (Figs. 6A-6B) o con una composición microbiana más HYTb (Fig. 6C). La Fig. 6D es una imagen digital que muestra raíces de plantas de trigo tratadas con una composición microbiana más HYTb (ensayo) en comparación con las plantas del control.

Las Figs. 7A-7E son una serie de gráficos que muestran el efecto sobre el rendimiento del tratamiento del tomate con A1006 (cinco ensayos, Figs. 7A-7E, respectivamente).

La Fig. 8 es un gráfico que muestra el efecto sobre el rendimiento del tratamiento del girasol con una composición microbiana.

Las Figs. 9 es un gráfico que muestra el efecto sobre el rendimiento del tratamiento del arroz con una composición microbiana.

Las Figs. 10A-10B muestran el efecto sobre el rendimiento del tratamiento de la soja con una composición microbiana (Fig. 10A) o con una composición microbiana más HYTb (Fig. 10B).

La Fig. 11 es un gráfico que muestra el efecto sobre el rendimiento del tratamiento de las fresas con una composición microbiana más HYTb. La Fig. 12 es un gráfico que muestra el efecto sobre el rendimiento del tratamiento de la raíz de la remolacha con una composición microbiana más HYTb. Las Figs. 13A y 13B son gráficos que muestran el efecto sobre el rendimiento del tratamiento de la col verde con una composición microbiana más HYTb en dos ensayos (Figs. 13A y 13B, respectivamente).

La Fig. 14 es un gráfico de un ensayo de vigor del pepino que muestra un primer índice del área de la hoja (LAI) en el día 18 en plantas tratadas con HYTb (A1006). *p<0,01 mediante el análisis ANOVA.

LISTADO DE SECUENCIAS

Cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos relacionadas en el presente documento o en el listado de secuencias acompañantes se muestran utilizando abreviaturas de letras convencionales para las bases de nucleótidos y los aminoácidos, tal como se define en el artículo 1 sección 822 de la ley 37 del Código de Comercio de Estados Unidos. En al menos algunos casos, solo se muestra una hebra de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la hebra complementaria está incluida por cualquier referencia a la hebra expresada.

Las SEQ ID NOS: 1 y 2 son cebadores directos e inversos, respectivamente, utilizados para amplificar el ADN de 16S de A1006.

Descripción detallada

En la naturaleza, el equilibrio de especies microbianas en el suelo está influenciado por el tipo de suelo, la fertilidad del suelo, humedad, los microbios competidores, y las plantas (Lakshmanan et al., Plant Physiol. 166:689-700 2014). La interacción entre las especies microbianas y las plantas está afectada además por las prácticas agrícolas, que pueden mejorar o degradar el microbioma del suelo (Adair et al., Environ. Microbiol. Rep. 5:404-413 2013; Carbonetto et al., PLoS One 9:e99949 2014; Ikeda et al., Microbes Environ. 29:50-59 2014). Los suelos fértiles o muy productivos contienen una composición diferente de microbios nativos en el suelo que tiene los nutrientes agotados y está vinculada a la baja productividad del cultivo. Diferentes especies microbianas se asocian estrechamente con las plantas, en las superficies de las plantas sobre la tierra en la filosfera, en la superficie de las raíces en la rizosfera del suelo, o íntimamente como endofitos. El análisis a gran escala del ADN de estas asociaciones de microbios ha desvelado una inesperada complejidad filogenética (Rincon-Florez et al., Diversity 5:581-612 2013; Lakshmanan et al., Plant Physiol. 166:689-700 2014). Los estudios han determinado que microbiomas complejos pueden estar correlacionados con la productividad de las plantas, el rendimiento de los cultivos, tolerancia al estrés, la acumulación de metabolitos secundarios, y la tolerancia a la enfermedad (Bhardwaj et al., Microbial Cell Factories 13:66-75,2014; Vacheron et al., Frontiers Plant Science 4:1-19 2014). Además, las plantas pueden seleccionar específicamente las mezclas microbianas del entorno local y potencialmente afinar el microbioma al nivel de la variedad del cultivo (Hartmann et al., Plant Soil 321:235-257 2009; Doornbos et al., Agron. Sustain. Dev. 32:227-243 2012; Marasco et al., PLoS One 7:e48479 2012; Peiffer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110:6548-6553; Bulgarelli et al., Ann. Rev. Plant Biol. 64:807-838 2014).

Los microbios asociados a las raíces pueden promover el crecimiento de las plantas y las raíces promoviendo el ciclo y la adquisición de nutrientes, mediante fitoestimulación directa, mediante la biofertilización, u ofreciendo una ventaja de crecimiento a través del biocontrol de los patógenos. Las poblaciones agrícola-mente útiles incluyen rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas (PGPR), bacterias supresoras de patógenos, micorrizas, cianobacterias fijadoras de nitrógeno, endofitos de tolerancia al estrés, más microbios con una gama de capacidades biodegradadoras. Los microbios implicados en el ciclo del nitrógeno incluyen los géneros *Azotobacter* y

Bradyrhizobium fijadores de nitrógeno, cianobacterias fijadoras de nitrógeno, las bacterias oxidantes de amoníaco (por ejemplo, los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrospira*), géneros oxidantes de nitritos tales como *Nitrospira* y *Nitrobacter*, y bacterias desnitrificantes heterótrofas (por ejemplo, géneros *Pseudomonas* y *Azospirillum*; Isobe y Ohte, *Microbes Environ.* 29:4-16 2014). Las bacterias notificadas por ser activas en solubilización y aumentar el acceso de la planta al fósforo incluyen los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, y *Flavobacterium*, más numerosos géneros de hongos (Pindi et al., *J. Biofertil. Biopest.* 3:4 2012), mientras que las especies de *Bacillus* y *Clostridium* ayudan a solubilizar y movilizar el potasio (Mohammadi et al., *J. Agric. Biol. Sci.* 7:307-316 2012). La fitoestimulación del crecimiento de las plantas y el alivio de los estreses biótico y abiótico se administra por numerosas asociaciones bacterianas y fúngicas, directamente mediante la producción de metabolitos secundarios estimuladores o indirectamente estimulan las respuestas de defensa de la planta a bajo nivel (Gaiero et al., *Amer. J. Bot.* 100:1738-1750 2013; Bhardwaj et al., *Microbial Cell Factories* 13:66-76 2014).

Además de la actividad en el entorno, los microbios pueden también administrar propiedades biodegradadoras únicas *in vitro*, en condiciones de fermentación dirigida. El uso de mezclas microbianas específicas para degradar la quitina y la proteína total pueden dar como resultado nuevas moléculas bioactivas tales como L-aminoácidos libres, L-péptidos, quitina, y quitosana, conocidos por potenciar el crecimiento o el refuerzo de la tolerancia al estrés mediante la activación de la inmunidad innata en plantas (Hill et al., *PLoS One* 6:e19220 2011; Tanaka et al., *Plant Signal Behav.* E22598-147/2013). Las comunidades microbianas específicas pueden servir a múltiples tareas, administrando productos únicos de descomposición de la fermentación, que son por sí mismos biológicamente beneficiosos para los cultivos, más el consorcio microbiano resultante, que se puede administrar como un producto agrícola para potenciar la productividad del cultivo.

Como se describe en el presente documento, los consorcios de microbios aerobios y/o anaerobios derivados de suelo fértil y fuentes marinas han cofermentado y estabilizado satisfactoriamente, ofreciendo beneficios de crecimiento directo y rendimiento a los cultivos. La actividad enzimática de estas mezclas microbianas fa dado como resultado además productos de fermentación con quitina, glucosamina, proteínas, y/o aminoácidos. En algunas realizaciones, la administración directa de consorcios y/o composiciones microbianas puede permitir la colonización temprana de la raíz y promover la rizosfera o las asociaciones endofíticas. En algunas realizaciones, los beneficios de la administración de consorcios microbianos a las plantas incluyen uno o más de crecimiento de la raíz aumentado, aumento de la producción de raíces pilosas, aumento del área superficial de la raíz, plantas más fuertes capaces de soportar el choque del trasplante, un establecimiento del tallo más rápido, resistencia al estrés abiótico, y mayor productividad y rendimiento vegetal. Las mezclas microbianas complejas pueden extenderse a través de las especies de plantas y genotipos, interactuando con las comunidades microbianas del suelo para ofrecer beneficios a una amplia gama de cultivos que crecen en condiciones agrícolas diferentes.

I. Términos

A menos que se indique cósalo contrario, los términos técnicos se usan según su uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología molecular pueden encontrarse en Krebs et al., *Lewin's Genes XI*, publicado por Jones y Bartlett Learning, 2012 (ISBN 1449659853); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicada por Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829); Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por Wiley, John & Sons, Inc., 2011 (ISBN 8126531789); y George P. Rédei, *Encyclopedic Dictionary of Genetics, Genomics, and Proteomics*, 2ª Edición, 2003 (ISBN: 0-471-26821-6).

Las siguientes explicaciones de términos y métodos se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y guiar a las personas normalmente expertas en la materia en la práctica de la presente divulgación. Las formas en singular "un", "uno/a", se refieren a uno o más de uno, salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión "que comprende una célula" incluye células individuales o una pluralidad de células y se considera equivalente a la frase "que comprende al menos una célula". Tal como se usa en el presente documento, "comprende" significa "incluye". Así, "que comprende A o B", significa "que incluye A, B, o A y B," sin excluir elementos adicionales. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, que incluye las explicaciones de términos, prevalecerá.

Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o en el ensayo de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la presente divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de los términos específicos:

Animales acuáticos: Un animal que vive en agua salina o fresca. En las realizaciones concretas divulgadas en el presente documento, un animal acuático incluye artrópodos acuáticos, tal como gambas, krill, copépodos, percebes, cangrejos, langostas, y cangrejos de río. En otras realizaciones, un animal acuático incluye pescado. Un **subproducto de un animal acuático** incluye cualquier parte de un animal acuático, particularmente las partes resultantes del procesamiento comercial de un animal acuático. Así, en algunos ejemplos, los subproductos de animales acuáticos incluyen uno o más del cefalotórax o exoesqueleto de la gamba, exoesqueleto de cangrejo o langosta o piel o escamas del pescado.

Puesta en contacto: Colocación en asociación física directa, incluyendo en forma sólida y en forma líquida. Por ejemplo, se puede producir la puesta en contacto con uno o más microbios (tal como los microbios en un consorcio microbiano) y una muestra biológica en solución. La puesta en contacto se puede producir también con uno o más microbios (tales como los microbios en un consorcio microbiano) y suelo, plantas, y/o partes de plantas (tales como follaje, tallo, plántulas, raíces, y/o semillas).

Cultivo: Crecimiento intencionado de uno o más organismos o células en presencia de fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales minerales. En un ejemplo, dicho crecimiento puede tener lugar en un medio nutritivo sólido o semisólido, o en un medio líquido en el que los nutrientes se disuelven o suspenden. En un ejemplo adicional, el cultivo puede tener lugar sobre una superficie o mediante un cultivo sumergido. El medio nutritivo puede estar compuesto de nutrientes complejos o puede definirse químicamente.

Fermentación: Un proceso que da como resultado la rotura de compuestos orgánicos complejos en compuestos más simples, por ejemplo, mediante células microbianas (tales como bacterias y/u hongos). El proceso de fermentación puede producirse en condiciones aerobias, condiciones anaerobias, o ambas (por ejemplo, en un volumen grande donde algunas porciones son aerobias y otras porciones son anaerobias). En algunas realizaciones no limitantes, la fermentación incluye la rotura enzimática y/o no enzimática de los compuestos presentes en animales acuáticos o subproductos animales, tales como quitina.

Fertilizante líquido: Una solución o suspensión acuosa que contiene nitrógeno soluble. En algunos ejemplos, el nitrógeno soluble en un fertilizante líquido incluye una fuente orgánica de nitrógeno tal como urea, o urea derivada de amoníaco anhidro (tal como una solución de urea y nitrato de amonio (UAN)). Se puede usar también una solución acuosa de amoníaco (20-32 % de amoníaco anhidro). En otros ejemplos, el nitrógeno soluble en un fertilizante líquido incluye sales inorgánicas que contienen nitrógeno tales como hidróxido de amonio, nitrato de amonio, sulfato de amonio, pirofosfato de amonio, tiosulfato de amonio o combinaciones de dos o más de los mismos. En algunas realizaciones, el fertilizante líquido incluye una fuente de nitrógeno de origen no natural (tal como pirofosfato de amonio o tiosulfato de amonio) y/u otros componentes de origen no natural.

Las mezclas de fertilizantes no naturales líquidos comunes se especifican por su contenido de nitrógeno-fosfato-potasio (porcentajes de N-P-K) e incluyen la adición de otros componentes, tales como azufre o cinc. Los ejemplos de mezclas preparadas por el ser humano incluyen 10-34-0, 10-30-0 con 2 % de azufre y 0.25 % de cinc (quelados), 11-37-0, 12-30-0 con 3 % de azufre, 2-4-12, 2-6-12, 4-10-10, 3-18-6, 7-22-5, 8-25-3, 15-15-3, 17-17-0 con 2 % de azufre, 18-18-0, 18-18-0 con 2 % de azufre, 28-0-0 de UAN, 9-27-0 con 2 % de azufre y tiosulfato de potasio.

Microbio: Un microorganismo, incluyendo, aunque no de forma limitativa bacterias, arqueobacterias, hongos, y algas (tales como microalgas). En algunos ejemplos, los microbios son organismos unicelulares (por ejemplo, bacterias, cianobacterias, algunos hongos, o algunas algas). En otros ejemplos, el término microbios incluye organismos multicelulares, tales como determinados hongos o algas (por ejemplo, hongos filamentosos multicelulares o algas multicelulares).

Composición microbiana: Una composición (que puede ser sólida, líquida, o al menos parcialmente ambas) que incluye al menos un microbio (o una población de al menos un microbio). En algunos ejemplos, una composición microbiana es uno o más microbios (o una o más poblaciones de microbios) en un medio líquido (tal como un almacenamiento, cultivo, o medio de fermentación), por ejemplo, como una suspensión en el medio líquido. En otros ejemplos, una composición microbiana es uno o más microbios (o una o más poblaciones de microbios) sobre la superficie o incluidos en un sólido o medio gelatinoso (incluyendo, aunque no de forma limitativa una placa de cultivo), o una suspensión o pasta.

Consortio microbiano: Una mezcla, asociación, o ensamblaje de dos o más especies microbianas, que en algunos casos están en contacto físico entre sí. Los microbios en un consorcio pueden afectarse entre sí mediante contacto físico directo o mediante interacciones bioquímicas, o ambos. Por ejemplo, los microbios en un consorcio pueden intercambiar nutrientes, metabolitos, o gases entre sí. Así, en algunos ejemplos, al menos alguno de los microbios de un consorcio puede ser metabólicamente interdependientes. Dichas interacciones interdependientes pueden cambiar en carácter y extensión a través del tiempo y con condiciones de cultivo cambiantes.

II. Consorcios y composiciones microbianas

Se divulgan en el presente documento varios consorcios microbianos. un consorcio microbiano ilustrativo de la presente divulgación se depositó con la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) el 25 de noviembre de 2014, y se le asignó el número de depósito PTA-121755, denominado en el presente documento A1006. El consorcio A1006 incluye al menos *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Lactobacillus* spp., *Desulfococcus* spp., *Desulfotomaculum* spp., *Marinobacter* spp., *Nitrosopumilus* spp., *Ruminococcus* spp., *Leptospirillum* spp., *Halorhabdus* spp., *Clostridium* spp., *Xenococcus* spp., *Cytophaga* spp., *Candidatus* spp., *Microbacterium* spp., *Sporosarcina* spp., *Lysinibacillus* spp., *Nesterenkonia* spp., *Agrococcus* spp., *Sphingomonas* spp., *Micrococcus* spp., *Paenibacillus* spp., *Acremonium* spp., *Leucobacter* spp., *Brevundimonas* spp., *Rhizobium* spp., *Chitinophaga* spp.,

Brevibacillus spp., *Virgibacillus spp.*, *Rummeliibacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, y *Oceanobacillus spp.* detectado en A1006 mediante el análisis de la micromatriz y/o la secuenciación del ADN de 16S. Se divulgan también en el presente documento consorcios o composiciones microbianas que incluyen dos o más (tal como 2 o más, o 5 o más, 10 o más, 20 o más, o 50 o más) o todos los microbios en A1006. En algunas realizaciones, una composición microbiana divulgada en el presente documento es una composición definida, por ejemplo, una composición microbiana que incluye especies microbianas especificadas y opcionalmente, componentes no microbianos adicionales (que incluyen, aunque no de forma limitativa, sales, oligoelementos, quitina, quitosano, glucosamina, y/o aminoácidos).

Como se describe posteriormente, se determinó la identidad de algunos microbios presentes en A1006 usando el análisis de la micromatriz (Ejemplo 3) y/o la secuenciación del ADN de 16S (Ejemplo 5). Las personas normalmente expertas en la técnica conocen las técnicas adicionales para identificar microbios presentes en una mezcla o consorcio microbiano, incluyendo la secuenciación o el análisis de la PCR de los ácidos nucleicos, tales como el ADN de 16S, procedente de colonias microbianas individuales que crecen desde dentro del consorcio o mezcla. Las técnicas adicionales para identificar microbios presentes en una mezcla o consorcio microbiano incluyen también 1) métodos basados en ácidos nucleicos que están basados en el análisis y la diferenciación del ADN microbiano (tal como el análisis de la micromatriz de ADN de los ácidos nucleicos, la metagenómica o la hibridación *in situ* acoplada con la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS)), 2) métodos bioquímicos que se basan en la separación e identificación de una gama de biomoléculas que incluye el análisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), El análisis de espectrometría de masas con tiempo de vuelo mediante desorción/ionización de láser asistida por matriz, o el análisis del ácido micólico celular mediante análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (MICO-LCS), y 3) los métodos microbiológicos que se basan en herramientas tradicionales (tales como crecimiento selectivo y examen microscópico) que proporcionan características más generales de la comunidad como un completo, y/o restringen e identifican solo un pequeño subconjunto de los miembros de esta comunidad.

En algunos ejemplos, los microbios en una mezcla o consorcio se separan (por ejemplo, usando técnicas de dimensionamiento físico y/o técnicas de clasificación celular) seguidas por secuenciación del ADN profundo o del genoma completo de los microbios resultantes (o subgrupos o subpoblaciones de microbios). El uso de una micromatriz diferente o el uso de otras técnicas de identificación puede identificar la presencia de diferentes microbios (más, unos pocos, o diferentes taxones o especies que el análisis de la micromatriz llevado a cabo en A1006 descrito en el presente documento, debido a las diferencias en la sensibilidad y especificidad de la técnica de análisis seleccionada. Además, diversas técnicas (incluyendo el análisis de la micromatriz o el análisis del ADN mediante la PCR) pueden no detectar microbios concretos (incluso si están presentes en una muestra), por ejemplo, si las sondas capaces de detectar microbios concretos no están incluidas en el análisis. Además, una persona normalmente experta en la materia reconocerá que la clasificación microbiana y la denominación pueden cambiar en el tiempo y dar como resultado una reclasificación y/o un renombramiento de los microbios.

En otros aspectos, los consorcios o composiciones microbianas divulgados incluyen, consisten esencialmente, o consisten de 2 o más (tal como 5 o más, 10 o más, 15 o más, 20 o más, o todos) los microbios relacionados en la Tabla 1.

Tabla 1. Microbios

Microbio	Especies ilustrativas
<i>Desulfococcus spp.</i>	
<i>Desulfotomaculum spp.</i>	
<i>Marinobacter spp.</i>	<i>Marinobacter bryozorum</i>
<i>Nitroaopumilus spp.</i>	
<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus pocheonensis</i> , <i>Bacillus clausii</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus pasteurii</i> , <i>Bacillus sphaericus</i> , <i>Bacillus flexus</i>
<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>Ruminococcus spp.</i>	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>
<i>Leptospirillum spp.</i>	<i>Leptospirillum ferro Diazotroph</i>
<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Halorhabdus spp.</i>	

(continuación)

Microbio	Especies ilustrativas
<i>Clostridium spp.</i>	<i>Clostridium butyricum</i> , <i>Clostridium pasteurianum</i> , <i>Clostridium beijerinckii</i> , <i>Clostridium sphenoides</i> , <i>Clostridium bifermentans</i>
<i>Xenococcus spp.</i>	
<i>Cytophaga spp.</i>	
<i>Microbacterium spp.</i>	<i>Microbacterium testaceum</i> , <i>Microbacterium paraoxydans</i>
<i>Lysinibacillus spp.</i>	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>
<i>Sporosarcina spp.</i>	
<i>Nesterenkonia spp.</i>	
<i>Agrococcus spp.</i>	<i>Agrococcus terreus</i>
<i>Acremonium spp.</i>	<i>Acremonium bacillisporum</i>
<i>Candidatus spp.</i>	
<i>Paenibacillus spp.</i>	<i>Paenibacillus chibensis</i> , <i>Paenibacillus lautus</i> , <i>Paenibacillus chinjuensis</i> , <i>Paenibacillus cookii</i>
<i>Brevundimonas spp.</i>	<i>Brevundimonas intermedia</i> , <i>Brevundimonas nasdae</i>
<i>Rhizobium spp.</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i>
<i>Chitinophaga spp.</i>	<i>Chitinophaga terrae</i>
<i>Brevibacillus spp.</i>	<i>Brevibacillus centrosporus</i> , <i>Brevibacillus parabrevis</i>
<i>Virgibacillus spp.</i>	<i>Virgibacillus proomii</i> , <i>Virgibacillus pantothenicus</i>
<i>Rummeliibacillus spp.</i>	<i>Rummeliibacillus pycnus</i>
<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Oceanobacillus spp.</i>	<i>Oceanobacillus caeni</i>
<i>Sphingomonas spp.</i>	<i>Sphingomonas mucosissima</i>
<i>Micrococcus spp.</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Leucobacter spp.</i>	<i>Leucobacter iarius</i>

- En algunas realizaciones, la composición microbiana incluye una cantidad creciente de microbios concretos en comparación con A1006. Por ejemplo, el cultivo de A1006 con fertilizante líquido (por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 5) produce un aumento en la cantidad de uno o más de *Bacillus spp.* (por ejemplo, uno o más de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pocheonensis*, o *Bacillus clausii*), *Microbacterium spp.* (por ejemplo, *Microbacterium testaceum*), *Lysinibacillus spp.* (por ejemplo, *Lysinibacillus sphaericus*), *Sporosarcina spp.*, *Nesterenkonia spp.*, *Agrococcus spp.* (por ejemplo, *Agrococcus terreus*), *Acremonium spp.* (por ejemplo, *Acremonium bacillisporum*), *Sphingomonas spp.*, *Micrococcus spp.*, *Paenibacillus spp.*, *Leucobacter spp.*, *Brevundimonas spp.*, *Rhizobium spp.*, *Chitinophaga spp.*, *Brevibacillus spp.*, *Virgibacillus spp.*, *Rummeliibacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, o *Oceanobacillus spp.* en la composición microbiana. En algunos ejemplos, la composición microbiana incluye al menos aproximadamente 10% más de uno o más de *Bacillus spp.* (por ejemplo, uno o más de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pocheonensis*, o *Bacillus clausii*), *Microbacterium spp.* (por ejemplo, *Microbacterium testaceum*), *Lysinibacillus spp.* (por ejemplo, *Lysinibacillus sphaericus*), *Sporosarcina spp.*, *Nesterenkonia spp.*, *Agrococcus spp.* (por ejemplo, *Agrococcus terreus*), *Acremonium spp.*, *Sphingomonas spp.*, *Micrococcus spp.*, *Paenibacillus spp.*, *Leucobacter spp.*, *Brevundimonas spp.*, *Rhizobium spp.*, *Chitinophaga spp.*, *Brevibacillus spp.*, *Virgibacillus spp.*, *Rummeliibacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, o *Oceanobacillus spp.* en comparación con A1006.

- Los consorcios o composiciones pueden incluir opcionalmente uno o más microbios adicionales. Los microbios adicionales incluyen, aunque no de forma limitativa uno o más de *Deinococcus spp.*, *Azospirillum spp.*, *Aquabacterium spp.*, *Acetobacter spp.* (por ejemplo, *Acetobacter acetii*), *Acidisoma spp.*, *Azotobacter spp.* (por ejemplo, *Azotobacter vinelandii*), *Treponema spp.* (por ejemplo, *Treponema primitia*), *Bradyrhizobium spp.*, *Lactococcus spp.*, *Leptolyngbya spp.*, *Paenibacillus spp.* (por ejemplo, *Paenibacillus amylocticus*), *Pediococcus* (por ejemplo, *Pediococcus pentosceus*),

Proteus spp. (por ejemplo, *Proteus vulgaris*), *Rhizobium* (por ejemplo, *Rhizobium japonicus*), *Rhodoferrax* spp., *Streptomyces* spp., *Streptococcus* spp., *Trichoderma* spp. (por ejemplo, *Trichoderma harzianum*), *Microcoleus* spp., *Micrococcus* spp. (por ejemplo, *Micrococcus luteus*), *Nitrobacter* spp., *Nitrosomonas* spp., *Nitrospira* spp., *Actinomyces* spp., *Devosia* spp., *Acetobacter* spp., *Brevibacterium* spp., *Methanosaeta* spp., *Saccharomyces* spp. (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), *Penicillium* spp. (por ejemplo, *Penicillium roqueforti*), *Monascus* (por ejemplo, *Monascus ruber*), *Aspergillus* spp. (por ejemplo, *Aspergillus oryzae*), *Arthrospira* spp. (por ejemplo, *Arthrospira platensis*), y *Ascophyllum* spp. (por ejemplo, *Ascophyllum nodosum*). Un experto en la materia puede identificar microbios adicionales adecuados, por ejemplo, basándose en las características deseadas que se van a incluir en los consorcios o las composiciones.

Los consorcios o composiciones microbianas descritos pueden incluir uno o más componentes adicionales además de los microbios, incluyendo, aunque no de forma limitativa sales, iones metálicos, y/o tampones (por ejemplo, uno o más de KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 , FeCl_3 , NaMoO_4 , y/o Na_2MoO_4), elementos traza (tales como azufre, sulfato, sulfito, cobre, o selenio), vitaminas (tales como vitaminas B o vitamina K), azúcares (tales como sacarosa, glucosa, o fructosa), quitina, quitosano, glucosamina, proteínas, y/o aminoácidos. Los componentes adicionales que se pueden incluir también en las composiciones incluyen HYTb, HYTc, y/o HYTd, uno o más fertilizantes (por ejemplo, fertilizante líquido), uno o más pesticidas, uno o más fungicidas, uno o más herbicidas, uno o más insecticidas, una o más hormonas vegetales, uno o más estimulantes vegetales, o combinaciones de dos o más de estos componentes.

En algunas realizaciones, los consorcios microbianos están en un medio líquido (tal como un cultivo o medio de fermentación) o inóculo. En otras realizaciones, los consorcios microbianos están presentes en un medio sólido o gelatinoso (tal como una placa de cultivo) que contiene o soporta los microbios.

En otras realizaciones más, los consorcios microbianos están presentes en formulaciones secas, tales como un polvo seco, aglomerado, o gránulo. Se pueden preparar formulaciones secas añadiendo un osmoprotector (tal como un azúcar, por ejemplo, trehalosa y/o maltodextrina) a una composición microbiana en solución en una relación deseada. Esta solución se combina con un transportador seco o agente de absorción, tal como serrín o arcilla, a la concentración deseada de la composición microbiana (tal como 2-30 %, por ejemplo, 2,5-10 %, 5-15 %, 7,5-20 %, o 15-30 %). Los gránulos pueden crearse incorporando arcilla o aglutinantes poliméricos que sirven para mantener los gránulos juntos u ofrecer propiedades físicas o de degradación específicas. Los gránulos pueden formarse usando granulación rotatoria, granulación mediante mezclador, o extrusión, como unos pocos métodos posibles. Una persona normalmente experta en la materia conoce los métodos adicionales para preparar formulaciones secas incluyendo una o más especies microbianas, por ejemplo, como se describe en *Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments*, Burges, ed., Springer Science, 1998; Bashan, *Biotechnol. Adv.* 16:729-770, 1998; Ratul et al., *Int. Res. J. Pharm.* 4:90-95, 2013.

En algunos ejemplos, las composiciones que incluyen los microbios o consorcios microbianos pueden mantenerse a una temperatura que soporta el crecimiento de los microbios, por ejemplo, a aproximadamente 25-45 °C (tal como aproximadamente 30-35 °C, aproximadamente 30-40 °C, o aproximadamente 35-40 °C). En otros ejemplos, las composiciones se almacenan a temperaturas a las cuales los microbios no crecen o están inactivos, tal como menos de 25 °C (por ejemplo, 4 °C, -20 °C, -40 °C, -70 °C, o inferior). Un experto en la materia puede formular las composiciones para el almacenamiento en frío, incluyendo, por ejemplo, estabilizantes (tales como glicerol). En otros ejemplos adicionales, las composiciones se almacenan a temperaturas ambiente, tales como aproximadamente 0-35 °C (por ejemplo, aproximadamente 10-30 °C o aproximadamente 15-25 °C).

III. Procesos de biodegradación

Los consorcios o composiciones microbianas divulgados se pueden usar para degradar materiales biológicos, tales como materiales ricos en quitina, por ejemplo, animales acuáticos o subproductos de animales acuáticos, insectos, u hongos. Así, en algunas realizaciones, se divulgan en el presente documento métodos que incluyen mezclar uno o más de los consorcios o composiciones microbianas divulgados con un material biológico que contiene quitina para formar una mezcla y fermentar la mezcla. En algunas realizaciones, los métodos incluyen también separar la mezcla en un sólido, acuoso, y opcionalmente, fracciones lipídicas (Fig. 2).

En algunas realizaciones, un proceso de biodegradación divulgado en el presente documento incluye mezclar un consorcio microbiano (tal como A1006), una composición que incluye todos los microbios en A1006) con uno o más materiales biológicos que contienen quitina. Los materiales biológicos que contienen quitina incluyen, aunque no de forma limitativa, animales acuáticos o subproductos de animales acuáticos, insectos, u hongos. En algunos ejemplos, el material biológico que contiene quitina es un animal acuático, tal como un artrópodo acuático (por ejemplo, un miembro de la clase Malacostrácea). Los artrópodos acuáticos para su uso en los métodos divulgados incluyen gambas, cangrejos, langostas, cangrejos de río, o krill. En algunos ejemplos, el animal acuático completo (tal como un artrópodo acuático) o los subproductos de animales acuáticos se usan en los métodos de biodegradación divulgados en el presente documento. Los subproductos de animales acuáticos incluyen cualquier parte de un animal acuático, tal como cualquier parte producida mediante el procesamiento del animal acuático. En algunos ejemplos, Un subproducto de un animal acuático es todo o una parte de un exoesqueleto de un animal acuático, tal como gambas, cangrejos, cangrejos de río, o el caparazón de una langosta. En otros ejemplos, Un subproducto de un animal acuático

incluye una parte de un animal acuático, por ejemplo, los cefalotórax de las gambas.

En otros ejemplos, el material biológico que contiene quitina incluye hongos, tales como hongos del filum Zygomyceta, Basidiomycota, Ascomyceta, o Deuteromyceta. Los hongos particularmente ilustrativos incluyen *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Trichoderma spp.*, *Saccharomyces spp.*, y *Schizosaccharomyces spp.* Así, las corrientes residuales de panaderías, cervecerías y destiladoras pueden proporcionar fuentes de materiales biológicos que contienen quitina. En otros ejemplos adicionales, el material biológico que contiene quitina incluye insectos que contienen quitina en sus exoesqueletos, tales como saltamontes, grillos, escarabajos, y otros insectos. los subproductos del procesamiento de dichos insectos se contemplan también por ser fuentes de quitina.

El material biológico que contiene quitina se mezcla con una composición que incluye los microbios descritos en la Sección II anterior (tal como el consorcio microbiano A1006 o el otro consorcio o composición descrito en la Sección II) para formar una mezcla sustancialmente homogénea. En algunos ejemplos, el material biológico que contiene quitina se tritura, aplasta, pica, muele, o se dispersa de otra forma antes de mezclar con los microbios o consorcios microbianos descritos en el presente documento. En ejemplos particulares, la mezcla contiene aproximadamente 10-50 % (tal como aproximadamente un 10-20 %, aproximadamente un 20-30 %, aproximadamente un 30-40 %, aproximadamente un 25-40 %, por ejemplo, aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 35 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 45 %, o aproximadamente un 50 %) de material que contiene quitina (tal como cabezas de gambas) (p/v) en un inóculo que contiene aproximadamente 0,1-5 % (tal como aproximadamente un 0,1-1 %, aproximadamente un 0,5-2 %, aproximadamente un 1-2 %, aproximadamente un 2-3 %, aproximadamente un 0,1 %, aproximadamente un 0,2 %, aproximadamente un 0,3 %, aproximadamente un 0,5 %, aproximadamente un 0,8 %, aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 1,25 %, aproximadamente un 1,5 %, aproximadamente un 1,75 %, aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 2,5 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 4 %, o aproximadamente un 5 %) de microbios (v/v).

En algunos ejemplos, el inóculo, el material biológico que contiene quitina, y un azúcar (u otra fuente de carbono) se mezclan juntos, por ejemplo, agitando o mediante agitación. En otros ejemplos, uno o más de los microbios en la composición o consorcio microbiano se activa opcionalmente antes de mezclar con el material biológico que contiene quitina y la fermentación. No se requiere activación para los métodos divulgados en el presente documento. Una persona experta en la materia puede realizar ajustes en el tiempo y/o en la temperatura de la fermentación, dependiendo de si los microbios se activan antes de la fermentación. La activación de la composición microbiana puede ser incubando un inóculo de los microbios con una fuente de carbono (tal como un azúcar, por ejemplo, glucosa, sacarosa, fructosa, u otro azúcar) a una temperatura y durante un periodo de tiempo suficiente para que los microbios crezcan. En algunos ejemplos, un inóculo de los microbios (tal como un consorcio o composición microbiano descrito en el presente documento) tiene una concentración de aproximadamente 0,05-5 % v/v (por ejemplo, aproximadamente 0,5-5 %, aproximadamente un 0,5-2 %, aproximadamente 1-2 %, o aproximadamente 2-3 %) en un medio líquido. El inóculo se diluye en una solución que contiene aproximadamente 0,1-1 % de azúcar (por ejemplo, aproximadamente 0,1-0,5 %, aproximadamente un 0,1-0,3 %, aproximadamente un 0,2-0,6 %, o aproximadamente un 0,5-1 %, tal como aproximadamente un 0,1 %, aproximadamente un 0,2 %, aproximadamente un 0,3 %, aproximadamente un 0,4 %, aproximadamente un 0,5 %, aproximadamente un 0,6 %, aproximadamente un 0,7 %, aproximadamente un 0,8 %, aproximadamente un 0,9 %, o aproximadamente un 1 %) y se incubaron a temperaturas ambiente, por ejemplo, a aproximadamente 20-40 °C (tal como aproximadamente 20 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 35 °C, o aproximadamente 40 °C) durante aproximadamente 1-5 días (tal como aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 96 horas, o aproximadamente 120 horas). En otros ejemplos, la activación de la composición microbiana puede activarse incubando un inóculo de los microbios a una temperatura y durante un periodo de tiempo suficiente para que los microbios crezcan, por ejemplo, incubación a aproximadamente 20-40 °C (tal como aproximadamente 25-35 °C) durante 12 horas a 5 días (tal como 1-4 días o 2-3 días). En algunos ejemplos no limitantes, se considera que los microbios están activados cuando el cultivo alcanza una densidad óptica de >0,005 a 600 nm.

Tras la mezcla del material biológico que contiene quitina y los microbios o el consorcio microbiano (que están opcionalmente activados), la mezcla se fermenta. En algunos ejemplos, el pH de la mezcla se mide antes de la fermentación. El pH se ajusta a un intervalo seleccionado (por ejemplo, pH aproximadamente 3 a aproximadamente 4 o aproximadamente 3,5 a 4), si es necesario, antes de la fermentación. La mezcla se incuba a una temperatura de aproximadamente 20-40 °C (por ejemplo, aproximadamente 30°-36 °C, tal como aproximadamente 30 °C, aproximadamente 31 °C, aproximadamente 32 °C, aproximadamente 33 °C, aproximadamente 34 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 36 °C, aproximadamente 37 °C, aproximadamente 38 °C, aproximadamente 39 °C, o aproximadamente 40 °C) durante aproximadamente 1-30 días (tal como aproximadamente 3-28 días, aproximadamente 7-21 días, aproximadamente 3, 5, 7, 10, 14, 16, 20, 24, 28, o 30 días). La mezcla se agita periódicamente (por ejemplo, agitación no continua). En algunos ejemplos, la mezcla se agita durante un periodo de tiempo cada 1-7 días, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 días. En algunos ejemplos no limitantes, la fermentación continúa hasta que la acidez valorable (TTA) es aproximadamente el 3-5 % y el pH es aproximadamente 4-5.

Tras la fermentación, la mezcla fermentada resultante se separa en al menos fracciones sólidas y fracciones líquidas. En algunos ejemplos, la fermentación se pasa desde el tanque al equipo de sedimentación. El líquido se decanta posteriormente y se centrifuga. En un ejemplo no limitante, la mezcla fermentada se centrifuga a 1250 rpm (930xg)

durante 15 minutos a aproximadamente 5 °C para obtener fracciones líquidas y lipídicas (por ejemplo, pigmentos). La fracción líquida (o acuosa) obtenida del proceso de biodegradación puede almacenarse a temperatura ambiente. En algunos ejemplos no limitantes, se añade un azúcar a la fracción líquida, por ejemplo, a 1-10 % en v/v.

- 5 La fracción líquida puede incluir componentes tales como proteínas, aminoácidos, glucosamina, elementos traza (tales como calcio, magnesio, cinc, cobre, hierro, y/o manganeso), y/o enzimas (tales como enzimas lácticas, proteasas, lipasas, y/o quitinasas). En algunos ejemplos no limitantes, la fracción líquida contiene (p/v) aproximadamente un 1-5 % de los aminoácidos totales, aproximadamente 3-7 % de proteínas, aproximadamente 0,1-2 % de nitrógeno, menos de aproximadamente 0,2 % de fósforo, aproximadamente 0,5-1 % de potasio, aproximadamente 4-8 % de carbono, aproximadamente 0,2-1 % de calcio, menos de aproximadamente 0,2 % de magnesio, menos de aproximadamente 0,2 % de sodio, y/o aproximadamente 0,1-0,4 % de azufre. En ejemplos no limitantes adicionales, la fracción líquida incluye aproximadamente 0,01-0,2 % de glucosamina (por ejemplo, aproximadamente 0,1 % o menos). La fracción líquida puede contener también uno o más microbios (por ejemplo, del inóculo utilizado para iniciar el proceso de fermentación) y/o cantidades traza de quitosana o quitina. La fracción líquida se denomina en algunos ejemplos en el presente documento "HYTb".

- La fracción sólida obtenida del proceso de biodegradación contiene quitina (por ejemplo, aproximadamente 50-70 % o aproximadamente 50-60 % de quitina). La fracción sólida puede contener también uno o más de elementos traza (tales como calcio, magnesio, cinc, cobre, hierro, y/o manganeso), proteínas o aminoácidos, y/o uno o más microbios procedentes del inóculo utilizado para iniciar el proceso de fermentación. La fracción sólida se denomina en algunos ejemplos en el presente documento "HYTc". HYTc está opcionalmente micronizada para formar quitina micronizada y quitina residual. En algunos ejemplos no limitantes, la fracción sólida contiene (p/v) aproximadamente 9-35 % de aminoácidos totales, aproximadamente 30-50 % de proteína en bruto, aproximadamente 5-10 % de nitrógeno, aproximadamente 0,3-1 % de fósforo, menos de aproximadamente 0,3 % de potasio, aproximadamente 35-55 % de carbono, aproximadamente 0,5-2 % de calcio, menos de aproximadamente 0,1 % de magnesio, aproximadamente 0,1-0,4 % de sodio, y/o aproximadamente 0,2-0,5 % de azufre.

- En algunos ejemplos, se separa también una fracción lipídica de las fracciones sólidas y líquidas. La fracción lipídica es la fase superior de la fracción líquida. La fracción lipídica contiene compuestos tales como esteroides, vitamina A y/o vitamina E, ácidos grasos (tales como DHA y/o EHA), y en algunos ejemplos, pigmentos carotenoides (por ejemplo, astaxantina). La fracción lipídica se puede usar para varios fines, incluyendo, aunque no de forma limitativa la producción de productos cosméticos o nutritivos.

- En realizaciones adicionales, la quitina es fermentada con un consorcio microbiano (tal como A1006 o todos los microbios en A1006). En algunos ejemplos la quitina (tal como HYTc, o la quitina micronizada y/o residual producida como se ha descrito anteriormente) se mezcla con un consorcio o composición microbiano que contiene los microbios descritos en el presente documento y el hidrolizado de proteínas (por ejemplo, HYTb), y se fermenta para formar una mezcla fermentada. Al menos una parte de la quitina en la mezcla de partida se digiere como resultado de la fermentación. En algunos ejemplos, la mezcla se incuba a una temperatura de aproximadamente 20-40 °C (por ejemplo, aproximadamente 30°-35 °C, tal como aproximadamente 30 °C, aproximadamente 31 °C, aproximadamente 32 °C, aproximadamente 33 °C, aproximadamente 34 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 36 °C, aproximadamente 37 °C, aproximadamente 38 °C, aproximadamente 39 °C, o aproximadamente 40 °C) durante aproximadamente 1 día a 30 días (tal como aproximadamente 2-28 días, aproximadamente 4-24 días, aproximadamente 16-30 días, aproximadamente 10-20 días, o aproximadamente 12-24 días. En algunos ejemplos, la mezcla se agita periódicamente (por ejemplo, agitación no continua). En otros ejemplos, la mezcla se agita continuamente. En un ejemplo no limitante, la mezcla se agita durante aproximadamente 1-12 horas diariamente (tal como aproximadamente 2-8 horas o aproximadamente 4-10 horas). El pH de la mezcla de fermentación puede controlarse periódicamente. En algunos ejemplos, el pH se mantiene opcionalmente a aproximadamente 4-5. En algunos ejemplos, la fermentación continúa hasta que la acidez valorable total (TTA) es al menos de aproximadamente 1-10 % (tal como aproximadamente 2-8 %, aproximadamente 4-8 %, o aproximadamente 5-10 %).

- Tras la fermentación, la mezcla fermentada resultante se separa en al menos fracciones sólidas y fracciones líquidas, por ejemplo, mediante decantación, filtración, y/o centrifugación. La fracción líquida resultante de la fermentación de HYTb y la quitina con la composición microbiana se denomina, en algunos ejemplos en el presente documento "HYTd." En algunos ejemplos no limitantes, la fracción líquida contiene (p/v) aproximadamente un 0,5-2 % de los aminoácidos totales, aproximadamente 3-7 % de proteínas, aproximadamente 0,5-1 % de nitrógeno, menos de aproximadamente 0,1 % de fósforo, aproximadamente 0,4-1 % de potasio, aproximadamente 3-7 % de carbono, menos de aproximadamente 0,5 % de calcio, menos de aproximadamente 0,1 % de magnesio, menos de aproximadamente 0,3 % de sodio, y/o aproximadamente menos de aproximadamente 0,3 % de azufre. Además, HYTd contiene menos de aproximadamente 50 % de quitina (tal como menos de aproximadamente 45 %, menos de aproximadamente 40 %, menos de aproximadamente 35 %, o menos de aproximadamente 30 % de quitina) y menos de 2 % de glucosamina (tal como menos de aproximadamente 1,5 % o menos de aproximadamente 1 % de glucosamina). En otros ejemplos, HYTd contiene aproximadamente 25-50 % de quitina y aproximadamente 0,5-2 % de glucosamina.

IV. Procesos para tratar el suelo, las plantas, y/o las semillas

Los consorcios microbianos divulgados, las composiciones que contienen microbios, y/o los productos divulgados en el presente documento (tales como HYTb, HYTc, y/o HYTd) se pueden usar para tratar el suelo, las plantas, o partes de las plantas (tales como raíces, vástagos, follaje, semillas, o plántulas). En algunos ejemplos, el tratamiento con los consorcios microbianos, las composiciones que contienen los microbios, y/o los productos que mejoran el crecimiento de las plantas, mejoran la tolerancia al estrés y/o el aumento en el rendimiento del cultivo.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen poner en contacto el suelo, las plantas (tales como el follaje de las plantas, vástagos, raíces, plántulas, u otras partes de las plantas), o las semillas con un consorcio (tal como A1006) o una composición que incluye los microbios presentes en uno o más de los consorcios o composiciones microbianos divulgados. Los métodos pueden incluir también hacer crecer las plantas tratadas, las partes de las plantas, o las semillas y/o cultivar las plantas, las partes de las plantas, o las semillas en el suelo tratado.

Los microbios se activan opcionalmente antes de la aplicación. En algunos ejemplos, la activación de los microbios es como se describe en la Sección III, anterior. En otros ejemplos, los microbios se activan mezclando 100 partes de agua y 1 parte del consorcio o composición microbiano e incubando a aproximadamente 15-40 °C (tal como aproximadamente 20-40 °C, aproximadamente 15-30 °C, o aproximadamente 25-35 °C) durante aproximadamente 12 horas-14 días (tal como aproximadamente 1-14 días, 3-10 días, 3-5 días, o 5-7 días). La mezcla de activación puede incluir también opcionalmente 1 parte de HYTb, si el consorcio o composición microbiano es para aplicarse en combinación con HYTb.

En otras realizaciones, los métodos incluyen poner en contacto el suelo, las plantas (o partes de las plantas), o las semillas con un producto de un consorcio microbiano o las composiciones divulgadas, tal como HYTb, HYTc, HYTd, o combinaciones de los mismos. En otras realizaciones adicionales, los métodos incluyen poner en contacto el suelo, las plantas, o las semillas con un consorcio o composición microbiano divulgado incluyendo los microbios divulgados y uno o más de HYTb, HYTc, y HYTd (tal como uno, dos, o todos de HYTb, HYTc, y HYTd). HYTb, HYTc, y/o HYTd pueden aplicarse por separado al suelo, plantas, (o partes de plantas), y/o las semillas, por ejemplo, de forma secuencial, simultánea, o sustancialmente simultánea con los consorcios o composiciones microbianos divulgados que contienen los microbios.

En algunos ejemplos, los métodos incluyen además poner en contacto el suelo, las plantas (o partes de las plantas), o las semillas con uno o más componentes adicionales que incluyen, aunque no de forma limitativa quitina, quitosano, glucosamina, proteína, aminoácidos, fertilizante líquido, uno o más pesticidas, uno o más fungicidas, uno o más herbicidas, uno o más insecticidas, una o más hormonas vegetales, uno o más estimulantes vegetales, o combinaciones de dos o más de los mismos. Los componentes adicionales pueden estar incluidos en la composición, incluyendo los microbios, o en los consorcios microbianos divulgados en el presente documento, o pueden aplicarse por separado al suelo, plantas, (o partes de plantas), y/o las semillas, por ejemplo, de forma secuencial, simultánea, o sustancialmente simultánea con los consorcios o composiciones microbianos divulgados que contienen los microbios.

En realizaciones particulares, un consorcio o composición microbiano se combina con un fertilizante líquido (por ejemplo, una solución o suspensión acuosa que contiene nitrógeno soluble). En algunos ejemplos, el fertilizante líquido incluye una fuente orgánica de nitrógeno tal como urea, o una sal inorgánica que contiene nitrógeno tal como hidróxido de amonio, nitrato de amonio, sulfato de amonio, pirofosfato de amonio, tiosulfato de amonio o combinaciones de los mismos. Se puede usar también una solución acuosa de amoniaco (20-24,6 % de amoniaco anhidro) como el nitrógeno soluble. En algunos ejemplos, el consorcio o composición microbiano se combina con el fertilizante líquido (por ejemplo, mezclado con el fertilizante líquido) inmediatamente antes de su uso o un tiempo corto antes de su uso (tal como de 10 minutos a 24 horas antes de su uso, por ejemplo, aproximadamente 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, o 24 horas antes de su uso). En otros ejemplos, el consorcio o composición microbiano se combina con el fertilizante líquido (mezclado por ejemplo con el fertilizante líquido) al menos 24 horas antes de su uso (tal como 24 horas a 6 meses, por ejemplo, al menos 36 horas, al menos 48 horas, al menos 72 horas, al menos 96 horas, al menos una semana, al menos dos semanas, al menos cuatro semanas, al menos ocho semanas, o al menos 12 semanas antes de su uso).

En algunos ejemplos, se calcula la cantidad de las composiciones que se van a aplicar (por ejemplo, por acre (0,4 ha) o hectárea) y la composición se diluye en agua (o en algunos ejemplos, fertilizante líquido) en una cantidad suficiente para pulverizar o irrigar el área que se va a tratar (si la composición es un líquido, tal como consorcios o composiciones microbianos, HYTb, o HYTd). En otros ejemplos, la composición se puede mezclar con herbicidas, insecticidas, pesticidas diluidos, o productos químicos que regulan el crecimiento de las plantas. Si la composición que se va a aplicar es un sólido (tal como una formulación seca de microbios, HYTc, quitina, glucosamina, quitosana o aminoácidos), el sólido puede aplicarse directamente al suelo, plantas, o partes de las plantas, o se puede suspender o disolver en agua (u otro líquido) antes de su uso. En algunos ejemplos, HYTc se seca y microniza antes de su uso.

Las composiciones microbianas divulgadas (solas o en combinación con otros componentes divulgados en el presente documento, tal como HYTb, HYTc, y/o HYTd) pueden administrarse en varias maneras en etapas del desarrollo de la planta diferentes, dependiendo de la situación del cultivo y de las prácticas agrícolas. En algunos ejemplos, la

- composición microbiana divulgada y HYTb se mezclan y se diluyen con fertilizante líquido y se aplican en el momento de realizar la plantación a una tasa de 0,5 a 1 a cada 2 litros cada uno por acre (0,4 ha), o, de forma alternativa, se aplican individualmente. En otros ejemplos, la composición microbiana divulgada y HYTb se mezclan y diluyen y se aplican al realizar la plantación, y se aplican también al suelo cerca de las raíces en múltiples momentos durante el
- 5 crecimiento de la planta, a una tasa de 0,5 a 1 a 2 litros cada uno por acre (0,4 ha), o, de forma alternativa, se aplican individualmente. En otros ejemplos adicionales, la composición microbiana divulgada y HYTb se diluyen y administran juntas a través de riego por goteo a una concentración baja como plántulas o trasplantes que se están estableciendo, administrándose en riego por inundación, o dispensándose como una mezcla diluida con nutrientes en riego aéreo o por goteo en invernaderos para plántulas o plantas establecidas, o de forma alternativa, se aplican individualmente.
- 10 En ejemplos adicionales, la composición microbiana divulgada se añade a otros tratamientos del suelo en el campo, tales como la adición a tratamientos insecticidas, para permitir la facilidad de uso. En otros ejemplos, tales como en invernaderos, la composición microbiana divulgada y HYTb se usan individualmente o juntas, combinadas con fertilizante líquido (tal como fertilizante de pescado) y otros nutrientes y se inyecta en los sistemas de riego por aspersión de agua o en líneas de riego por goteo durante el curso del crecimiento de la planta. En un ejemplo de un
- 15 invernadero, la composición microbiana divulgada y HYTb se usan juntas, por ejemplo, diluidas u aplicadas durante el riego por aspersión o fertirrigación a una tasa de 0,25 a un litro en la germinación de la plántula, seguido por 0,25 a 1 litro del ciclo de crecimiento medio con fertirrigación, y 0,25 a 1 litro de fertirrigación 5-10 días al final del ciclo de crecimiento.
- 20 En algunas realizaciones, la composición o consorcio microbiano divulgado y HYTb se aplican juntos o individualmente (por ejemplo, secuencialmente) para promover el rendimiento, vigor, la tipificación, la calidad, el desarrollo de la raíz, ya la tolerancia al estrés en cultivos. En un ejemplo específico donde el cultivo es maíz, se añaden 1 a 2 l/acre (2,5 a 5 l/ha) de la composición microbiana en surcos con fertilizante líquido al realizar la plantación, o se aplican como un recubrimiento alrededor de la planta durante la fertilización tras la etapa V3, seguido por 0,5 a 2 l/acre (1,25 a 5 l/ha) de HYTb como una pulverización foliar tras la etapa V5, añadida y diluida con herbicidas, pesticidas foliares, micronutrientes, o fertilizantes.
- 25 En otro ejemplo específico donde el cultivo es patata, 1 a 3 l/acre (2,5 a 7,57 l/ha) de composición microbiana se diluyen tanto solos como con 1 a 3 l/acre (2,5 a 7,57 l/ha) de HYTb en la plantación del tubérculo; esto puede ser seguido por posteriores aplicaciones al suelo de la composición microbiana y HYTb antes de la tuberización, tanto
- 30 solas (por ejemplo, secuencialmente) como juntas. Tras la emergencia de la planta, Se pueden aplicar aplicaciones foliares a la patata de HYTb a 1 a 2 l/acre (2,5 a 5 l/ha), tanto diluidas solas como mezcladas con herbicida, pesticida foliar, micronutrientes o tratamientos fertilizantes, y aplicarse durante la estación del crecimiento una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, o más.
- 35 En otro ejemplo específico más, donde el cultivo es algodón, se aplican 1 a 2 l/acre (2,5 a 5 l/ha) de la composición microbiana en surcos en la plantación, como un recubrimiento alrededor de la planta, o 2x2 (2 pulgadas (5,08 cm) de lado y 2 pulgadas (5,08 cm) por debajo de la semilla), con o sin fertilizante. Al principio de la floración del algodón blanco, se pueden aplicar tratamientos foliares de 0,5 a 2 l/acre (1,25 a 5 l/ha) de HYTb, diluirse solos o combinarse
- 40 con otros nutrientes, herbicidas, o tratamientos pesticidas.
- En otro ejemplo concreto donde el cultivo es trigo, la composición microbiana 1 a 2 l/acre (2,5 a 5 l/ha) se aplica tras la latencia del invierno (etapa S4) y HYTb se aplica foliarmente 0,5 a 2 l/acre (1,25 a 5 l/ha); etapa S4 a S10).
- 45 En un ejemplo donde el cultivo es caña de azúcar, un método de aplicación utiliza una composición microbiana divulgada y HYTb a 2 a 4 l/acre (5 a 10 l/ha) cada una, aplicadas al suelo durante la plantación de la caña o como recubrimiento alrededor de la planta, aplicándose HYTb foliar a 1 a 2 l/acre (2,5 a 5 l/ha), mezclando con agua o fertilizantes o micronutrientes.
- 50 Se puede usar HYTb solo o como tratamiento foliar en todos los cultivos para mejorar los rasgos tales como la tolerancia al estrés de la planta, el vigor vegetativo, la calidad y el rendimiento de la cosecha. En un ejemplo donde el cultivo es maíz, HYTb puede aplicarse a 1/2 a 1 l/acre (1,25 a 2,5 l/ha), una o múltiples veces, mezclando con agua o pesticidas o herbicidas. En otro ejemplo, HYTb se puede usar para tratar el trigo como una pulverización foliar, mezclado con agua o pesticidas o herbicidas, a una tasa de © a 1 L/acre (a 2,5 l/ha), aplicando una o múltiples veces.
- 55 En todos los cultivos, se puede añadir HYTc al suelo a una tasa de aproximadamente 0,5-2 kg/acre (1,25 a 5 kg/ha) (tal como aproximadamente 0,5 kg/acre (1,25 kg/ha), aproximadamente 1 kg/acre (2,5 kg/ha), aproximadamente 1,5 kg/acre (3,75 kg/ha), o aproximadamente 2 kg/acre (5 kg/ha) en el momento del establecimiento del cultivo o la plantación. En otros ejemplos, HYTc se añade a una solución de riego por goteo de una composición microbiana divulgada y HYTb o se añade a aplicaciones de fertilización que contienen una composición microbiana divulgada y
- 60 HYTb en invernaderos, tal como los ejemplos anteriores.
- En realizaciones adicionales, HYTd (sola o en combinación con los microbios u otros componentes divulgados en el presente documento) se usa a aproximadamente 1-20 l/ hectárea (tal como aproximadamente 1-15 l/hectárea, aproximadamente 3-10 l/hectárea, o aproximadamente 3-5 l/hectárea). En otros ejemplos, HYTd (sola o en combinación con los microbios u otros componentes divulgados en el presente documento) se usa como un tratamiento
- 65

de semillado para potenciar el rendimiento y el comportamiento del cultivo (por ejemplo, aproximadamente 1-10 l/kg de semillas, tal como aproximadamente 1-3 l/kg, aproximadamente 3-5 l/kg, o aproximadamente 5-10 l/kg). Como alternativa, se puede usar HYTd en el suelo (sola o en combinación con los microbios u otros componentes divulgados en el presente documento) a aproximadamente 1-3 l/hectárea para aumentar el crecimiento de la planta, por ejemplo, para ayudar a las plantas a permanecer productivas en condiciones de estrés.

En algunos ejemplos, el tratamiento del suelo, semillas, las plantas, o partes de las plantas con una composición que comprende los microbios en un consorcio microbiano divulgado aumenta el crecimiento de la planta (tal como el tamaño global de la planta, la cantidad de follaje, el número de raíces, el diámetro de la raíz, la longitud de la raíz, la producción de vástagos, la producción de frutos, la producción de polen, o la producción de semillas) en al menos aproximadamente un 5 % (por ejemplo, al menos aproximadamente un 10 %, al menos alrededor del 30 %, al menos alrededor del 50 %, al menos alrededor del 75 %, al menos alrededor del 100 %, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, o más). En otros ejemplos, los métodos divulgados dan como resultado una producción aumentada del cultivo de aproximadamente un 10-75 % (tal como aproximadamente 20-60 % o aproximadamente 30-50 %) en comparación con cultivos no tratados. Otras medidas del comportamiento del cultivo incluyen la calidad del fruto, rendimiento, el almidón o el contenido de sólidos, el contenido de azúcar o grados brix, la vida media del fruto o el producto cosechable, la producción del rendimiento o el tamaño objetivo comercializables, la calidad del fruto o el producto, el macollaje y la resistencia al tráfico peatonal en el césped, el conjunto de polinización y fruta, la floración, el número de flores, la vida útil de la flor, la calidad de la floración, el enraizamiento y la masa de las raíces, resistencia del cultivo al encamado, tolerancia al estrés abiótico y al calor, sequía, frío y recuperación tras el estrés, adaptabilidad a los suelos pobres, nivel de fotosíntesis y verdor, y salud de la planta. Para determinar la eficacia de los productos, los controles incluyen las mismas prácticas agronómicas sin adición de microbios, llevadas a cabo en paralelo.

Los métodos divulgados se pueden usar vinculados con cualquier cultivo (por ejemplo, para el tratamiento directo del cultivo o para el tratamiento del suelo antes o después de la plantación). Los cultivos ilustrativos incluyen, aunque no se limitan a alfalfa, almendras, plátano, cebada, brécol, colza, zanahorias, cítricos y cultivos de árboles frutales, maíz, algodón, pepino, flores y plantas ornamentales, ajo, uvas, lúpulo, plantas hortícolas, puerro, melón, palma oleosa, cebolla, cacahuetes y legumbres, piña, álamo, pinos y árboles maderables, patata, frambuesa, arroz, sésamo, sorgo, soja, calabaza, fresa, caña de azúcar, girasol, tomate, césped y hierbas forrajeras, sandía, trigo y eucalipto.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas características y/o realizaciones concretas. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes de la divulgación a las características particulares o realizaciones descritas.

Ejemplo 1

Consorcio microbiano A1006

Este ejemplo describe la producción del consorcio microbiano A1006.

A1006 se produjo a partir de un lote de semilla de microbios que originalmente se derivó de suelos fértiles y microbios adicionales (tal como *Bacillus* spp.) (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 8.748.124). El cultivo "semilla" se mezcló con una suspensión que contenía un 5,5 % en p/p de proteína de suero y 1,2 % en p/p de yogur en agua ("C vat" y una suspensión que contenía 0,1 % en p/p de espirulina y 0,1 % en p/p de extracto de algas en agua ("A vat"). Las suspensiones A vat y C vat se prepararon cada una individualmente 3 días antes de mezclar con el cultivo semilla e incubarse a temperatura ambiente. El cultivo semilla, C vat, y A vat se mezclaron en una proporción de aproximadamente 81:9:9. Tras mezclar, una suspensión de componentes adicionales que contenían aproximadamente 70 % en v/v de melazas, 0,5 % v/v de HYTb, 0,003 % w/v de goma arábica, y 0,02 % de levadura de cerveza (*S. cerevisiae*) se mezclaron con la mezcla del cultivo semilla, C vat, y A vat, y agua adicional en una relación de aproximadamente 16:34:50. La mezcla se fermentó durante aproximadamente 7 días a temperatura ambiente (aproximadamente 19-35 °C). Después de 7 días, se airearon los tanques durante 30 minutos en días alternos. Se añadió más agua (aproximadamente 10 % más en v/v) y se continuó la fermentación en las mismas condiciones durante aproximadamente 10 días más. Se añadió más agua (aproximadamente 4 % más en v/v) y se continuó la fermentación durante aproximadamente 7 días más, momento en el cual, las muestras se recogieron para el análisis y el depósito con la ATCC. A1006 se almacenó posteriormente en bolsas a temperatura ambiente.

Ejemplo 2

Análisis de microbios en A1006 mediante siembra en placas

Este ejemplo describe el análisis de microbios presentes en A1006 mediante transferencia rápida de colonias en condiciones aerobias y anaerobias.

Se recogieron las muestras (50 ml) de una bolsa aireada de A1006 (agitada con una paleta de mezcla de acero inoxidable a 120 rpm durante 8 minutos) utilizando una bomba de tambor de tipo sifón de mano desinfectada. En el

día 1, la muestra se sometió a vortización (por ejemplo, 60 segundos a 2000 rpm) para asegurar incluso la distribución de los microbios. En un tubo con 9,8 ml de agua estéril se añadieron 0,1 ml de muestra A1006 y 0,1 ml de HYTB (dilución 10^{-2}). Se incubó el tubo a 35 °C durante 72 horas sin agitación. Tras 72 horas (día 3) el tubo se sometió a vortización brevemente y se preparó una tanda de diluciones decimales en serie en agua estéril, de 10^{-3} a 10^{-9} .

Cada dilución se sembró en placas (100 µl) sobre una placa de agar nutriente (para el cultivo de microorganismos aerobios) y una placa de agar para métodos convencionales (para el cultivo de organismos anaerobios), con 3 réplicas por cada. Se cultivaron placas de agar nutriente a 27 °C durante 48 horas. Se incubaron las placas de agar para métodos convencionales a 35 °C durante 72 horas en una cámara anaerobia. Después de la incubación, para cada cultivo, se seleccionó una dilución que dio como resultado menos de 100 colonias. Para la dilución seleccionada todas las colonias en cada una de las placas de las réplicas se contaron y se calcularon las unidades formadoras de colonias (UFC)/ml. La siembra en placas de A1006 mostró $9,0 \times 10^7$ UFC/ml en condiciones aerobias y $1,4 \times 10^7$ UFC/ml en condiciones anaerobias.

Ejemplo 3

Análisis de microbios en A1006 mediante la micromatriz

Este ejemplo describe el análisis de la micromatriz de los microbios presentes en A1006.

Se analizó una muestra de A1006 mediante el Second Genome (South San Francisco, CA) usando el ensayo G3 PhyloChip™. Se aisló el ADN de la muestra usando el kit de aislamiento del ADN PowerSoil® (Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se amplificaron los genes usando el ARNr de 16S (35 ciclos de la PCR) utilizando el cebador inverso degenerado 27F.1 (AGRGTTTGATCMTGGCTCAG; SEQ ID NO: 1) y el cebador inverso no degenerado 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT; SEQ ID NO: 2). Los productos de la amplificación se concentraron usando un método de inmovilización reversible en fase sólida y se cuantificaron mediante electroforesis utilizando un Agilent 2100 Bioanalyzer®. Se añadió PhyloChip Control Mix™ a cada producto amplificado. Se fragmentaron los amplicones, se marcó la biotina, y se hibridó la matriz G3 con el PhyloChip™, que incluye >1,1 millones de sondas que se dirigen a aproximadamente a aproximadamente 55.000 taxones microbianos de individuos, con múltiples sondas por unidad taxonómica operativa (OTU). Se lavaron las matrices, se tiñeron y se analizaron usando el escáner GeneArray®(GeneChip® Microarray Analysis Suite, Affymetrix).

Se probaron aproximadamente 330.000 millones de moléculas y se analizaron usando el software de procesamiento Second Genome's PhyloChip. Una serie de conjuntos de sondas perfectamente emparejadas (PM) y emparejadas de manera- emitieron una intensidad de fluorescencia (FI) que se capturaron como píxeles en una imagen y se recogieron como un valor entero. A continuación el software hizo ajustes para la estimación de la fluorescencia de fondo y el ruido y normalizó el intervalo de resultados. A continuación, los resultados se usaron como entrada al descubrimiento empírico del conjunto de sondas. La OTU empírica rastreada por un conjunto de sondas se anotó taxonómicamente después frente a la edición de mayo de 2013 de la base de datos de genes Greengenes de ARNr de 16S (greengenes.lbl.gov) a partir de la combinación de 8-meros contenida en todas las sondas del conjunto. A continuación se identificaron los taxones mediante el nombre taxonómico convencional o con un identificador jerárquico de taxones.

Después, se identificaron los taxones para la inclusión en el análisis, los valores utilizados para cada muestra de taxón se completaron de dos maneras distintas. En el primer caso, se utilizó una métrica de abundancia relativa para clasificar la abundancia de cada taxón con respecto a los otros. El segundo caso utilizó una métrica binaria o una puntuación de presencia/ausencia para determinar si cada taxón estaba realmente en la muestra.

Los datos del análisis de la micromatriz se utilizaron también para seleccionar microbios para la inclusión en las composiciones descritas en el presente documento (tales como los microbios relacionados en la tabla 1 y en otras partes en el presente documento). Los microbios (taxones, géneros, o especies) se clasificaron a fin de estimar la abundancia relativa y se seleccionaron los microbios basándose en las características deseadas.

Ejemplo 4

Análisis de microbios en A1006 mediante secuenciación

Este ejemplo describe métodos ilustrativos para el análisis de microbios en A1006 mediante la secuenciación del ADN de 16S. Un experto en la materia apreciará que los métodos que se desvían de estos métodos específicos se pueden usar también para la secuenciación y el análisis satisfactorio de microbios en A1006.

Se extrajo el ADN genómico de una muestra de A1006. Se amplificó el ADN de 16S mediante la PCR y se secuenció, utilizando, por ejemplo, el sistema de identificación microbiana MICROSEQ ID (Applied Biosystems/Life Technologies, Grand Island, NY). Se analizaron los datos de la secuenciación, utilizando, por ejemplo, el software SHERLOCK DNA (MIDI Labs, Newark, DE).

Ejemplo 5**Crecimiento de microbios en fertilizante de nitrógeno**

- 5 Este ejemplo describe la selección de subpoblaciones del consorcio microbiano utilizando diferentes condiciones de crecimiento, tales como la exposición a fertilizantes líquidos. Este ejemplo demuestra también la tolerancia de los microbios a altas concentraciones de fertilizantes de nitrógeno y la utilidad de combinar el consorcio de microbios con fertilizantes usados en agricultura.
- 10 El consorcio de microbios se combinó tanto con urea líquida-amoniaco-fertilizante de nitrógeno (UAN 32) como con fertilizante de polifosfato de amonio (10-34-0; AP) en una relación de 90:1 (fertilizante:microbios) en recipientes de crecimiento con tapa de 250 ml y crecieron tanto a 4 °C como a 23 °C. Los controles consistieron en diluciones de agua:microbios (90:1) que crecieron en paralelo. Las muestras se cultivaron sin agitación durante 28 días. Con intervalos de 7 días, la muestra se mezcló hasta la uniformidad, se recuperó una alícuota de 1 ml, se diluyó en serie,
- 15 se sembró en placas sobre medio de crecimiento convencional (Agar nutriente/NA para crecimiento aerobio, Agar para métodos convencionales/SMA para la evaluación del crecimiento anaerobio) y crecieron tanto en condiciones aerobias (27 °C) como anaerobias (35 °C) durante 48 o 72 horas, respectivamente. Se llevaron a cabo las curvas de crecimiento por triplicado.
- 20 Las tasas de crecimiento para los microbios UAN 32 expuestos (UAN32) frente al control (CON) que crecieron a 4 °C se ilustran en la Figura 4A o los microbios UAN 32 expuestos (UAN) frente al control (CON) crecieron a 23 °C (Figura 4B). Fueron evidentes marcadas diferencias en el perfil de crecimiento durante el periodo de incubación de 28 días entre las dos temperaturas y en la recuperación de poblaciones aerobias o anaerobias. A 4 °C (Fig. 4A), las poblaciones aerobias en las muestras expuestas a UAN y las muestras del control tuvieron el máximo en el día 14 y disminuyeron lentamente. Los modelos de crecimiento anaerobio fueron diferentes, siendo el crecimiento máximo del control en el día 21, mientras que el crecimiento microbiano expuesto a UAN disminuyó entre el día 7 y el 14 y se recuperó posteriormente en el día 28.
- 25 El crecimiento a 23 °C (Fig. 4B) mostró un fuerte crecimiento de los cultivos del control durante el curso de tiempo del día 28 para las poblaciones aerobias; el crecimiento anaerobio se aplanó para el día 14. Por el contrario, los modelos de crecimiento aerobio y anaerobio para los cultivos expuestos a UAN fueron similares y se mantuvieron relativamente planos. Comparando las poblaciones expuestas a UAN con las poblaciones expuestas a AP mostraron un perfil de crecimiento relativamente plano similar para las bacterias aerobias y anaerobias (Fig. 4C).
- 30 Las colonias separadas limpiamente se enviaron a los MIDI Labs, Inc. (Newark, DE) para la secuenciación del ADN ribosómico de la región variable 16S para la identificación de especies (como se describe en el Ejemplo 4). Se identificaron los aislados purificados y se relacionaron en la Tabla 2. Se asignó un emparejamiento a nivel de especie si el % de GD (diferencia genérica) entre el emparejamiento desconocido y el más cercano fue menor del % de GD promedio aproximado entre especies en esta familia genética concreta, que es normalmente del 1 %. Se asignó un emparejamiento a nivel género cuando la secuencia no cumple los requerimientos para un emparejamiento a nivel de especie, pero agrupado aún en la ramificación de un género bien definido. (1 % < % de GD < 3 %).
- 40

Tabla 2. Microbios identificados mediante secuenciación de colonias de A1006 expuestos a UAN o AP.

Microbio	UAN 4 °C	UAN 23 °C	AP 23 °C
<i>Sphingomonas</i>	X		
<i>Micrococcus luteus</i>	X		
<i>Paenibacillus</i>	X	X	X
<i>Acremonium bacillisporum</i>	X		
<i>Leucobacter iarius</i>	X		
<i>Bacillus amyloliquefaciens/ Bacillus atrophaeus</i>	X		
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	X		
<i>Microbacterium</i>	X		
<i>Bacillus clausii</i>	X		
<i>Virgibacillus proomii</i>		X	
<i>Virgibacillus pantothenicus</i>		X	
<i>Bacillus flexus</i>		X	

(continuación)

Microbio	UAN 4 °C	UAN 23 °C	AP 23 °C
<i>Brevibacillus parabrevis</i>		X	
<i>Rummeliibacillus pycnus</i>		X	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		X	
<i>Brevibacillus</i>		X	X
<i>Oceanobacillus caeni</i>		X	
<i>Brevundimonas intermedia vesicularis</i> y/o <i>Brevundimonas nasdae</i>			X
<i>Rhizobium radiobacter</i>			X
<i>Chitinophaga terrae</i>			X
<i>Microbacterium paraoxydans</i>			X

Ejemplo 6**5 Biodegradación de materiales que contienen quitina**

Este ejemplo describe métodos ilustrativos para la biodegradación de materiales biológicos que contienen quitina usando el consorcio microbiano A1006. Sin embargo, un experto en la materia apreciará que los métodos que se desvían de estos métodos específicos pueden también utilizarse para una biodegradación satisfactoria de los

Los subproductos de las gambas se obtienen de plantas de procesamiento de gambas y se transportan en recipientes cerrados enfriados. Tras la inspección de la calidad de la materia prima, los subproductos de la gamba se homogenizan para reducir el tamaño de partículas hasta aproximadamente 3-5 mm. Los cultivos microbianos A1006 preactivados (aproximadamente 0,2-100 ml/l) y sacarosa (aproximadamente 5 g/l) se mezclan con el subproducto de la gamba homogeneizado (aproximadamente 50 g/l) y se agitan hasta que la mezcla es homogénea. Con agitación continua, la temperatura se mantiene a la temperatura ambiente (aproximadamente 19-35 °C) y el pH se ajusta a 3,5-4,0 con ácido cítrico. Los ingredientes mezclados se transfieren a un tanque de fermentación desinfectado (25.000 l) y fermentan a 30-36 °C durante 120 h. Se aplica agitación durante 30 minutos al menos dos veces al día. Durante el proceso de fermentación, se vigila el pH, y se determina la acidez valorable total (TTA, en %) mediante valoración con NaOH 0,1 N. La fermentación se detiene cuando la TTA es aproximadamente del 3,5% y/o el pH es aproximadamente 4-5.

Los cultivos fermentados se alimentan a un decantador continuo. La capa sólida separada de la etapa de decantación se somete a centrifugación para eliminar la capa lipídica. El líquido purificado (HYTb) se mezcla con azúcar (tal como melazas, 10 % en v/v), a continuación se almacena en tanque de almacenamiento o dispensarse en bolsas. Los materiales sólidos procedentes de la etapa de decantación se secan con aire supercalentado a 120 °C hasta que el contenido de humedad está por debajo del 8 %, a continuación se tritura hasta un tamaño de una malla 200. El producto seco (HYTc) se envasa en bolsas o saquitos.

Ejemplo 7**Biodegradación de la quitina**

Este ejemplo describe métodos ilustrativos para la biodegradación de la quitina usando el consorcio microbiano A1006. Sin embargo, un experto en la materia apreciará que los métodos que se desvían de estos métodos específicos pueden también utilizarse para una biodegradación satisfactoria de la quitina.

El cultivo microbiano A1006 se preactiva con azúcar (aproximadamente 2,5 g/l) en un tanque de 10.000 l durante tres días. El inóculo activado se mezcla con un hidrolizado de proteínas tal como HYTb (aproximadamente 500 ml/l) y quitina (HYTc, por ejemplo, producido como se describe en el Ejemplo 6). La mezcla se mezcla suavemente durante 1 hora para conseguir una homogeneización completa. La mezcla se fermenta durante 20 días a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 19-35 °C) con agitación durante aproximadamente 8 horas al día y controlando el pH (pH 4,0-5,0). Las muestras se pueden recoger periódicamente, por ejemplo, cada dos días, para la cuantificación de la glucosamina y opcionalmente quitosana. Después que se ha completado la fermentación, la mezcla se filtra a través de un filtro que retiene partículas de un tamaño de una malla de 300, principalmente la quitina restante. El filtrado se retiene y embotella tras la caracterización del producto.

Ejemplo 8

Tratamiento del campo de maíz con composiciones microbianas

Este ejemplo describe un método representativo para obtener un rendimiento del cultivo de maíz aumentado, usando un consorcio microbiano. Un experto en la materia apreciará que los métodos que se desvían de estos métodos específicos pueden también utilizarse para aumentar el rendimiento del cultivo.

El tratamiento del maíz del campo con una composición microbiana similar a A1006, o con HYTb, mostró un fuerte aumento en el rendimiento cosechable final. Todas las prácticas agronómicas de fertilización, la gestión del cultivo, el control de malezas, y el control de plagas, eran idénticas y en paralelo para las parcelas tratadas con la composición microbiana o las parcelas tratadas con HYTb (Ensayo) y las parcelas tratadas con el control (Comprobación).

El ensayo 1 evaluó el campo después que se añadió la composición microbiana al recubrimiento típico alrededor de la planta con nitrógeno (1 l/acre (2,5 l/ha) de composición microbiana; fertilizante líquido 32 UAN; Ensayo) en comparación con el control no tratado (Comprobación), aplicado a la etapa V2. En dos ensayos de tiras replicadas a gran escala (1 acre (0,4 ha) en total), el rendimiento de las tiras de ensayo fue 8 % a 10 % superior que las tiras de control en paralelo (Comprobación) (Fig. 5A).

El ensayo 2 demostró que la aplicación en surcos y la adición del recubrimiento alrededor de la planta fueron eficaces para aumentar los rendimientos del maíz. En un ensayo de tiras en 1 acre (0,4 ha), se trataron parcelas grandes con la composición microbiana añadida en surcos, durante la etapa de plantación (1 l/acre (2,5 l/ha) o en la etapa V2 como un recubrimiento alrededor de la planta (3 gal (34,05 l) de fertilizante líquido NEK, 1 litro de la mezcla de micronutrientes). Ambos métodos de aplicación mostraron tiras de ensayo que tenían aproximadamente un aumento del 5 % en el rendimiento, aproximadamente 10 Bu/acre (672 kg/ha) en comparación con los controles (Fig. 5B). La adición de una mezcla comercial de ácido húmico/bioestimulante al 10 % al ensayo (Actuato) en surcos ofreció el mismo rendimiento del 5 % como una adición de la composición microbiana sola en comparación con el control no tratado (Fig. 5B).

El ensayo 3 demostró que la adición de los productos de estabilización del nitrógeno tanto no afectaron como reforzaron ligeramente el rendimiento potenciando el efecto de la composición microbiana en el maíz y validaron además el refuerzo consistente en el rendimiento de la composición microbiana administrada tanto en surcos como mezclada en el recubrimiento alrededor de la planta (Fig. 5C). En un ensayo de tiras en 1 acre (0,4 ha), los tratamientos en surcos y de recubrimiento alrededor de la planta ofrecieron un refuerzo del rendimiento del 3 % (8 Bu/acre (538 kg/ha)) durante el control (Comprobación). La adición del actuato produjo un ligero aumento del rendimiento (refuerzo del 4 % en el rendimiento, 9 Bu/acre (600 kg/ha) mayor que el control). La adición de productos de estabilización del nitrógeno, Instinct o N-Kress, no produjo ningún efecto (un modesto refuerzo del 2,5 % en el rendimiento para Instinct) o un refuerzo ligeramente mayor en el rendimiento (4,6 % de aumento en el rendimiento para N-Kress, 11 Bu/acre (740 kg/ha) mayor que el control).

El ensayo 4 demostró que HYTb administrado en surcos reforzó también el resultado sobre las parcelas del control. En un ensayo de 20 acres (8 ha), Se añadió HYTb a la mezcla de fertilizante/nutrientes en surco (1 l/acre (2,5 l/ha). En comparación con la superficie de control en paralelo (Comprobación), Los acres tratados con HYTb ofrecieron un aumento del rendimiento del 3,5 % (7 Bu/acre (471 kg/ha)) (Fig. 5D).

El ensayo 5 demostró que, cuando se evaluó en un ensayo de diseño de parcelas replicadas, una única inoculación en el suelo del maíz con la composición microbiana a 1 l/acre (2,5 l/ha) en surco en la etapa V6, administrada con un 28 % de fertilizante de nitrógeno mediante riego por goteo, proporcionada con un aumento en el rendimiento del 14 % sobre el control sin tratar a través de cinco parcelas replicadas (Fig. 5E).

El ensayo 6 mostró que HYTb, cuando se usa solo como un tratamiento foliar en el maíz, proporcionó también un aumento en el rendimiento del 9,5 % cuando se comparó con el control sin tratar cuando se ensayó en un ensayo de diseño de parcelas replicadas aleatorizado. HYTb se pulverizó foliarmente sobre dos aplicaciones de 1 l/acre (2,5 l/ha) cada aplicación, en la etapa V8 y las etapas VT (Fig. 5F).

El ensayo 7 se aleatorizó también y replicó el ensayo de diseño de parcelas en maíz, llevado a cabo en condiciones de estrés hídrico. En este estudio, la cantidad de riego se limitó a 11 pulgadas (27,94 cm) de agua frente a las parcelas regadas que recibieron 17 pulgadas (43,18 cm) de irrigación. Un único tratamiento de 1 l/acre (2,5 l/ha) de composición microbiana, administrado en la etapa V6 con un 28 % de fertilizante de nitrógeno mediante riego por goteo (Tratado), produjo un aumento en el rendimiento del 38 % sobre los gráficos tratados con fertilizante solo (Comprobación sin tratar). El aumento en la cosecha observado con el tratamiento de la composición microbiana representa un potencial de 31 Bu/acre (2084 kg/ha) de rendimiento mayor (Fig. 5G).

Ejemplo 9

Tratamiento del trigo con composiciones microbianas

Este ejemplo describe un método representativo para obtener un rendimiento aumentado del cultivo de maíz, usando un consorcio microbiano. Un experto en la materia apreciará que los métodos que se desvían de estos métodos específicos pueden también utilizarse para aumentar el rendimiento del cultivo.

- 5 El tratamiento del trigo con una composición microbiana similar a A1006, o con HYTb, mostró un fuerte aumento en el rendimiento cosechable final. Todas las prácticas agronómicas de fertilización, la gestión del cultivo, el control de malezas, y el control de plagas, eran idénticas y en paralelo para las parcelas tratadas con la composición microbiana o las parcelas tratadas con HYTb (Ensayo) y las parcelas tratadas con el control (Comprobación).
- 10 El ensayo 1 mostró un fuerte aumento en el campo de trigo promovido por una aplicación al suelo de la composición microbiana. En este ensayo de 80 acres (32 ha), la composición microbiana se añadió a una tasa de 1 l/acre (2,5 l/ha) a la mezcla de fertilizante del recubrimiento superior de la planta en la etapa S4. Los rendimientos de la cosecha demostraron un aumento en el rendimiento de 11 % (10 Bu/acre (310 kg/ha)) con el uso de la composición microbiana (Fig. 6A).
- 15 El ensayo 2 comparó tres grandes ensayos en el misma área geográfica, totalizando 271 acres (108 ha) de composición microbiana tratada (ensayo) y 354 acres (141,6 ha) de trigo sin tratar en paralelo (control). Todos los ensayos se llevaron a cabo análogamente, con la misma composición microbiana (1 l/acre (2,5 l/ha) añadida a la mezcla de fertilizante del recubrimiento superior de la planta y se aplicó a la etapa S4 de crecimiento del maíz. Con respecto a los acres del control en paralelo en la misma granja, el trigo tratado proporcionó mayores rendimientos, variando desde un aumento del 6 % al 17 % a rendimiento mayores del 36 %, con un promedio en tres granjas de aproximadamente un aumento del 16 % en el campo (Fig. 6B).
- 20 El ensayo 3 evaluó la composición microbiana y el tratamiento del trigo con HYTb en combinación y encontró que el rendimiento potenció la combinación. En un ensayo fundamental grande (129 acres (51,6 ha)), se aplicó la composición microbiana preplanta a una tasa de 1 l/acre (2,5 l/ha), incorporada con nutritivo normal, y seguida por una administración fundamental de HYTb como una pulverización foliar (1 l/acre (2,5 l/ha) más herbicida a una etapa S6 de crecimiento del trigo. En comparación con el control sin tratar (Comprobación), la superficie tratada proporcionó un rendimiento mayor del 10 % (14 Bu/acre (942 kg/ha) que la superficie del control (Fig 6C). Adicionalmente, las plantas de trigo típicas de las parcelas tratadas tenían visiblemente más raíces que las de los controles sin tratar (Fig. 6D).
- 25
- 30

Ejemplo 10

Tratamiento del tomate con A1006

- 35 Este ejemplo describe un método representativo para obtener un rendimiento aumentado del cultivo de tomate usando el consorcio microbiano A1006 Un experto en la materia apreciará que los métodos que se desvían de estos métodos específicos pueden también utilizarse para aumentar el rendimiento del cultivo.
- 40 El tratamiento del tomate con A1006 mostró un fuerte aumento en el rendimiento cosechable final. Todas las prácticas agronómicas de fertilización, la gestión del cultivo, el control de malezas, y el control de plagas, eran idénticas y en paralelo para las parcelas tratadas con la composición microbiana (Ensayo) y las parcelas tratadas con el control (Comprobación).
- 45 El ensayo 1 evaluó el tratamiento del tomate aplicado a 1 l/acre (2,5 l/ha) con una aplicación en el trasplante (en el agua del trasplante) seguida por la aplicación mediante riego por goteo cada tres semanas (cuatro veces). En una parcela de pruebas de 10 acres (4 ha) en comparación con una parcela de control de 10 acres (4 ha), la superficie tratada proporcionó un rendimiento mayor de aproximadamente el 8 % que el control (Fig. 7A).
- 50 El ensayo 2 evaluó el tratamiento del tomate aplicado a 1 l/acre (2,5 l/ha) mediante riego por goteo cada tres semanas (5 veces). En una parcela de pruebas de 49,6 acres (19,9 ha) en comparación con una parcela de control de 4,45 acres (1,78 ha), la superficie tratada proporciono aproximadamente un rendimiento mayor de aproximadamente el 9 % que la del control (Fig. 7B).
- 55 El ensayo 3 evaluó el tratamiento del tomate aplicado a 1 l/acre (2,5 l/ha) con una aplicación en el trasplante (en el agua del trasplante) seguido por aplicación mediante riego por goteo cada tres semanas (tres veces). En una parcela de pruebas de 15,6 acres (6,24 ha) en comparación con una parcela de control de 73,2 acres (29,3 ha), la superficie tratada proporcionó un rendimiento mayor de aproximadamente el 29 % que la del control (Fig. 7C).
- 60 El ensayo 4 evaluó el tratamiento del tomate aplicado a 1 l/acre (2,5 l/ha) mediante riego por goteo cada tres semanas (cuatro veces). En una parcela de pruebas de 8,7 acres (3,5 ha) en comparación con una parcela de control de 6,57 acres (2,6 ha), la superficie tratada proporcionó un rendimiento disminuido en comparación con el control (Fig. 7D). Sin embargo, el ensayo se vio afectado por una grave presión de enfermedad (*Fusarium*) que afectó probablemente el resultado del ensayo. Además, Este ensayo tuvo un tamaño de parcela relativamente pequeño e incluyó también diferentes variedades de cultivo en el tratamiento.
- 65

El ensayo 5 evaluó el tratamiento del tomate aplicado a 1 l/acre (2,5 l/ha) en combinación con el tratamiento del fertilizante. Una aplicación fue en el trasplante con 8-7-7, seguido por aplicación mediante riego por goteo cada tres semanas (tres veces) con UAN. En una parcela de pruebas de 33,3 acres (13,3 ha) en comparación con una parcela de control de 16,45 acre (6,58 ha), la superficie tratada proporcionó un rendimiento mayor de aproximadamente el 5 % que la del control (Fig. 7E).

Ejemplo 11

Tratamiento del girasol con composiciones microbianas

Este ejemplo describe un método representativo para obtener un rendimiento aumentado del cultivo del girasol, usando un consorcio microbiano. Un experto en la materia apreciará que los métodos que se desvían de estos métodos específicos pueden también utilizarse para aumentar el rendimiento del cultivo.

El tratamiento del cultivo del girasol con una composición microbiana preparada de forma similar a A1006 mostró un fuerte aumento en el rendimiento cosechable final. Todas las prácticas agronómicas de fertilización, la gestión del cultivo, el control de malezas, y el control de plagas, eran idénticas y en paralelo para las parcelas tratadas con la composición microbiana (Ensayo) y las parcelas tratadas con el control (Comprobación).

Este ensayo evaluó el tratamiento de la composición microbiana del girasol aplicado a 1 l/acre (2,5 l/ha) mediante riego por goteo 30 días y 60 días después de la plantación. En una parcela de pruebas de 93,5 acre (37,4 ha) en comparación con una parcela de control de 97,13 acre (38,9 ha), la superficie tratada proporcionó un rendimiento mayor de aproximadamente el 50 % que la del control (Fig. 8). Además, el tratamiento dio como resultado tasas de germinación aumentadas.

Ejemplo 12

Tratamiento del arroz con composiciones microbianas

Este ejemplo describe un método representativo para obtener un rendimiento aumentado del cultivo del arroz, usando un consorcio microbiano. Un experto en la materia apreciará que los métodos que se desvían de estos métodos específicos pueden también utilizarse para aumentar el rendimiento del cultivo.

El tratamiento del arroz con una composición microbiana preparada de forma similar a A1006 mostró un fuerte aumento en el rendimiento cosechable final. Todas las prácticas agronómicas de fertilización, la gestión del cultivo, el control de malezas, y el control de plagas, eran idénticas y en paralelo para las parcelas tratadas con la composición microbiana (Ensayo) y las parcelas tratadas con el control (Comprobación).

Este ensayo evaluó el tratamiento de la composición microbiana del arroz aplicado a 1 l/acre (2,5 l/ha) con una solución acuosa de amoníaco. En una parcela de pruebas de 61,8 acre (24,7 ha) en comparación con una parcela de control de 100,7 acre (40,3 ha), la superficie tratada proporcionó un rendimiento mayor de aproximadamente el 6 % que la del control (Fig. 9).

Ejemplo 13

Tratamiento de la soja con composiciones microbianas

Este ejemplo describe un método representativo para obtener un rendimiento aumentado del cultivo de la soja, usando un consorcio microbiano. Un experto en la materia apreciará que los métodos que se desvían de estos métodos específicos pueden también utilizarse para aumentar el rendimiento del cultivo.

El tratamiento de la soja con una composición microbiana similar a A1006, o con HYTb, mostró un fuerte aumento en el rendimiento cosechable final. Todas las prácticas agronómicas de fertilización, la gestión del cultivo, el control de malezas, y el control de plagas, eran idénticas y en paralelo para las parcelas tratadas con la composición microbiana o las parcelas tratadas con HYTb (Ensayo) y las parcelas tratadas con el control (Comprobación).

El ensayo 1 mostró un aumento en el rendimiento de la soja promovido por la aplicación de HYTb a 1 l/acre (2,5 l/ha), aplicado con fungicida. En dos ensayos de un acre (0,4 ha), la superficie tratada proporcionó un rendimiento aumentado aproximadamente un 5 % en comparación con la del control (Fig. 10A).

El ensayo 2 evaluó el tratamiento con la composición microbiana de la composición microbiana más el tratamiento con HYTb de la soja aplicado a 1 l/acre (2,5 l/ha) mediante aplicación foliar y de recubrimiento alrededor de la planta. La superficie tratada tenía un rendimiento disminuido en comparación con el control (Fig. 10B). Sin embargo, el ensayo se vio afectado por el pequeño tamaño de la parcela combinado con problemas debidos a la fauna silvestre (los ciervos criaron y consumieron las judías antes de la cosecha).

El ensayo 3 mostró un aumento en el rendimiento de la soja promovido por la aplicación de HYTb a 0,5 l/acre (1,25 l/ha), aplicado con fungicida mediante aplicación foliar. En una parcela de pruebas de 60 acre (24 ha) en comparación con una parcela de control de 26,48 acre (10,6 ha), la superficie tratada proporcionó un rendimiento aumentado aproximadamente del 12 % en comparación con la del control.

5

Ejemplo 14

Tratamiento de las fresas con composiciones microbianas

10 Este ejemplo describe un método representativo para obtener un rendimiento aumentado del cultivo de la fresa, usando un consorcio microbiano. Un experto en la materia apreciará que los métodos que se desvían de estos métodos específicos pueden también utilizarse para aumentar el rendimiento del cultivo.

15 El tratamiento de la remolacha con una composición microbiana preparada de forma similar a A1006 más HYTb mostró un aumento en el rendimiento cosechable final. Todas las prácticas agronómicas de fertilización, la gestión del cultivo, el control de malezas, y el control de plagas, eran idénticas y en paralelo para las parcelas tratadas (Ensayo) y las parcelas tratadas con el control (Comprobación).

20 Se promovió un aumento en la producción comercial acumulativa mediante la aplicación de la composición microbiana y HYTB aplicadas mediante riego por goteo. En estos cinco ensayos independientes, se evaluó la variedad Sabrina en la región de Huelva de España. Una semana antes del trasplante de plántulas en las parcelas en bancada elevadas, se diluyeron 2 l de la composición microbiana más 4 l de HYTb en agua y se añadieron al riego por goteo por hectárea, con la misma tasa de aplicación llevada a cabo en las semanas 2, 4, y 6 después de la plantación. en las semanas 3, 5, y 7, la composición microbiana diluida se añadió a una tasa de 1 l/ha y se diluyó HYTb a una tasa de 2 l/ha. Desde 25 la semana 9 al final de la estación de la cosecha, se añadieron la composición microbiana diluida y HYTb a las tasas de 1 l/ha cada una. En los cinco ensayos, el tratamiento reforzó el rendimiento desde 5 % a 11 % por encima de parcelas paralelas no tratada, para un promedio de un aumento en el rendimiento de aproximadamente el 8 % a través de los cinco ensayos (Fig. 11).

Ejemplo 15

Tratamiento de la remolacha con composiciones microbianas

35 Este ejemplo describe un método representativo para obtener un rendimiento aumentado del cultivo de la remolacha, usando un consorcio microbiano. Un experto en la materia apreciará que los métodos que se desvían de estos métodos específicos pueden también utilizarse para aumentar el rendimiento del cultivo.

40 El tratamiento de la remolacha con una composición microbiana preparada de forma similar a A1006 junto con HYTb mostró un aumento en el rendimiento cosechable final. Todas las prácticas agronómicas de fertilización, la gestión del cultivo, el control de malezas, y el control de plagas, eran idénticas y en paralelo para las parcelas tratadas (Ensayo) y las parcelas tratadas con el control (Comprobación).

45 Se promovió un aumento en el peso promedio de la cabeza cosechada mediante la aplicación de la composición microbiana (2 l/acre (5 l/ha)) y HYTb (2 l/acre (5 l/ha)) aplicado mediante riego por goteo y HYTb (1 l/acre (2,5 l/ha)) mediante la aplicación foliar. En una parcela de pruebas de 8 acres (3,2 ha) en comparación con una parcela de control de 9 acres (3,6 ha), la superficie tratada proporcionó un rendimiento mayor de aproximadamente 2,2 veces que la del control (Fig. 12).

Ejemplo 16

50

Tratamiento de la col verde con composiciones microbianas

Este ejemplo describe un método representativo para obtener un rendimiento aumentado del cultivo de la col verde, usando un consorcio microbiano. Un experto en la materia apreciará que los métodos que se desvían de estos métodos 55 específicos pueden también utilizarse para aumentar el rendimiento del cultivo.

60 El tratamiento de la col verde con una composición microbiana preparada de manera similar a A1006, o con HYTb, mostró un fuerte aumento en el rendimiento cosechable final. Todas las prácticas agronómicas de fertilización, la gestión del cultivo, el control de malezas, y el control de plagas, eran idénticas y en paralelo para las parcelas tratadas con la composición microbiana o las parcelas tratadas con HYTb (Ensayo) y las parcelas tratadas con el control (Comprobación).

65 Los ensayos mostraron un aumento en el rendimiento de la col mediante la aplicación de la composición microbiana (2 l/acre (5 l/ha)) y HYTb (2 l/acre (5 l/ha)) aplicado mediante riego por goteo y HYTb (1 l/acre (2,5 l/ha)) mediante la aplicación foliar. Las coles se cosecharon en dos ciclos, como se representa por la cosecha del "primer corte" de las cabezas de la col y el posterior "segundo corte" de las cabezas de la col. Tal como se muestra en la Fig. 13A, En una

parcela de pruebas de 10,9 acres (4,3 ha) en comparación con una parcela de control de 14,9 acres (6 ha), la superficie tratada proporcionó un rendimiento mayor de aproximadamente el 18 % que el control (primer corte) y un rendimiento mayor de aproximadamente el 31 % que el control (segundo corte). Tal como se muestra en la Fig. 13B, En una parcela de pruebas de 3,7 acres (1,48 ha) en comparación con una parcela de control de 1,5 acres (0,6 ha), la superficie tratada proporcionó un rendimiento mayor de aproximadamente el 61 % que el control (primer corte) y un rendimiento mayor de aproximadamente el 64 % que el control (segundo corte).

Ejemplo 17

Tratamiento de semillas y tubérculos con HYTd

Este ejemplo describe un método representativo para obtener rendimientos aumentados en el cultivo del trigo y la patata usando el pretratamiento de la semilla o tubérculos de semilla con HYTd. Un experto en la materia apreciará que los métodos que se desvían de estos métodos específicos pueden también utilizarse para aumentar el rendimiento del cultivo.

El tratamiento de la semilla del trigo o los tubérculos de la semilla de patata antes de la plantación con HYTd preparada usando un consorcio microbiano similar a A1006 mostró un aumento en el rendimiento cosechable final. Todas las prácticas agronómicas de fertilización, la gestión del cultivo, el control de malezas, y el control de plagas, eran idénticas y en paralelo para las parcelas tratadas (Ensayo) y las parcelas tratadas con el control (Comprobación).

Para el trigo, se trataron las semillas en una suspensión diluida de HYTd, diluidas a una tasa de 3 ml de HYTd en agua por kg de semilla. Tras recubrir la semilla permitiendo el secado al aire, la semilla tratada se plantó y se comparó con parcelas idénticas de semillas no tratadas. Parcelas de pruebas en paralelo de un acre (0,4 acres) mostraron aproximadamente un aumento del 22 % en el rendimiento del trigo cosechado (Tabla 3).

El tratamiento de la semilla de patata se llevó a cabo diluyendo HYTd en agua y tratando la semilla de patata a una tasa de 1 ml por kg de semilla. Tras el secado al aire, la semilla de patata tratada se plantó en paralelo con semillas del control sin tratar en 1200 metros, en parcelas replicadas. La semilla de patata tratada con HYTd aumento el rendimiento de la patata un 32 % a 35 % en dos ensayos separados (Tabla 4).

Tabla 3. Rendimiento de las semillas de trigo tratadas con HYTd

Tratamiento	Dosis (ml/kg de semillas)	Peso de la paja/5 m ² de área (kg)	Peso de los granos/5 m ² de área (kg)	Rendimiento (kg/acre (kg/ha))
HYTd	3,00	9,8	2,6	1980 (4950)
Sin tratar	N/A	5,5	1,7	1610 (4025)

Tabla 4. Rendimiento de la semilla de patata tratada con HYTD

Tratamiento	Dosis (ml/kg de semillas)	Número de tubérculos/plantas	Peso de los tubérculos/m ² (kg)	Rendimiento final (kg/acre (kg/ha))	% de aumento en el rendimiento del tubérculo
Ensayo 1					
HYTd	1,00	11	3,15	12448 (31120)	32
Sin tratar	N/A	6	1,68	9440 (24850)	0
Ensayo 2					
HYTd	1,00	8	2,52	10720 (26800)	35
Sin tratar	N/A	5	1,47	7932 (19830)	0

Ejemplo 18

Tolerancia aumentada al estrés en patata

Este ejemplo describe un método representativo para obtener una calidad aumentada del tubérculo de la patata tratándolo con una composición microbiana similar a A1006 y HYTb en condiciones de campo estresantes.

La variedad de patata Russet Burbank se hizo crecer en condiciones convencionales en un ensayo de parcelas replicadas y se trató (composición microbiana más HYTb a 1 l cada una por acre (0,4 ha) en la plantación, en surcos, seguido por dos aplicaciones de pulverización foliar de HYTb a 1 l/acre (2,5 l/ha) a los 55 días y de nuevo 85 días

después de la plantación) o no trató (control). La variedad Russet Burbank es propensa a una calidad inferior en estrés hídrico, estrés térmico o estrés por nutrientes). En este ensayo, el tratamiento con la composición microbiana y HYTb potenció la tolerancia a un defecto de calidad inducido por estrés denominado corazón vacío. Las parcelas tratadas con la composición microbiana tuvieron una incidencia del 1,68 % de los tubérculos cosechados con el corazón vacío en comparación con el control con un 8,35 % de defectos de corazón vacío (Tabla 5).

Tabla 5. Defectos de calidad de corazón vacío de patata

Tratamiento	Rendimiento (kg/acre (kg/ha))	Porcentaje de corazón vacío
No tratado (control)	32.181 (80.453)	8,35 %
Composición microbiana más HYTb	32.636 (81.590)	1,68 %*
* p<0,01 en comparación con las no tratadas		

Ejemplo 19

Ensayo de vigor del pepino

Se pueden usar ensayos rápidos funcionales basados en plantas para evaluar rápidamente la respuesta a nuevas composiciones microbianas. Usando un ensayo de vigor y crecimiento de la planta, este ejemplo demuestra que A1006 potencia la tasa de crecimiento de las hojas y la expansión de la planta.

Tras la germinación previa de las plántulas de pepino en el papel de germinación enrollado empapado en nutrientes durante cuatro días, las plantas estadificadas y sincronizadas se trataron con una mezcla diluida de un fertilizante líquido y el consorcio microbiano. Las plántulas se trasplantaron en medio de crecimiento preparado sin suelo preparado con fertilizante y la solución de ensayo. La composición microbiana A1006 se diluyó 1:2000 en un medio fertilizante nutriente. Como tratamiento de control, se comparó una cantidad equivalente de agua añadida un medio nutriente. Al menos 18 de cada tratamiento crecieron en macetas, incluyendo plantas del control, se aleatorizaron en pisos, y crecieron en condiciones de crecimiento definidas, controlando la temperatura y la luz. Después de 18 días, Se midió el índice del área de la hoja (LAI) de la primera hoja verdadera de cada planta. Se registró también el peso total de la planta húmeda. Se analizaron los datos mediante ANOVA unilaterial (Análisis de la varianza) con el test post-hoc de Tukey para comparar las muestras en el experimento.

El día 18, la primera hoja LAI estimulada por el tratamiento con A1006 fue significativamente mayor que el control (Fig. 14).

En vista de las muchas realizaciones posibles a las que pueden aplicarse los principios de la divulgación, debe reconocerse que las realizaciones ilustradas son únicamente ejemplos y no deben considerarse como limitantes del alcance de la invención. En su lugar, el alcance de la invención se define por las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Agrinos AS Yoon, Sung-Yong H Swords, Kathleen Wagner, D. Ry Rajagopal, Selvasundaram Johnson, Brent Thorpe, Darrell T.

<120> CONSORCIOS MICROBIANOS

<130> 9223-93924-02

<150> US 62/126.343

<151> 27/02/2015

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleótido sintético

ES 2 750 612 T3

	<400> 1 agrgtttgat cmtggctcag	20
5	<210> 2 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador oligonucleótido sintético	
	<400> 2 ggttaccttg ttacgactt	19
15		

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende los microorganismos del Registro de depósito de patentes ATCC con designación PTA-121755 y un fertilizante líquido.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1, que comprende además uno o más de quitina, quitosano, glucosamina, y aminoácidos.
- 10 3. Un método que comprende:
- mezclar una fuente biológica que contiene quitina con la composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para formar una mezcla; fermentar la mezcla; y separar la mezcla fermentada en fracciones sólida, acuosa y lipídica.
- 15 4. El método de la reivindicación 3, en el que la fuente biológica que contienen quitina comprende animales acuáticos o subproductos de animales acuáticos, un insecto o un hongo.
5. El método de la reivindicación 4, en el que el animal acuático es un artrópodo acuático.
- 20 6. El método de la reivindicación 5, en el que el artrópodo acuático es una gamba, un cangrejo o un krill.
7. La fracción acuosa o sólida preparada por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6.
- 25 8. Un método que comprende poner en contacto suelo, plantas, o partes de plantas, con la composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
9. El método de la reivindicación 8, que comprende además
- 30 (i) poner en contacto el suelo, plantas, o partes de plantas, con uno o más de quitina, quitosano, glucosamina, y aminoácidos;
- (ii) poner en contacto el suelo, plantas o partes de plantas, con la fracción acuosa o sólida de la reivindicación 7;
- (iii) poner en contacto el suelo, plantas o partes de plantas, con un fertilizante líquido; y/o
- 35 (iv) poner en contacto el suelo, plantas o partes de plantas, con uno o más pesticidas, uno o más fungicidas, uno o más herbicidas, uno o más insecticidas, una o más hormonas vegetales, uno o más estimulantes vegetales o combinaciones de dos o más de los mismos.

FIG. 1

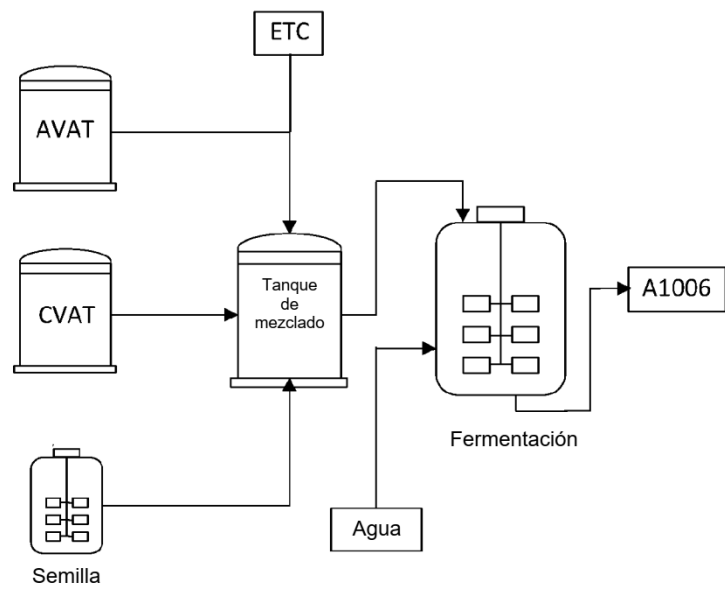


FIG. 2

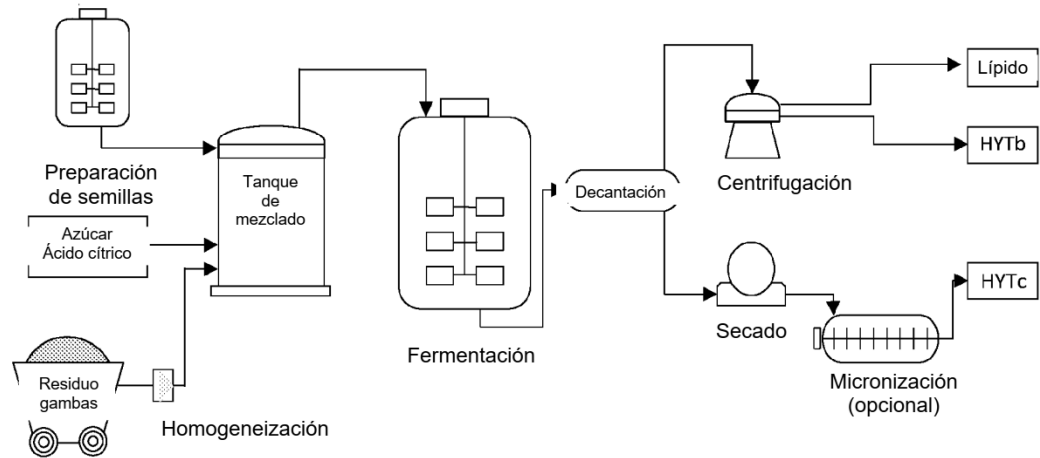


FIG. 3

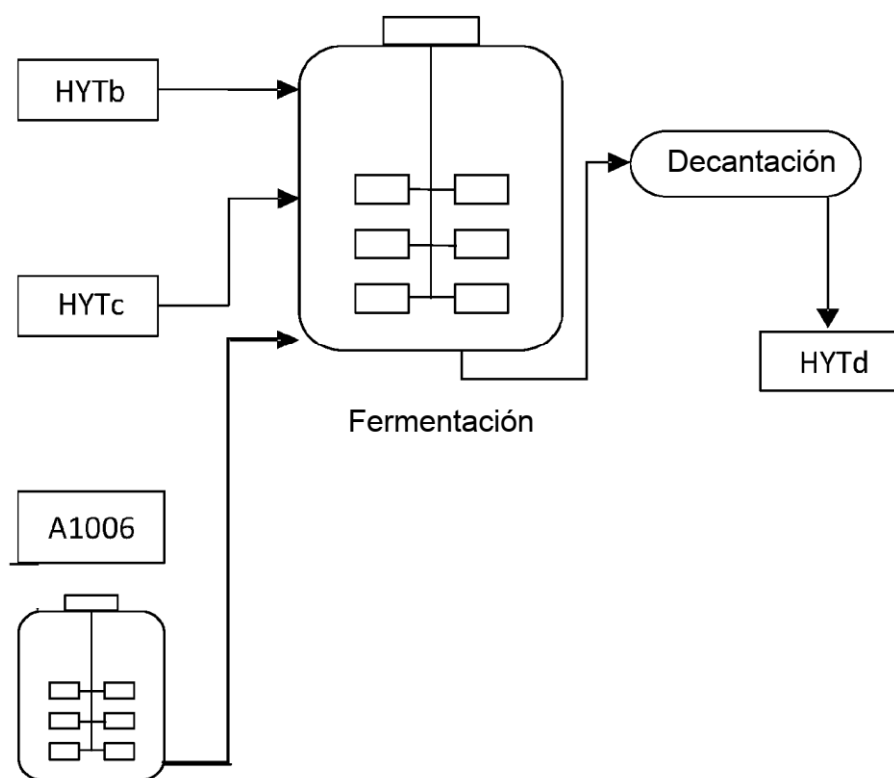


FIG. 4A

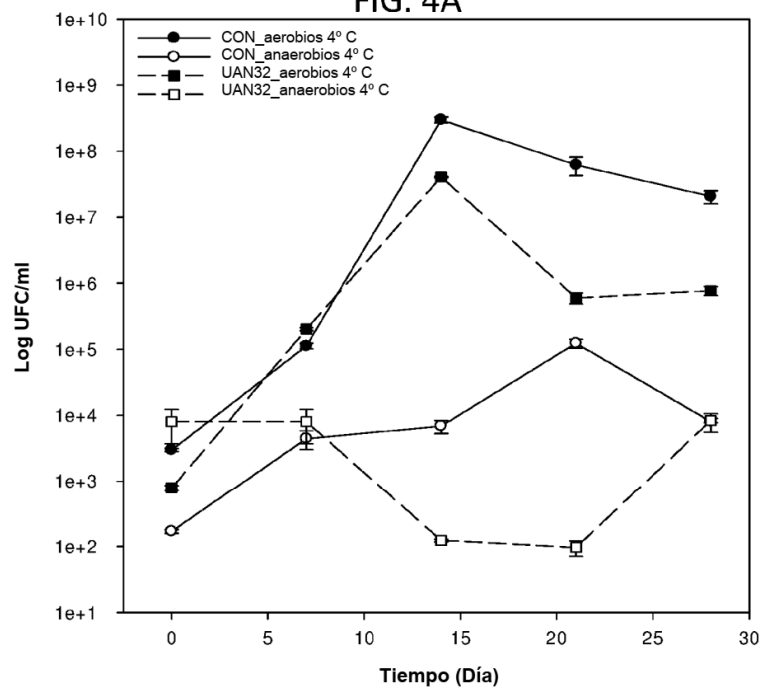


FIG. 4B

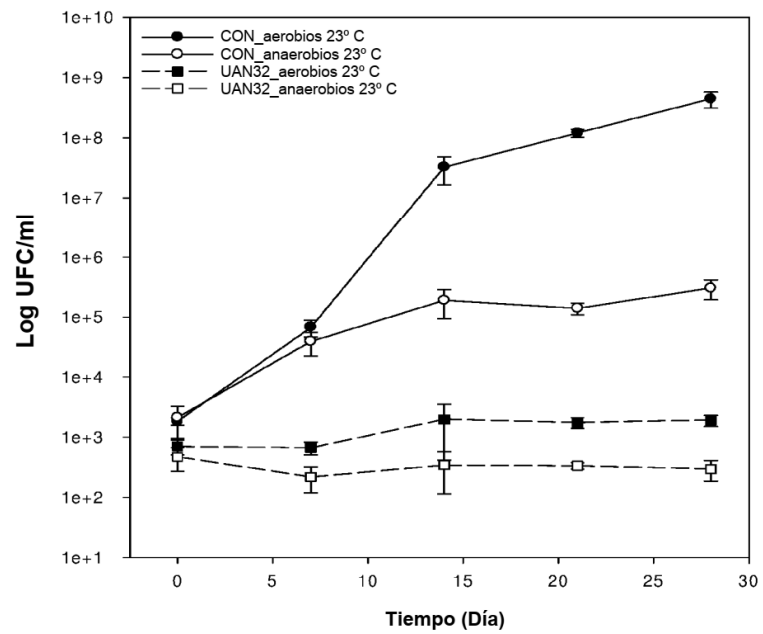


FIG. 4C

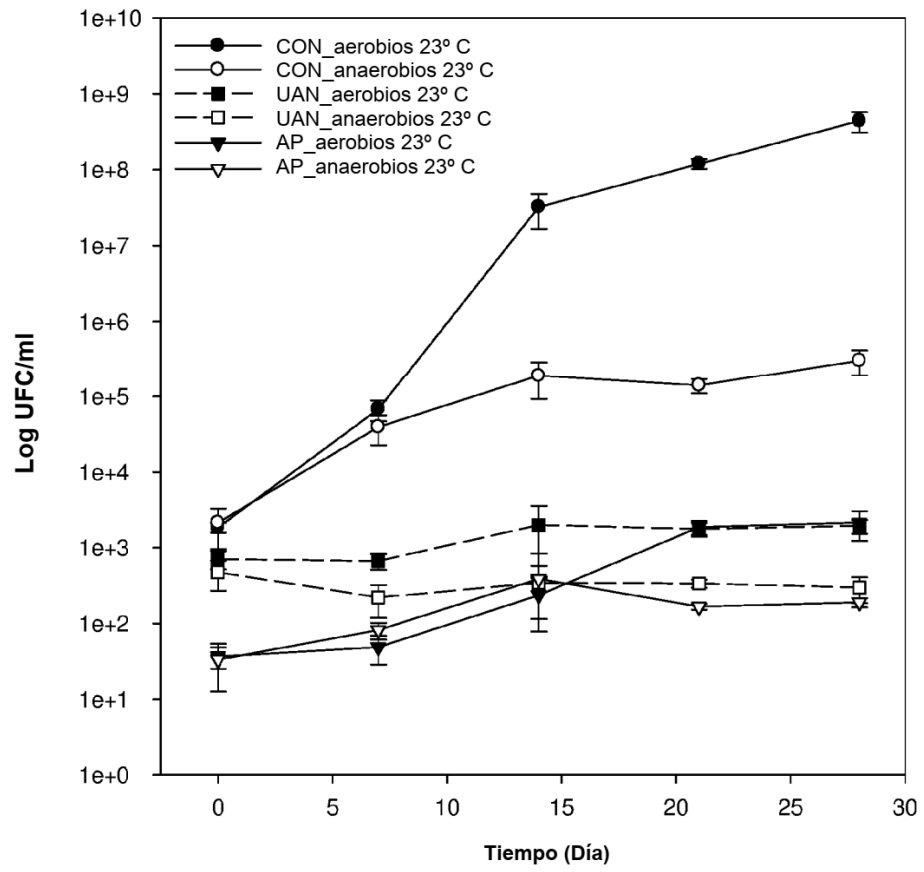


FIG. 5A

Datos de ensayo de maíz 1 (Iowa)

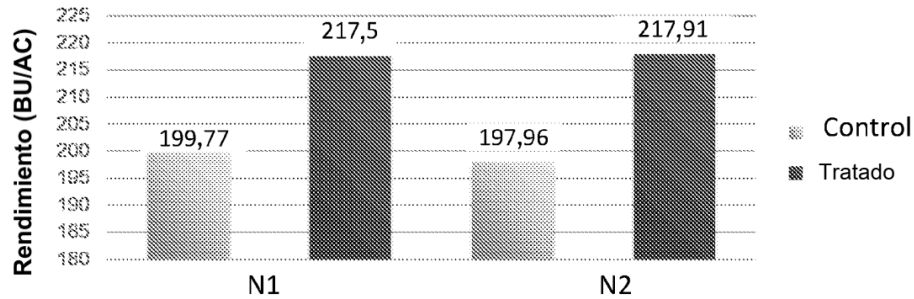


FIG. 5B

Datos de ensayo de maíz 2 (Kentucky)

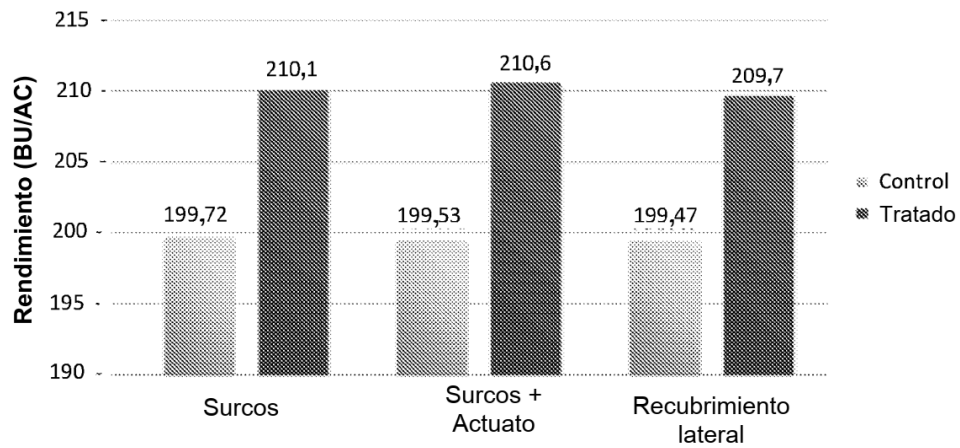


FIG. 5C

Datos de ensayo de maíz 3 (Kentucky)

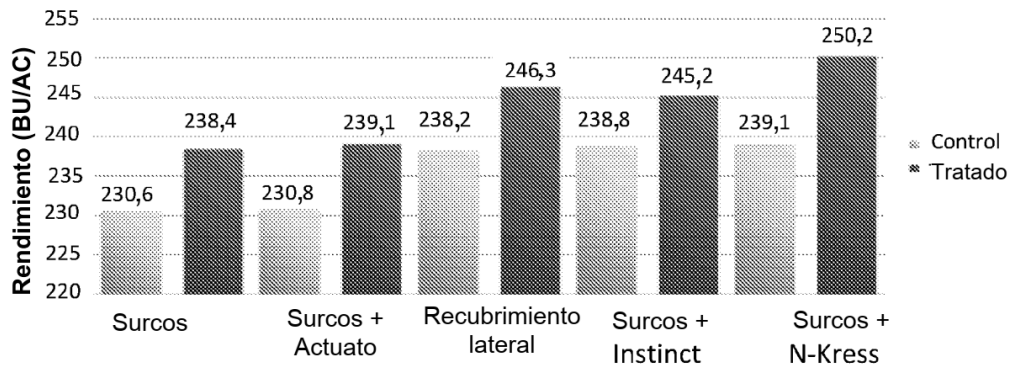


FIG. 5D

Datos de ensayo de maíz (Iowa)

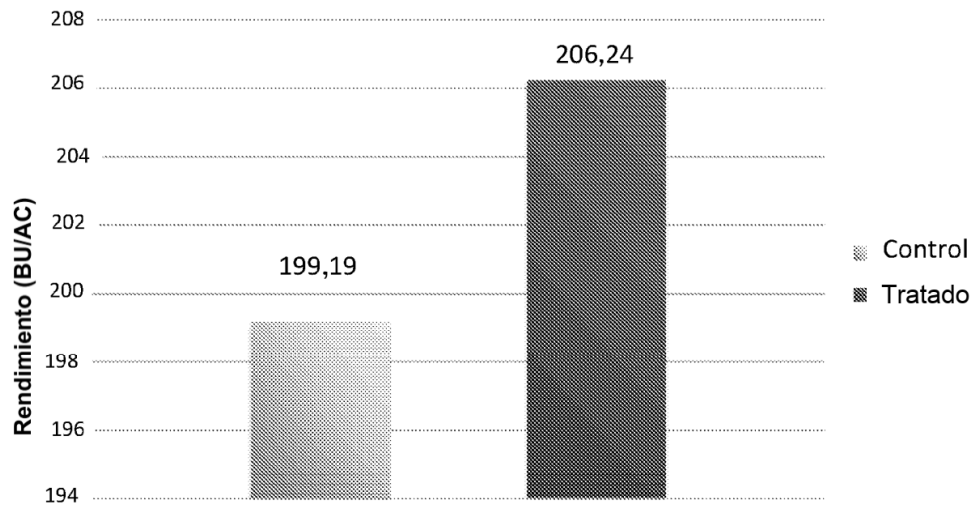


FIG. 5E

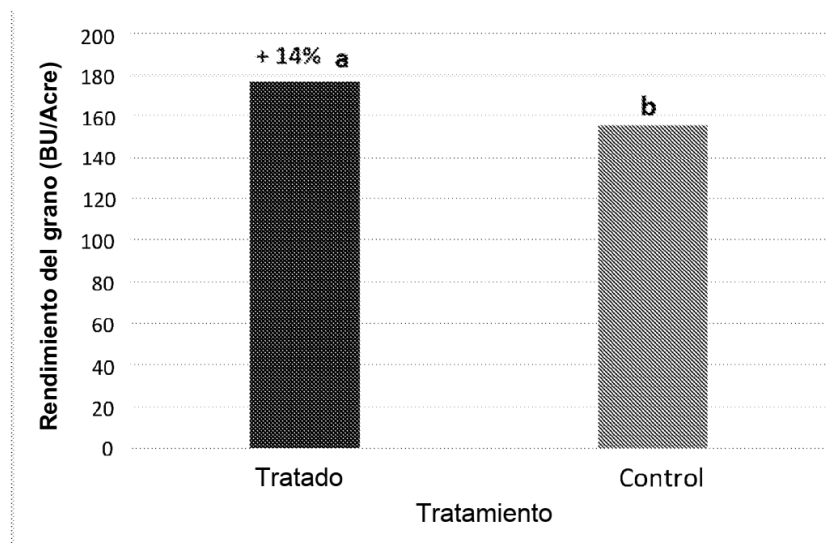


FIG. 5F

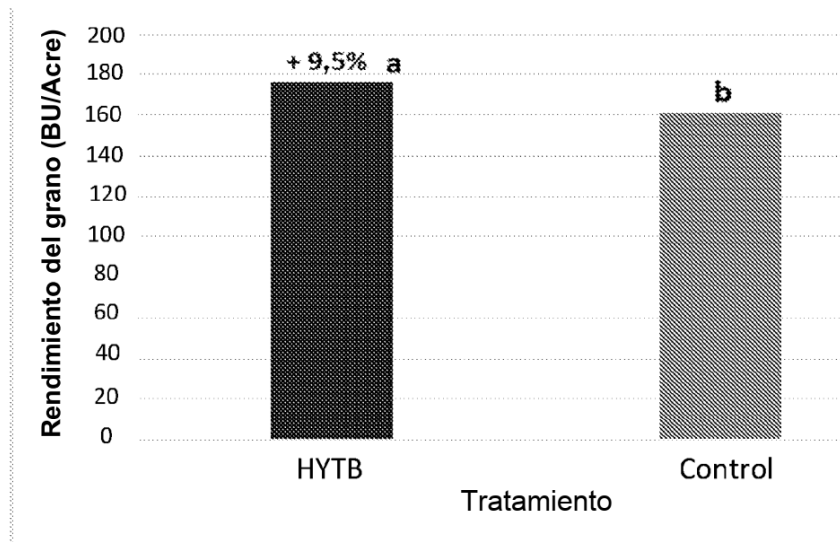


FIG. 5G

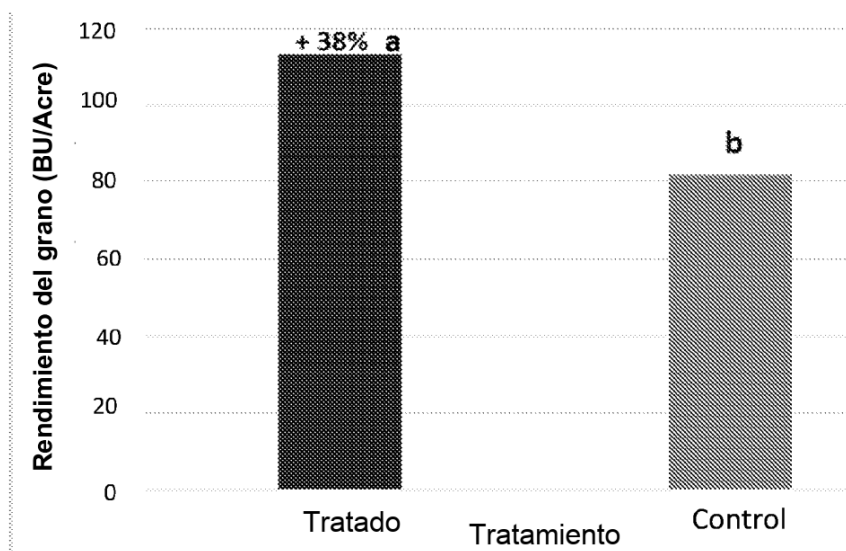


FIG. 6A

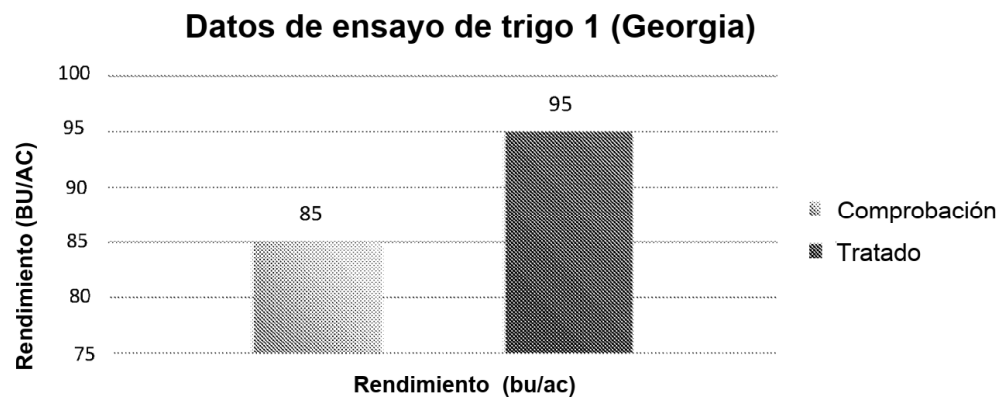


FIG. 6B

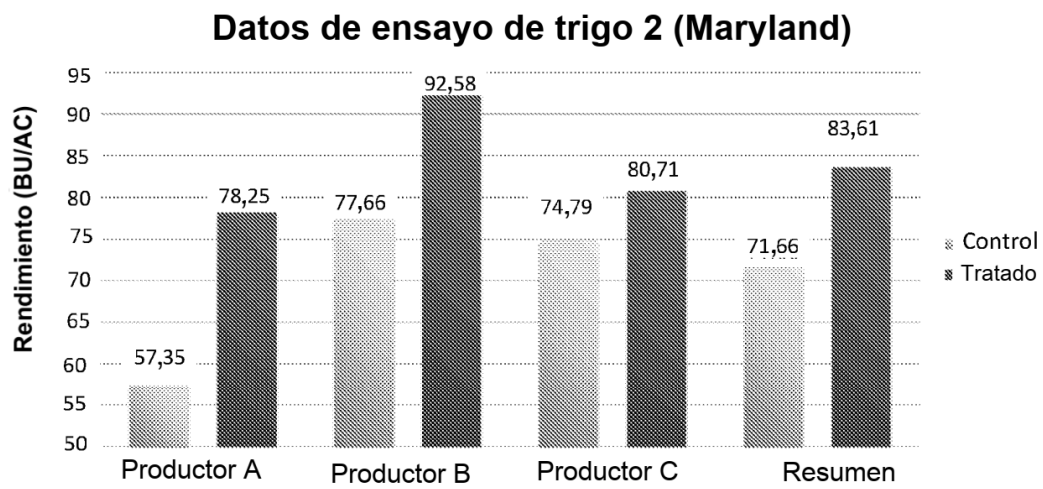


FIG. 6C

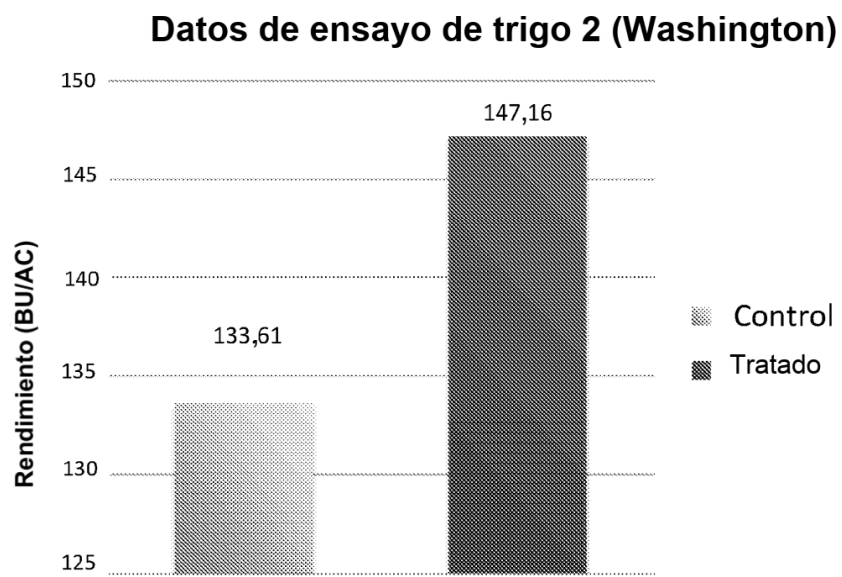


FIG. 6D

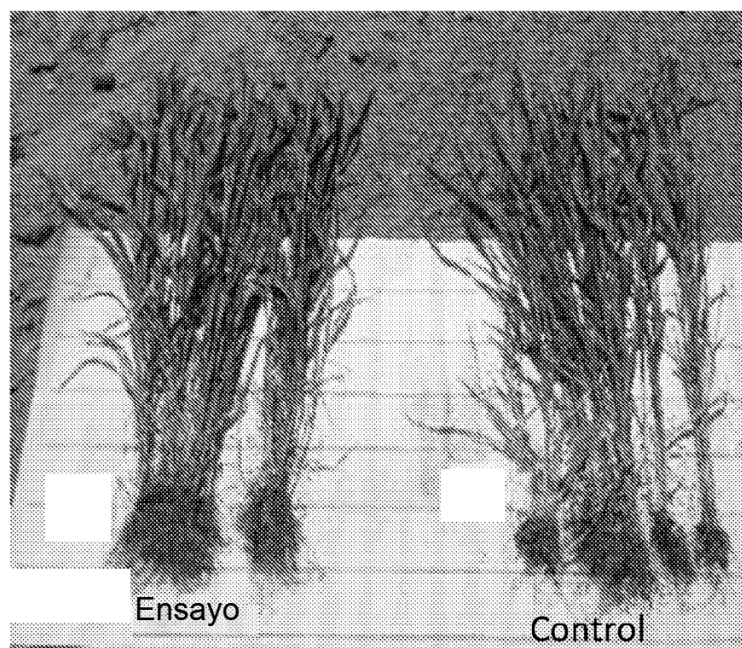


FIG. 7A

Datos del ensayo de tomate 1 (California)

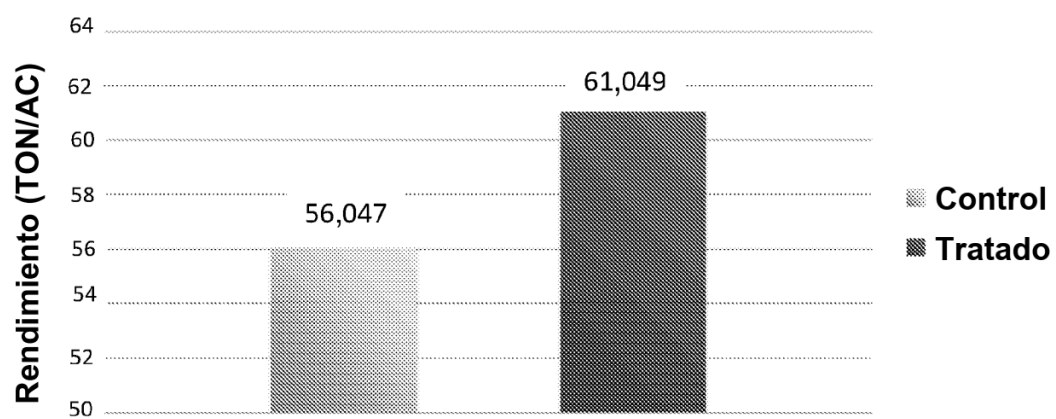


FIG. 7B
Datos del ensayo de tomate 2 (California)

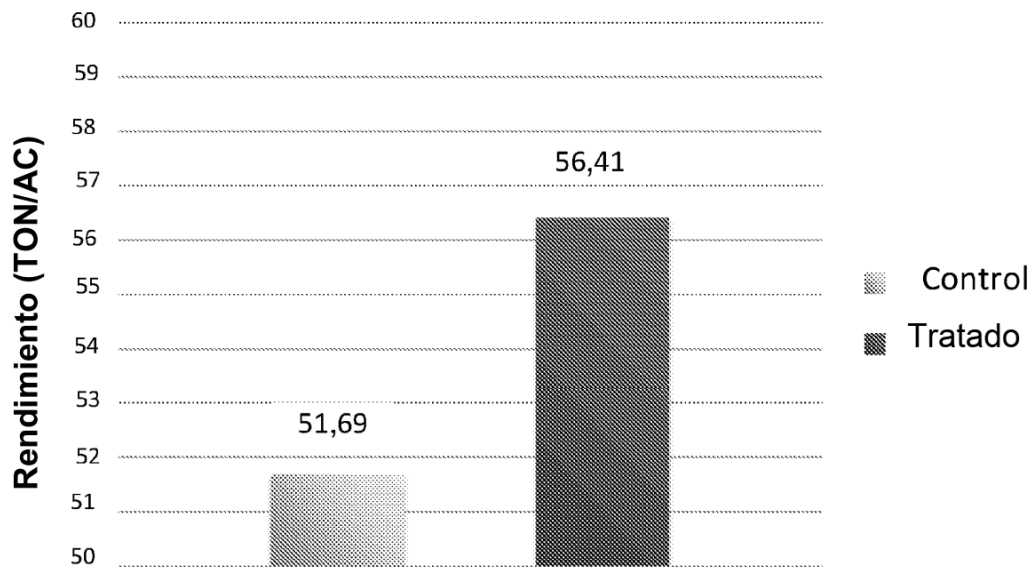


FIG. 7C
Datos del ensayo de tomate 3 (California)

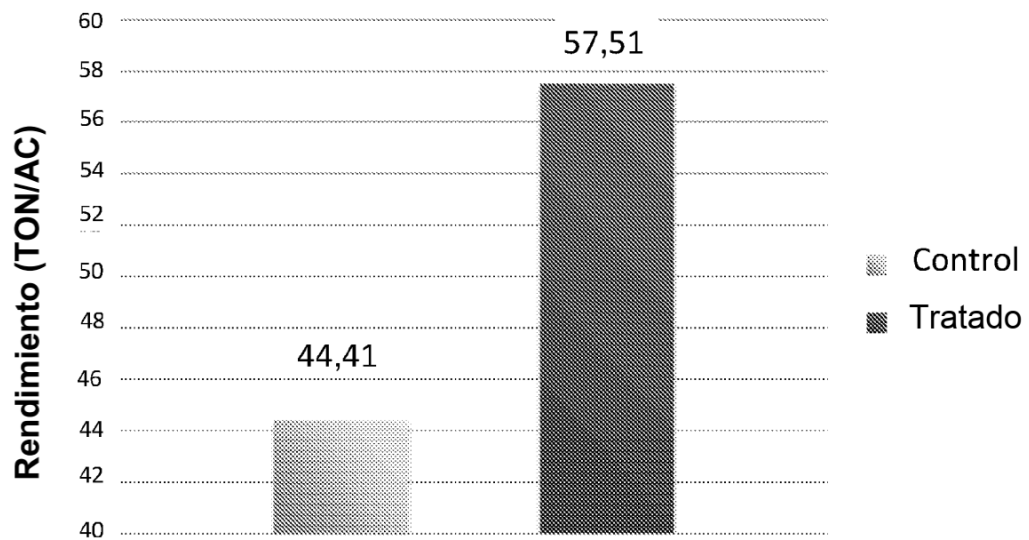


FIG. 7D

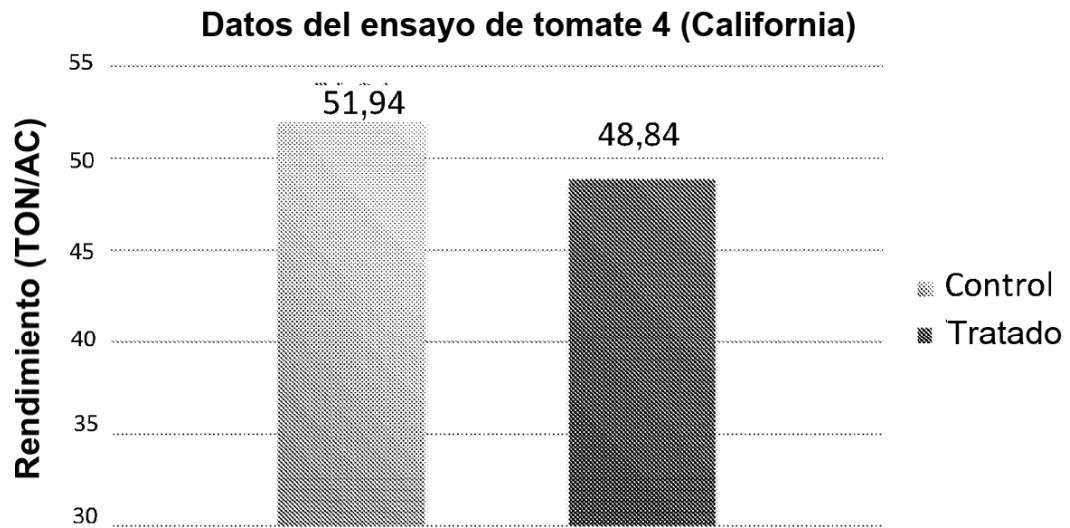


FIG. 7E

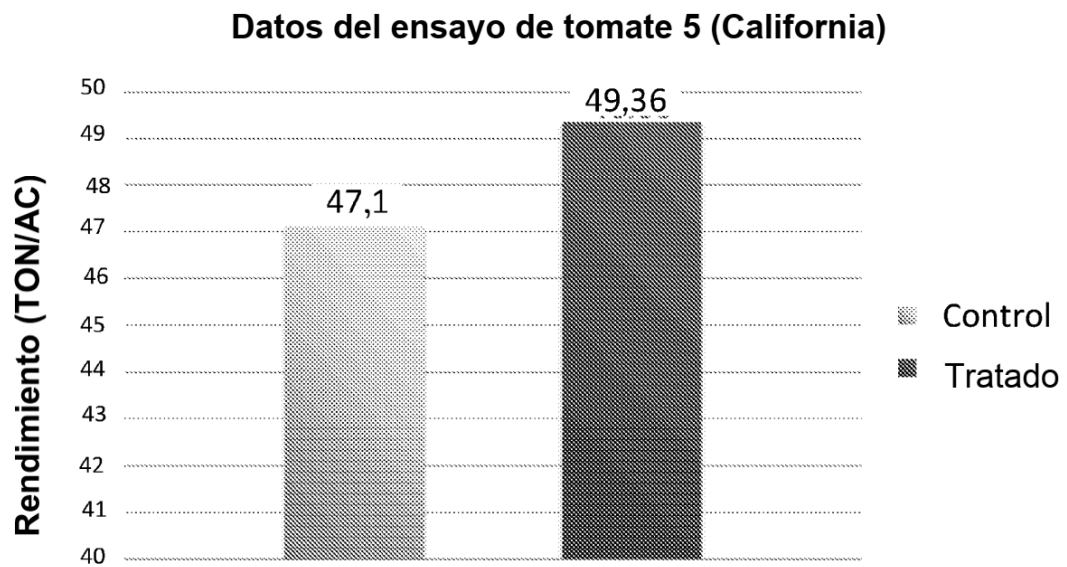


FIG. 8

Datos de ensayo de girasol (California)

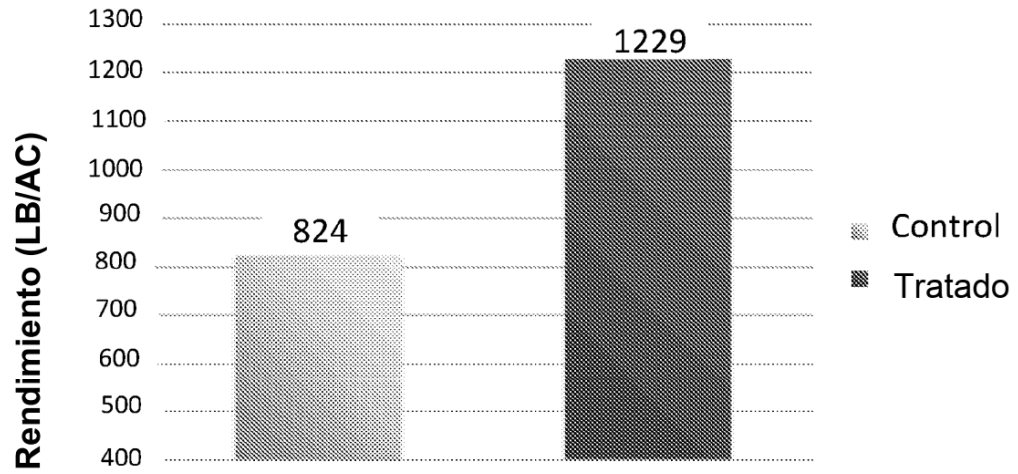


FIG. 9

Datos de ensayo del arroz (California)

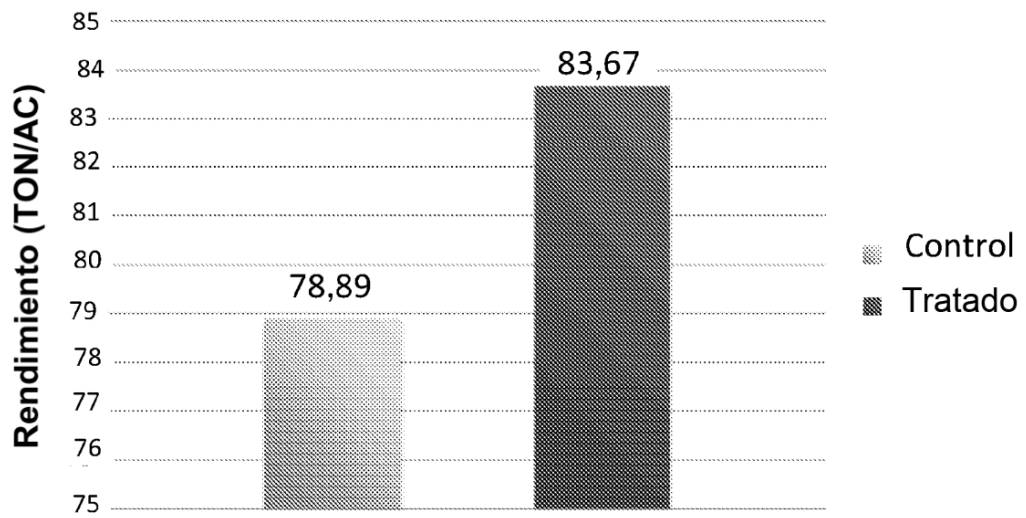


FIG. 10A

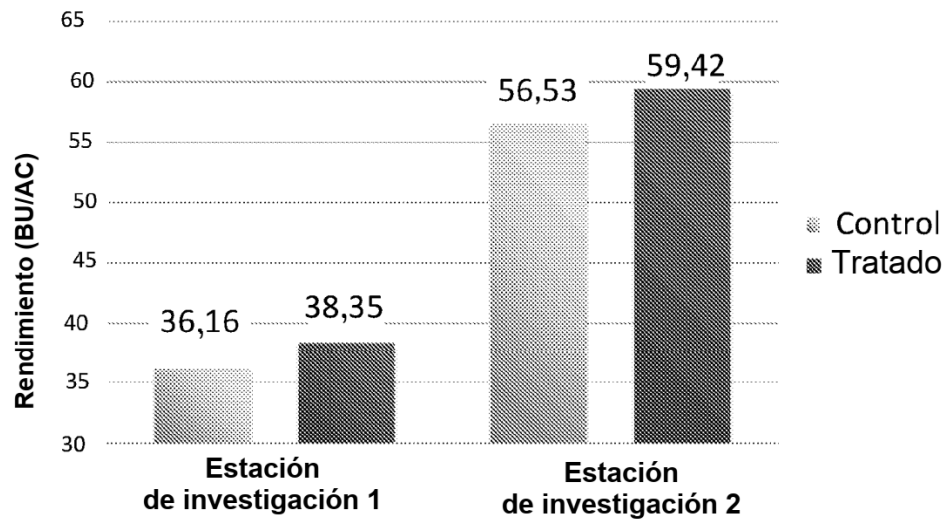


FIG. 10B

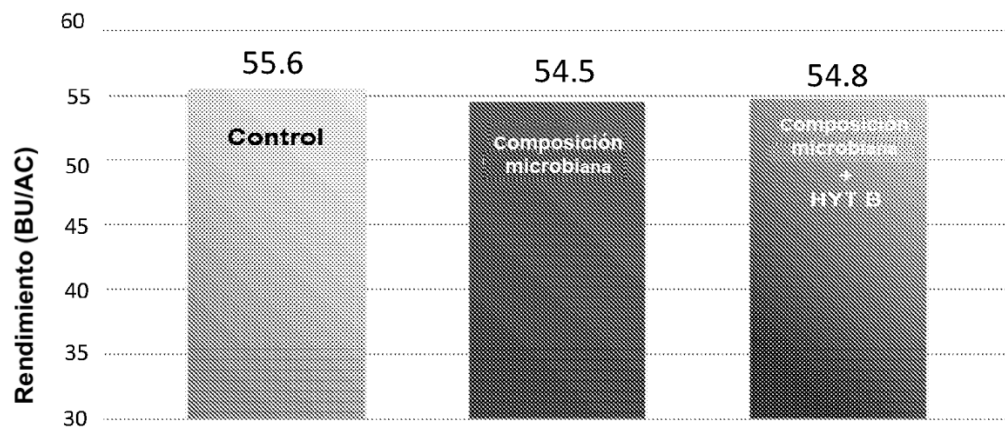


FIG. 11

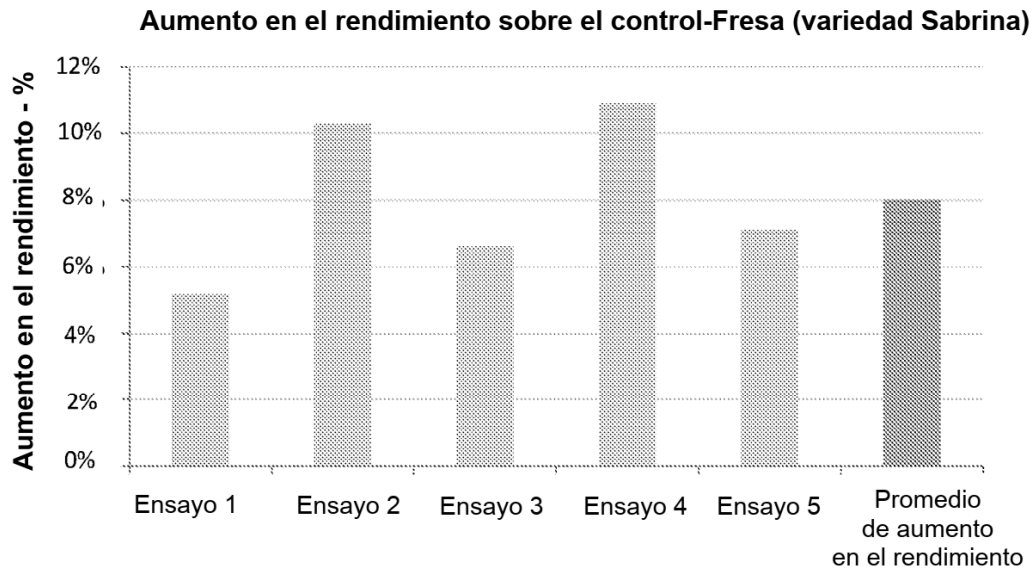


FIG. 12

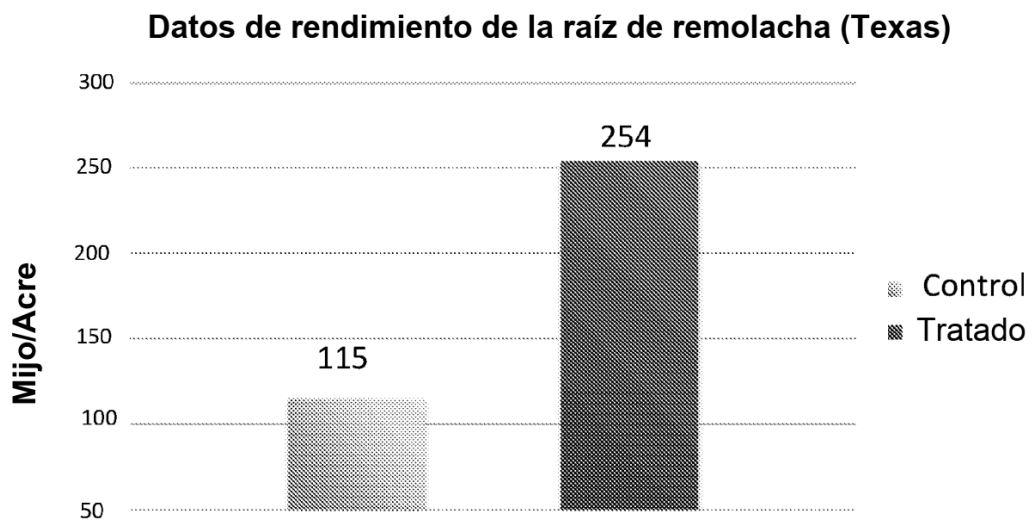


FIG. 13A

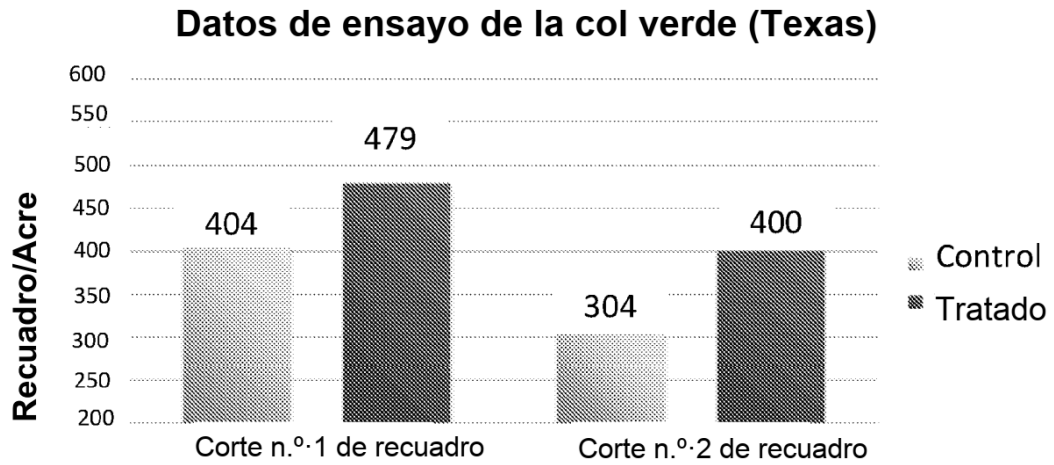
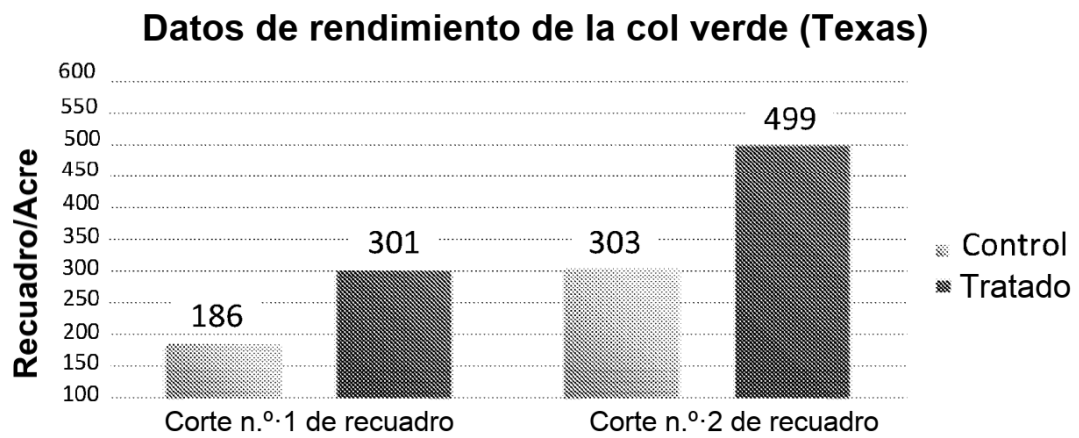


FIG. 13B



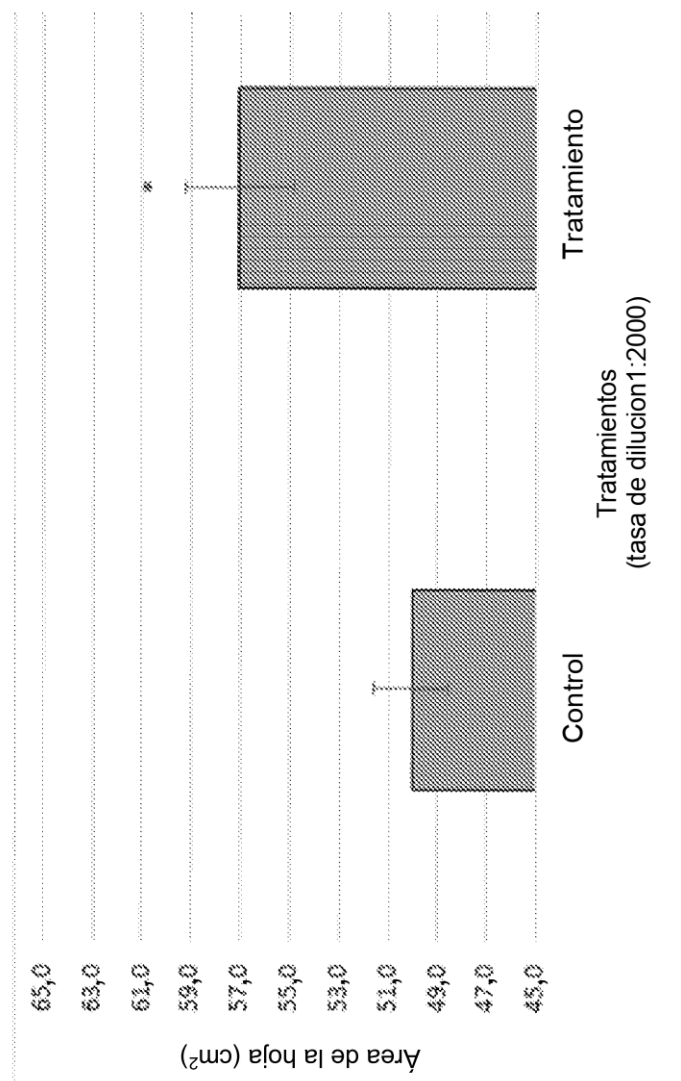


FIG. 14