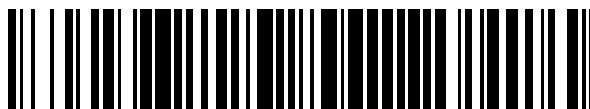


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 827**

51 Int. Cl.:

A01N 43/16 (2006.01)
A01N 37/44 (2006.01)
A01N 63/00 (2010.01)
A01N 63/04 (2006.01)
C05G 3/00 (2010.01)
C05D 3/00 (2006.01)
C05F 11/08 (2006.01)
C05G 3/02 (2006.01)
A01P 15/00 (2006.01)
A01P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2012 PCT/EP2012/062240**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12175739**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2012 E 12730912 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 2723172**

54 Título: **Composición que comprende quitosano, glucosamina y aminoácidos para uso agrícola**

30 Prioridad:

23.06.2011 US 201161500543 P

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

06.11.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

LÓPEZ-CERVANTES, JAIME

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 791 827 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

Composición que comprende quitosano, glucosamina y aminoácidos para uso agrícola

- 5 La presente solicitud reclama prioridad sobre la solicitud provisional de EE.UU. N.º de serie 61/500,543 presentada el 23 de junio de 2011.

Campo técnico

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

Antecedentes de la invención

- 15 Los microbios se han utilizado anteriormente en la agricultura. Los ejemplos incluyen los desvelados en las patentes de Estados Unidos 4.952.229; 6,232,270 y 5, 266, 096.

La quitina también se ha utilizado en la agricultura, ya sea como un complejo de proteínas (patente de Estados Unidos 4.536.207) o en combinación con varios microbios (patentes de Estados Unidos 6.524.998 y 6,060,429)

- 20 El quitosano en combinación con otros componentes se ha utilizado en aplicaciones agrícolas. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 6.649.566; 4.812.159; 6, 407, 040; 5.374.627 y 5.733.851. También se ha utilizado para tratar semillas de cereales. Véase la patente de Estados Unidos 4.978.381. La patente de Estados Unidos 6.524.998 también describe que el quitosano se puede usar en combinación con microbios específicos para uso agrícola. El documento KR2005117990A informa sobre un material de cultivo ecológico que comprende quitosano para facilitar el crecimiento de plantas, prevenir el crecimiento de bacterias fitopatógenas, reducir la cantidad consumida de productos químicos agrícolas y aumentar el rendimiento de las plantas en los cultivos. El documento JP2003160420A informa del uso de una solución de un quitosano oligomérico para tratar la enfermedad del marchitamiento del pino. El documento US4964894 informa de una composición reguladora del crecimiento de las plantas que comprende quitosano y un ácido no fitotóxico. El documento WO89/01288 informa del tratamiento de semillas de cultivos de cereales con quitosano para mejorar el rendimiento, el crecimiento de la raíz y la fuerza del tallo. López-Cervantes et al (2006) J. Chromatogr A. 1105 (1-2) 106-110 informa del análisis de aminoácidos libres en residuos de gambas fermentadas mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

- 35 HYTb solo y en combinación con HYTc y la composición microbiana HYTa son útiles en el tratamiento del suelo, semillas, plántulas y follaje como se desvela en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 61/355,447 presentada el 16 de junio de 2010 titulada Microbial Process and Composition for Agricultural Use y la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 13/160,333 presentada el 14 de junio de 2011 titulada Microbial Process and Composition.

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

Sumario de la invención

- 45 La invención proporciona composiciones que comprenden HYTd y procesos como se expone en las reivindicaciones. Se desvelan composiciones que comprenden quitosano, glucosamina y aminoácidos, en las que la concentración de quitosano es mayor que 1,5 % en peso y de glucosamina es mayor que 1,5 % en peso. En la divulgación preferente en el presente documento, la concentración de quitosano es del 2 al 2,5 % en peso y la glucosamina es del 2 al 6 % en peso. La composición también puede incluir quitina sólida, pero generalmente no más de aproximadamente 2 % en peso

La composición también puede incluir oligoelementos, proteínas y otros polisacáridos.

- 55 La composición es generalmente un líquido pero puede ser un sólido. En la mayoría de las divulgaciones en el presente documento, el sólido se puede reconstituir con agua antes de su uso.

- 60 En la divulgación preferente en el presente documento, la composición comprende HYTd y al menos uno de, HYTa, HYTb y HYTc. En aún otra divulgación en el presente documento, la composición comprende HYTd y dos o más de, HYTa, HYTb y HYTc. La composición también puede comprender HYTd, HYTa, HYTb y HYTc.

En los procesos desvelados, el suelo, semillas, las plántulas o el follaje de las plantas se ponen en contacto con HYTd o cualquiera de las composiciones anteriores.

- 65 También se desvela la composición de suelo tratada que comprende suelo tratado con HYTd o cualquiera de las composiciones anteriores.

También se desvela la planta tratada que comprende planta tratada con HYTd o la composición de cualquiera de las composiciones anteriores.

- 5 También se desvela una semilla o plántula tratada que comprende semilla o plántula tratada con HYTd o cualquiera de las composiciones anteriores.

Breve descripción de los dibujos

- 10 La figura 1 muestra los resultados del tratamiento de espárragos con HYTa + HYTb.
- La figura 2 muestra los resultados del tratamiento de espárragos con HYTa + HYTb + HYTd.
- 15 La figura 3 es un gráfico que muestra el número de piezas y la distribución del tamaño de las patatas tratadas con HYTa en comparación con el control.
- La figura 4 es un gráfico que muestra el número de piezas y la distribución de la masas de las patatas tratadas con HYTa en comparación con el control.
- 20 La figura 5 contiene fotografías que comparan las patatas obtenidas después del tratamiento con HYTa en comparación con el control.
- La figura 6 es un gráfico que muestra el número de piezas y la distribución del tamaño de las patatas tratadas con HYTa en comparación con el control.
- 25 La figura 7 es un gráfico que muestra el número de piezas y la distribución de la masa de las patatas tratadas con HYTa, HYTc, HYTc y HYTd en comparación con HYTa.
- La figura 8 contiene fotografías que comparan las patatas obtenidas después del tratamiento con HYTa, HYTc, HYTc y HYTd en comparación con HYTa.
- 30 La figura 9 es un gráfico que muestra el número de piezas y la distribución del tamaño de las patatas tratadas con HYTa, HYTc, HYTc e HYTd en comparación con metam-sodio.
- 35 La figura 10 es un gráfico que muestra el número de piezas y la distribución de la masa de las patatas tratadas con HYTa, HYTc, HYTc e HYTd en comparación con metam-sodio.
- La figura 11 contiene fotografías que comparan las patatas obtenidas después del tratamiento con HYTa, HYTc, HYTc e HYTd en comparación con metam-sodio.
- 40 La figura 12 es un diagrama de flujo que muestra la digestión de los crustáceos para formar HYTb e HYTc. El HYTc y el HYTb se procesan posteriormente con HQE para formar HYTd, una solución con cantidades relativamente altas de quitosano y glucosamina en comparación con HYTb.
- 45 La figura 13 es un diagrama de flujo que muestra la digestión de hongos, incluyendo hongos filamentosos, levaduras y/o insectos para formar HYTb y HYTc. El HYTc y el HYTb se procesan opcionalmente además con HQE para formar HYTd, una solución con cantidades relativamente altas de quitosano y glucosamina en comparación con HYTb.

50 Descripción detallada

- Se desvelan composiciones que comprenden quitosano, glucosamina y aminoácidos, en las que la concentración de dicho quitosano es superior al 1,5 % en peso, de dicha glucosamina es superior al 1,5 % en peso. En la divulgación preferente en el presente documento, la concentración de quitosano es del 2 al 2,5 % en peso y la glucosamina es
- 55 del 2 al 6 % en peso. La composición también puede incluir quitina sólida, pero, generalmente, no más de aproximadamente 2 % en peso. La composición también puede incluir oligoelementos, proteínas y otros polisacáridos. La composición es generalmente un líquido pero puede ser un sólido. En la mayoría de las divulgaciones en el presente documento, el sólido se puede reconstituir con agua antes de su uso. De acuerdo con la reivindicación 1, la composición comprende HYTd. En otra divulgación en el presente documento, la composición
- 60 comprende HYTd y al menos uno de, HYTa, HYTb y HYTc. En aún otra divulgación en el presente documento, la composición comprende HYTd y dos o más de, HYTa, HYTb y HYTc. La composición también puede comprender HYTd, HYTa, HYTb y HYTc. En los procesos desvelados, el suelo, semillas, las plántulas o el follaje de las plantas se ponen en contacto con HYTd o cualquiera de las composiciones anteriores.

65 HYTa

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

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

Tabla 1

Bacterias
I. Azotobacter
1. <i>Azotobacter vinlandii</i>
II. Clostridium
1. <i>Clostridium pasteurianum</i>
2. <i>Clostridium</i>
3. <i>Clostridium sphenoides</i>
4. <i>Clostridium bifermentans</i>
III. Lactobacillus
1. <i>Lactobacillus paracasei</i> ss. <i>paracasei</i>
2. <i>Lactobacillus acidophilus</i>
3. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ss. <i>Bulgaricus</i>
4. <i>Lactobacillus brevis</i>
IV. Bacillus
1. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (<i>Bacillus subtilis</i> ((SILoSIL® BS))
2. <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstakii</i> (<i>Bacillus thuringiensis</i> (Cepas HD-1))
3. <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>canadensis</i> (grupo de <i>Bacillus cereus</i>)
4. <i>Bacillus pasteurii</i> (grupo de <i>Bacillus cereus</i>)
5. <i>Bacillus sphaericus</i> (subgrupo I, III y IV)
6. <i>Bacillus megaterium</i> (subgrupo A)
V. Acetobacter o Gluconacetobacter
1. <i>Acetobacter aceti</i> ss. <i>licuefaciens</i>
2. <i>Acetobacter aceti</i> ss. <i>xylimum</i>
VI. Enterococcus
1. <i>Enterococcus faecium</i> (subgrupo A)
VII. Pediococcus
1. <i>Pediococcus pentosaceus</i>
VIII. Rhizobium
1. <i>Rhizobium japonicum</i>
Hongos
I. Saccharomyces
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
II. Penicillium
1. <i>Penicillium roqueforti</i>
III. Monascus
1. <i>Monascus ruber</i>
IV. Aspergillus
1. <i>Aspergillus oryzae</i>
V. Trichoderma
1. <i>Trichoderma harzianum</i> (TRICHOSIL)
Plantae
I. Arthrospira
1. <i>Arthrospira platensis</i>
II. Ascophyllum
1. <i>Ascophyllum nodosum</i>

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

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

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

La fijación de nitrógeno puede producirse de manera no simbiótica por las bacterias *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Azotobacter vinelandii* y *Clostridium pasteurinum* están presentes en HYTa o de forma simbiótica, como ocurre en los nódulos de la raíz a través de la bacteria *Rhizobium*.

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

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

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

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

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

Bacillus thuringiensis (cepas HD-1 y HD-2 (SILoSIL® BT)) son bacterias grampositivas facultativas anaerobias, en forma de flagelos peritricos. Las cepas HD-1 y HD-73 sintetizan cristales con diversas formas geométricas de actividad proteica e insecticida durante el período de esporas. Las cepas HD-1 y HD-2 secretan exoquitinasas cuando están en un medio que contiene quitina y pueden utilizarse para la degradación de los residuos de crustáceos durante la producción de quitooligosacáridos.

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

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

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

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

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

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

Composiciones microbianas

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

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

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

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

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

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

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

HYTb y HYTc

Tal y como se usa en el presente documento, el término "HYTb" se refiere a la fracción acuosa y "HYTc" se refiere a la fracción sólida obtenida de la biodegradación de artrópodos que contienen quitina, tal como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 61/289.706, archivado el 12/23/09 titulado "Biodegradation of Crustacean By-products", solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 61/299,869, presentada el 29 de enero de 2010 titulada "Biodegradation Process and Microbial Composition" y la solicitud de patente de Estados Unidos número de serie 61/355,365 presentada el 16 de junio de 2010 titulada "Biodegradation Process and Composition" y el documento PCT/EP2010/070285 presentada el 20 de diciembre de 2010 titulada "Biodegradation Process and Composition".

Brevemente, en el proceso de biodegradación de artrópodos se utiliza una composición microbiana para degradar los componentes de artrópodos o residuos del artrópodo. Es un proceso de fermentación láctica. La composición microbiana contiene microbios que producen enzimas que pueden degradar los componentes que contienen quitina del artrópodo a quitina, quitosano, N-acetil glucosamina y glucosamina. También contiene microbios que producen enzimas que pueden degradar proteínas y grasas para producir aminoácidos y lípidos.

Una composición microbiana preferida para la degradación de artrópodos se denomina HQE. HQE se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) Manassas, VA, EE.UU. el 27 de abril de 2010 y recibió la designación de depósito de patente PTA-10861.

En la divulgación preferente en el presente documento, El artrópodo marino es un crustáceo y el crustáceo preferido es el camarón. El subproducto del camarón comprende el cefalotórax y/o el exoesqueleto del camarón.

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

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

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

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

Más particularmente, el proceso incluye las siguientes etapas:

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

- i. Secado y almacenamiento del hidrolizado líquido.
- j. La pasta pigmentada (fracción lipídica) se almacena en recipientes cerrados para su conservación.

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

Activación de células microbianas

Una composición microbiana como se desvela en el presente documento se usa como inóculo. El inóculo de HQE tiene una concentración de microbios de aproximadamente 2,5 a 3,0 % (p/v). El HQE se activa por dilución al 5 % en una solución de caña de azúcar (concentración final de caña de azúcar del 3,75 %) y se incuba a 37 °C durante 5 días. Preferentemente se añade HYTb (10 ml por litro de cultivo) para proporcionar una fuente de minerales y aminoácidos de origen natural. El crecimiento celular de los microorganismos se estimó por la densidad óptica medida a 540 nm. La activación se completa a una densidad óptica de aproximadamente 1,7. La concentración de microbios después de la activación es de aproximadamente 1,9 a 3,0 % (p/v).

Preparación de muestras

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

Control de fermentación

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

Condiciones de separación

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

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

Tabla 2

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

Estos microorganismos se derivan preferentemente de HQE y se denominan *Bacillus subtilis* ((SILoSIL® BS), *Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008), *Bacillus megaterium* (Bioderpac, 2008), *Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008), *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL), *Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008), *Clostridium pasteurianum* (Bioderpac, 2008), *Bacillus*

licheniformis (Bioderpac, 2008), *Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008), cepas de *Bacillus thuringiensis* HD-1 y HD-73 (SILoSIL® BT), *Streptomyces* (Bioderpac, 2008), *Micrococcus* (Bioderpac, 2008), *Nitrobacter* (Bioderpac, 2008) y *Proteus* (Bioderpac, 2008). Cada uno de estos organismos se puede aislar fácilmente de HQE y se puede recombinar para formar la composición microbiana desvelada para degradar los artrópodos para hacer HYTb y HYTc.

HYTb

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

Tabla 3

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

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

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

HYTc

El componente principal de HYTc es la quitina. Tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2300 Dalton y constituye aproximadamente el 64 % en peso de la composición. Aproximadamente el 6 % de HYTc contiene minerales que incluyen calcio, magnesio, cinc, cobre, hierro y manganeso, aproximadamente el 24 % en peso de proteína y el 6 % de agua. Tiene una densidad específica de aproximadamente 272 Kg/m³. En algunas divulgaciones del presente documento, HYTc puede constituir un segundo componente que se combina con HYTa o se usa por separado como enmienda del suelo y/o como pulverización de follaje.

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

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

HYTd

HYTd se obtiene fermentando quitina con una composición microbiana, tal como HQE suspendida en HYTb. El proceso es similar al descrito anteriormente para la producción de HYTb e HYTc, excepto que el sustrato es quitina, por ejemplo, HYTc, en lugar de artrópodos que contienen quitina.

La figura 12 es un diagrama de flujo que muestra la digestión de los crustáceos para formar HYTb e HYTc. El HYTc y el HYTb se procesan posteriormente con HQE para formar HYTd, una solución con cantidades relativamente altas de quitosano y glucosamina en comparación con HYTb.

- 5 La figura 13 es un diagrama de flujo que muestra la digestión de hongos, incluyendo hongos filamentosos, levaduras y/o insectos para formar HYTb y HYTc. El HYTc y el HYTb se procesan adicionalmente con HQE para formar HYTd.

- 10 HYTb ya contiene quitosano (aproximadamente 0,5-1,5 % en peso) y glucosamina (aproximadamente 0,5-1,5 % en peso). La cantidad de quitosano y glucosamina en HYTd varía de aproximadamente 2 % en peso a 2,5 % en peso de quitosano y de aproximadamente 2 % en peso a 5 % en peso de glucosamina. Esto representa un aumento en la cantidad de quitosano y glucosamina en comparación con HYTb de aproximadamente 0,5 % en peso a 2,5 % en peso de quitosano y de aproximadamente 0,5 % en peso a 5 % en peso de glucosamina.

- 15 HYTd cuando no está diluido es similar a HYTb pero contiene mayores cantidades de quitosano y glucosamina. HYTd contiene aminoácidos (aproximadamente 5 a 12 % en peso) y oligoelementos (aproximadamente 6 % en peso) incluyendo calcio, magnesio, cinc, cobre, hierro y manganeso. También contiene enzimas, tales como enzimas lácticas, proteasas, lipasas, quitinasas entre otras, ácido láctico, polipéptidos y otros hidratos de carbono. En algunas divulgaciones del presente documento, el grado de acetilación del quitosano producido es del 20 % o menos, preferentemente 15 % o menos, más preferentemente del 10 % o menos, todavía más preferentemente preferente 8
- 20 % o menos y, lo más preferentemente, 5 % o menos. El contenido promedio de aminoácidos en HYTd para ciertos aminoácidos es similar al de HYTb. Véase la Tabla 3.

- 25 HYTd comprende, preferentemente, 12 % en peso de L-aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutámico serina, histidina, glicina, treonina, alanina, prolina, arginina, valina, metionina, isoleucina, triptófano, fenilalanina, lisina y treonina) y 5 % en peso de glucosamina y quitosano. HYTd también contiene, preferentemente, uno o más o todos los minerales solubles (P, Ca, Mg, Zn, Fe y Cu), enzimas y ácido láctico del proceso de digestión de quitina, así como otros polisacáridos.

- 30 Tal como se usa en el presente documento, el término "glucosamina" incluye glucosamina o una mezcla de glucosamina y N-acetil glucosamina. En la mayoría de las divulgaciones en el presente documento, HYTd contiene glucosamina y N-acetil glucosamina.

- 35 HYTd también puede contener partículas de quitina que no ha sido completamente digerida. En general, la mezcla de fermentación se filtra para eliminar partículas grandes de quitina. El filtrado generalmente no contiene más del 2 % en peso de quitina.

Activación de HYTa

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

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

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

Tabla 4

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

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

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

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

- Adicionalmente, HYTa se puede activar en presencia de aminoácidos y quitosano. Una fuente preferida de aminoácidos y quitosano es HYTb y/o HYTd. Cuando se usa HYTb y/o HYTd, la glucosamina y los otros
20 componentes de HYTb y/o HYTd también están presentes durante la activación.

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

25 **Uso de HYTa activado**

- HYTa activado se puede usar solo o en combinación con otros componentes, tales como quitina, (por ejemplo, HYTc) quitosano, glucosamina y aminoácidos (por ejemplo, HYTb y/o HYTd) para tratar el suelo, semillas, las
30 plántulas o el follaje. En algunas divulgaciones del presente documento, las combinaciones de estos componentes se pueden aplicar como una mezcla. En otra divulgación en el presente documento, se pueden aplicar por separado. En otra divulgación más en el presente documento, los componentes se pueden aplicar en diferentes momentos.

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

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

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

- 60 Cuando se usa HYTa en combinación con, por ejemplo, HYTb, HYTd y/o HYTc, además, los microbios HYTa y las plantas presentes en el suelo tratado disponen de nutrientes.

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

Tabla 5

Lts/kg/semana	W 1	W 2	W 3	W 4	W 5	W 6	W 7	W 8	W 9	W10	W11	W12	W13	W14
HYT-A	3	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
HYT-B	10	5	0	3	2	3	2	3	2	3	2	3	2	3
HYT-C	1			1				1				1		

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cuando HYTd y HYTa HYTb, y/o HYTc activados se aplican al suelo, semillas, plántulas o follaje, forman suelo tratado, semilla tratada, plántula tratada, follaje tratado y plantas tratadas. HYTd es también una composición novedosa. Por lo tanto, el suelo, semillas, la plántula, el follaje y las plantas tratadas con HYTd e HYTa, HYTb y/o HYTc también son novedosos. Dado que HYTd, HYTa, HYTb y HYTc generalmente se diluyen antes de la aplicación, el suelo, semillas, las plántulas y el follaje normalmente contendrán los componentes de HYTd, HYTa, HYTb y/o HYTc en forma diluida.

El suelo tratado con HYTa se define como el suelo que contiene uno o más microbios que son exclusivos de HYTa

disperso dentro del suelo tratado. Dichos microbios pueden detectarse genéticamente en el suelo tratado utilizando un BioChip que detecta poblaciones microbianas basadas en el ADN. Véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos 2007/0015175. Otros métodos, tales como PCR, que los expertos en la técnica también pueden usar. Los microbios en HYTa que son particularmente preferidos son *Bacillus subtilis* (SILoSIL® BS), *Bacillus thuringiensis*, cepa HD-1, *Bacillus thuringiensis*, cepa HD-73 (SILoSIL® BT) y *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL), cada una de las cuales se puede aislar del depósito de HYTa u obtener de Biotecnología Agroindustrial S.A. DE C.V., Morelia, Michoacán, México. *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL) es el más preferido, ya que es importante durante la activación de HYTa porque causa sinergias entre componentes entre los otros microbios en HYTa. La identificación de uno o más de estos microorganismos se puede combinar adicionalmente con la identificación de otros microbios en HYTa, si es necesario, para confirmar la presencia de HYTa o que HYTa estaba presente. *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL) se depositó en la ATCC el 6 de octubre de 2011 y recibió la designación de depósito de patente PTA-12152. *Bacillus subtilis* (SILoSIL® BS) se depositó en la ATCC el 7 de octubre de 2011 y recibió la designación de depósito de patente PTA-12153. Las cepas de *Bacillus thuringiensis* HD-1 y HD-73 (SILoSIL® BT) se depositaron en la ATCC el 31 de mayo de 2012 y recibieron la designación de depósito de patente PTA-12967.

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

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

Proceso para preparar HYTd

El proceso para fabricar HYTd se desvela en la solicitud de patente de Estados Unidos N.º de serie 61/500,527 presentada el 23 de junio de 2011 titulada Process for Making Chitin and Chitin Derivatives.

Brevemente, HQE, o las composiciones microbianas degradantes de quitina relacionadas, se activa y se añade a HYTb. Se añade quitina sólida y la mezcla se fermenta durante de 3 a 7 días. La quitina se puede obtener de HYTc u otras fuentes, tal como el tratamiento químico o la biodegradación de hongos que contienen quitina, hongos filamentosos, levaduras y/o insectos. HYTc es la fuente preferente de quitina. La quitina está, preferentemente, micronizada. Se puede usar quitina micronizada o la quitina residual.

Uso de HYTd

HYTd puede usarse como bioestimulante del crecimiento de las raíces y el follaje y como fungicida.

Si se usa solo como fungicida, se prefiere aplicar 20 litros por hectárea.

Si se usa para tratar plantas estresadas, se prefiere que HYTd se aplique de 3 a 10 litros por hectárea.

HYTd también se puede aplicar de 3 a 5 litros por hectárea.

HYTd se puede aplicar directamente al suelo, follaje o a ambos. HYTd se puede usar junto con otros componentes, tales como HYTb, HYTc y/o HYTa. Cuando se usa con otros componentes, HYTd se puede combinar con el componente para formar nuevas composiciones. Dichas composiciones pueden aplicarse directamente al suelo o a la planta. Como alternativa, HYTd y uno o más de HYTa, HYTb y/o HYTc se pueden aplicar por separado o en diferentes momentos.

Ejemplo 1

El siguiente protocolo se aplicó al suelo de las plantas de espárragos.

Tabla 6

Prueba	HYTa	HYTb	HYT _c	HYTd
1	0	0	0	0
2	3 litros/hectárea, después 1 litro/hectárea cada 45 días	0	0	0
3	3 litros/hectárea, después 1 litro/hectárea cada 45 días	2 litros/hectárea, después 1 litro/hectárea cada 12 días	0	0
4	3 litros/hectárea, después 1 litro/hectárea cada 45 días	5 litros/hectárea, después 2 litros/hectárea cada 12 días	0	5 litros/hectárea, después 2 litros/hectárea cada 12 días

Los resultados se muestran en las Figuras 1 y 2. Como se puede ver sin la aplicación de ningún producto HYT, se

obtiene una planta relativamente pequeña con un desarrollo pobre de la raíz. A medida que uno avanza a través de las pruebas 2, 3 y 4, es evidente que cada tratamiento da como resultado un mejor desarrollo del follaje y la raíz.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra el beneficio de tratar patatas con HYTa en comparación con un control.

El suelo contenía 1 % o menos de materia orgánica y tenía un pH entre 7,3 y 7,5. Lo siguiente se aplicó por hectárea durante el curso del ensayo:

- - 400 a 600 kg de sulfato de amonio.
- - 250 a 400 kg de 11-52-0, fósforo.
- - 300 kg de sulfato de potasio
- - 150 a 200 kg de nitrato de potasio
- - 50 a 100 kg de sulfato de magnesio
- - 25 a 50 kg de sulfato de cinc
- -HYTa-10 l

Se aplicaron dos litros de HYTa a cada hectárea de suelo con la primera aplicación de agua. En la siembra, se aplicaron 4 litros de HYTa por hectárea al suelo. Después del desarrollo del estolón, se aplicaron 2 litros de HYTa por hectárea al suelo. Cuando las patatas tenían un tamaño de aproximadamente 4 cm, se aplicaron 2 litros de HYTa por hectárea al suelo.

Los resultados se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7

	PRUEBA HYT + A		CONTROL		DIFERENCIA		% EN RELACIÓN CON EL CONTROL	
tamaño	piezas	kilos	piezas.	kilos	piezas	kilos	piezas	kilos
GIANT	0	0,00	0	0,00	0	0,00		
1st	4	1,20	1	0,30	3	0,91	300 %	307 %
2d	18	3,33	11	1,93	7	1,41	64 %	73 %
3d	21	2,74	2,5	3,37	-4	-0,63	-16 %	-19 %
4ta	71	3,24	118	5,27	-47	-2,03	-40 %	-39 %
MONO	6	0,79	7	1,30	-1	-0,51	-14 %	-39 %
TOTAL	120	11,3	162	12,1	-42	-0,86	-26 %	-7 %

Las patatas más valiosas son las patatas gigantes, seguidas por el primero, segundo y tercer tamaños. Los siguientes dos tamaños se pueden usar para patatas procesadas o semillas. Las figuras 3 y 4 presentan gráficamente los resultados de la Tabla 7. Como se puede ver, hay un aumento significativo en el número y la masa de las patatas en el primer y segundo tamaño. La figura 5 contiene fotografías que comparan las patatas obtenidas.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra el beneficio de tratar las patatas con HYTa, HYTb, HYTc e HYTd en comparación con el tratamiento con HYTa.

El suelo contenía 1 % o menos de materia orgánica y tenía un pH entre 7,3 y 7,5. Lo siguiente se aplicó por hectárea durante el curso del ensayo:

- 400 a 600 kg de sulfato de amonio.
- 250 a 400 kg de 11-52-0, fósforo.
- 300 kg de sulfato de potasio
- 150 a 200 kg de nitrato de potasio
- 50 a 100 kg de sulfato de magnesio
- 25 a 50 kg de sulfato de cinc
- HYTa-10L
- HYT-8 L
- HYTc-4 kg
- HYTd-5 L

Se aplicaron dos litros de HYTa a cada hectárea de suelo con la primera aplicación de agua. En la siembra, se aplicaron al suelo 4 litros de HYTa, 3 kilogramos de HYTc y 5 litros de HYTd por hectárea. Después del desarrollo del estolón, se aplicaron 2 litros de HYTa por hectárea al suelo. Cuando las patatas tenían un tamaño de aproximadamente 4 cm, se aplicaron 2 litros de HYTa por hectárea al suelo.

Después del comienzo de la formación de tubérculos, se aplicó 1 litro de HYTb a las hojas de la planta cada 6 a 10 días. Esto se repitió ocho veces.

Los resultados se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8

	PRUEBA HYF + A + B + C + D		CONTROL		DIFERENCIA		% EN RELACIÓN CON EL CONTROL	
	piezas	kilos	piezas	kilos	piezas	kilos	piezas	kilos
tamaño								
GIANT	4	1,54	0	0,00	4	1,54		
1st	8	2,07	1	0,30	7	1,78	700 %	602 %
2d	19	3,00	11	1,93	8	1,68	73 %	87 %
3d	32	4,04	25	3,37	7	0,68	28 %	20 %
4th	39	1,69	118	5,27	-79	-3,58	-67 %	-68 %
MONO	1	1,54	7	1,30	-6	0,24	-86 %	19 %
TOTAL	103	14,5	162	12,1	-59	2,32	-36 %	19 %

Las figuras 6 y 7 presentan gráficamente los resultados de la Tabla 8. Como se puede ver, hay un aumento significativo en el número y la masa de patatas en el tamaño gigante hasta el tercer tamaño en comparación con el tratamiento con solo HYTa. La figura 8 contiene fotografías que comparan las patatas obtenidas.

Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra el beneficio de tratar las patatas con HYTa, HYTb, HYTc e HYTd en comparación con el tratamiento con metam-sodio en un suelo infestado de hongos. Los resultados se presentan en la Tabla 9.

El suelo se trató como se describe en el Ejemplo 3. HYTa, HYTc e HYTd se aplicaron como se expone en el Ejemplo 2. Se aplicaron trescientos litros de metam-sodio por hectárea.

Tabla 9

	PRUEBA HYT + A + B + C + D		CONTROL Metam-Sodio		DIFERENCIA		% EN RELACIÓN CON EL CONTROL	
	piezas	kilos	piezas	kilos	piezas	kilos	piezas	kilos
TAMAÑO								
GIANT	4	1,54	1	0,43	3	1,11	300 %	257 %
1st	8	2,07	1	0,32	7	1,75	700 %	547 %
2d	19	3,60	35	6,46	-16	-2,86	-46 %	-44 %
3d	32	4,34	24	2,67	8	1,38	33 %	52 %
4th	39	1,69	88	3,63	-49	-1,94	-56 %	-54 %
MONO	1	1,54	6	1,47	-5	0,06	-83 %	4 %
TOTAL	103	14,5	155	15,0	-52	-0,50	-34 %	-3 %

Las figuras 9 y 10 presentan gráficamente los resultados de la Tabla 9. Como se puede ver, hay un aumento significativo en el número y la masa de patatas en el tamaño gigante, primer y tercer tamaño en comparación con el tratamiento con Metam-Sodio. La figura 11 contiene fotografías que comparan las patatas obtenidas.

El metam sodio es un fumigante del suelo utilizado como pesticida, herbicida y fungicida. Su uso es ilegal en algunos países debido a problemas medioambientales. El tratamiento con HYTa, HYTb, HYTc e HYTd pueden eliminar el uso de metam sodio en ciertas aplicaciones, reduciendo así su impacto ambiental y el coste de usar este fumigante del suelo.

Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra el efecto del tratamiento con HYTa e HYTc del pepino infestado con el nematodo *Rhabditis* y el hongo *Fusarium oxysporum*.

- 5 Se aplicaron al suelo diez litros de HYTa y 3 kilogramos de HYTc por hectárea. Este protocolo se repitió 8 días después.

Los resultados se muestran en la Tabla 10.

10

Tabla 10

	Antes			Tras 18 días		
	Población de nematodos por kg de suelo			Población de nematodos por kg de suelo		
Nematodo	Bajo <100	Medio > 100 <500	Alto > 500	Bajo <100	Medio > 100 <500	Alto > 500
<i>Rhabditis</i>			9.600			850
	Población de nematodos por kg de suelo			Población de nematodos por kg de suelo		
Hongo	Bajo < 400	Medio > 600	Alto > 700	Bajo < 400	Medio > 600	Alto > 700
<i>Fusarium oxysporum</i>			770	3		

Como se puede observar, la población de estos organismos se redujo sustancialmente 18 días después del tratamiento.

15 Ejemplo 6

Este ejemplo demuestra el efecto del tratamiento con HYTa, HYTc e HYTd de tomate infestado con el hongo *Fusarium oxysporum*.

- 20 Se aplicaron al suelo cinco litros de HYTa, 1 kilogramo de HYTc y 5 litros de HYTd por hectárea. Este tratamiento se repitió cada 15 días

Los resultados se muestran en la tabla 11

25

Tabla 11

Unidad formadora de colonias (UFC/g)	HYTa, C + D	Control
<i>Fusarium oxysporum</i>	500	1.666
<i>Rhizoctonia solani</i>	0	
<i>Phytophthora sp.</i>	0	
<i>Pythium sp</i>	0	

Como se puede ver, el tratamiento con HYTa, HYTc y HYTd redujo significativamente la unidad formadora de colonias del hongo.

30 Ejemplo 7

El follaje de la planta de tomate infestado de mildiu (el hongo *Phytophthora infestans*) se trató con HYTd. Se diluyeron dos, 4, 6 y 8 litros de HYTd en 100 litros de agua por cada hectárea. El control fue tomates sin tratar. Después de una semana, se detuvo la infestación. Mientras tanto, el hongo en el cultivo de control desarrolló un aspecto similar al algodón que dio como resultado daños en la planta y el desarrollo de necrosis (resultados no mostrados). La cantidad óptima de HYTd para el tratamiento de *Phytophthora infestans* es de 6 litros por hectárea.

35

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende HYTd, en la que dicho HYTd comprende la fracción líquida obtenida de la fermentación de HYTb e HYTc con HQE activado (designación en el depósito de patentes ATCC PTA-10861) durante 3-7 días, en donde dicho HYTb comprende la fracción líquida obtenida de la fermentación de artrópodos que contienen quitina con al menos un 10 % (v/p) de HQE activado con agitación no continua a 36 °C y pH inferior a 5 durante 96 horas, y dicho HYTc comprende la fracción sólida obtenida de la fermentación de artrópodos que contienen quitina con al menos un 10 % de HQE activado con agitación no continua a 36 °C y pH inferior a 5 durante 96 horas, y en donde el HQE activado se obtiene por dilución de un inóculo de HQE con el 2,5-3,0 % (p/v) de microbios al 5 % (v/p) en solución de caña de azúcar e incubación a 37 °C durante 5 días.
2. La composición de la reivindicación 1, que comprende además al menos uno de, HYTa, HYTb y HYTc, en la que dicho HYTa comprende una composición que comprende la designación en el depósito de patentes ATCC PTA-10973.
3. La composición de la reivindicación 1, que comprende además dos o más de, HYTa, HYTB y HYTc, en la que dicho HYTa comprende una composición que comprende la designación en el depósito de patentes ATCC PTA-10973.
4. La composición de la reivindicación 1, que comprende además HYTa, HYTB y HYTc, en la que dicho HYTa comprende una composición que comprende la designación en el depósito de patentes ATCC PTA-10973.
5. Un proceso que comprende el contacto con el suelo, la semilla, la plántula o el follaje de la planta con la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Un proceso que comprende el contacto con el suelo, la semilla, la plántulas o el follaje de la planta con HYTd, en el que dicho HYTd comprende la fracción líquida obtenida de la fermentación de HYTb e HYTc con HQE activado (designación en el depósito de patentes ATCC PTA-10861) durante 3-7 días, en donde dicho HYTb comprende la fracción líquida obtenida de la fermentación de artrópodos que contienen quitina con al menos un 10 % (v/p) de HQE activado con agitación no continua a 36 °C y pH inferior a 5 durante 96 horas, y dicho HYTc comprende la fracción sólida obtenida de la fermentación de artrópodos que contienen quitina con al menos un 10 % de HQE activado con agitación no continua a 36 °C y pH inferior a 5 durante 96 horas, y en donde el HQE activado se obtiene por dilución de un inóculo de HQE con 2,5-3,0 % (p/v) de microbios al 5 % (v/p) en solución de caña de azúcar e incubación a 37 °C durante 5 días.
7. El proceso de la reivindicación 6, que comprende además poner en contacto el suelo, la semilla, la plántulas o el follaje de la planta con al menos uno de HYTa, HYTB y HYTc, en donde dicho HYTa comprende una composición que comprende la designación en el depósito de patentes ATCC PTA-10973.
8. El proceso de la reivindicación 6, que comprende además poner en contacto el suelo, la semilla, la plántula o el follaje vegetal con dos o más de HYTa, HYTB y HYTc, en donde dicho HYTa comprende una composición que comprende la designación en el depósito de patentes ATCC PTA-10973.
9. El proceso de la reivindicación 6, que comprende además poner en contacto el suelo, la semilla, las plántulas o el follaje de la planta con HYTa, HYTB y HYTc, en donde dicho HYTa comprende una composición que comprende la designación en el depósito de patentes ATCC PTA-10973.
10. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que uno o más de HYTa, HYTb, HYTc y HYTd se usan en diferentes momentos.
11. Un proceso que comprende combinar HYTd y al menos uno de HYTa, HYTb y HYTc para formar una mezcla, en el que:
 - dicho HYTa comprende una composición que comprende la designación en el depósito de patentes ATCC PTA-10973;
 - dicho HYTb comprende la fracción líquida obtenida de la fermentación de artrópodos que contienen quitina con al menos un 10 % (v/p) de HQE activado (designación en el depósito de patentes ATCC PTA-10861) con agitación no continua a 36 °C y pH inferior a 5 durante 96 horas;
 - dicho HYTc comprende la fracción sólida obtenida de la fermentación de artrópodos que contienen quitina con al menos un 10 % de HQE activado (designación en el depósito de patentes ATCC PTA-10861) con agitación no continua a 36 °C y pH inferior a 5 durante 96 horas; y
 - dicho HYTd comprende la fracción líquida obtenida de la fermentación de HYTb e HYTc con HQE activado (designación en el depósito de patentes ATCC PTA-10861) durante 3-7 días, y en donde el HQE activado se obtiene por dilución de un inóculo de HQE con el 2,5-3,0 % (p/v) de microbios al 5 % (v/p) en solución de caña de azúcar e incubación a 37 °C durante 5 días.

12. El proceso de la reivindicación 11, que comprende además aplicar dicha mezcla al suelo, el follaje, la semilla o la plántula.

Figura 1



Control

HYTa

HYTa+HYTb

HYTa+HYTb+HYTd

Figura 2

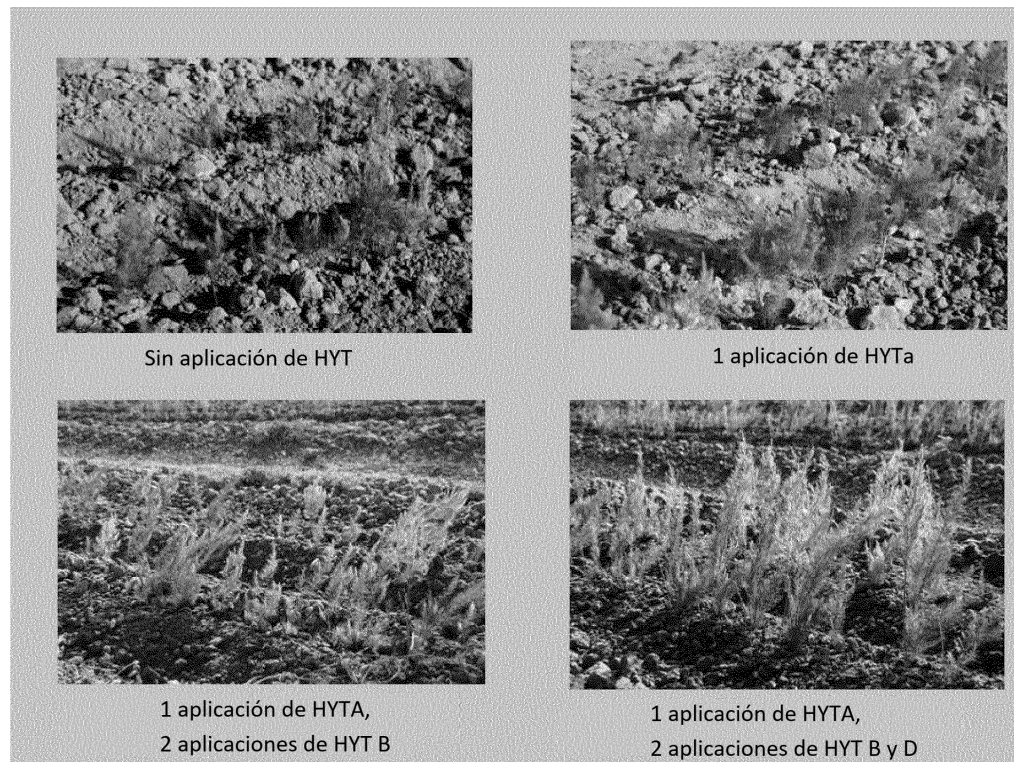


Figura 3

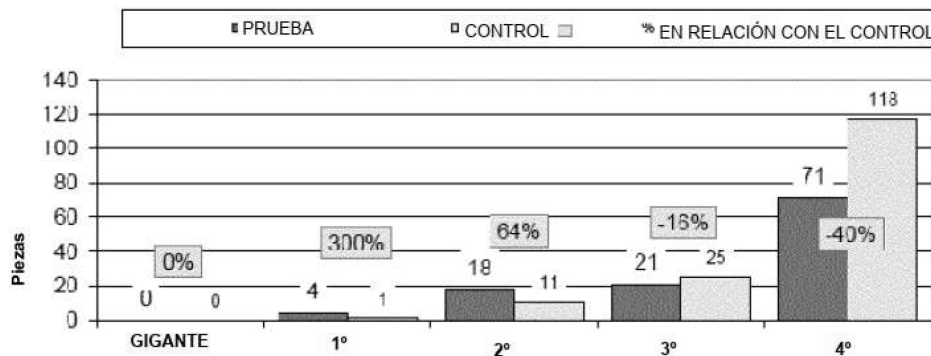


Figura 4

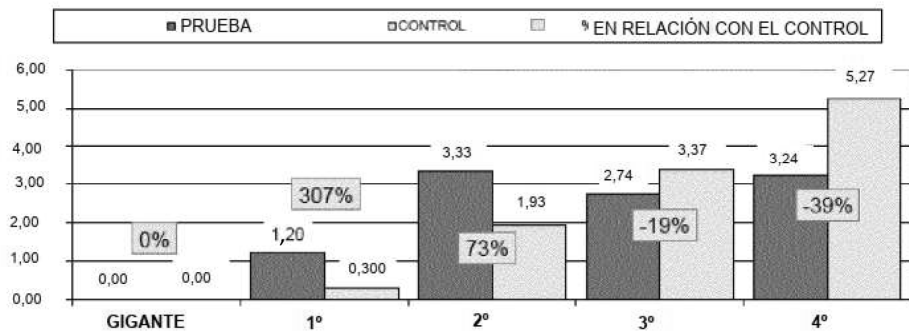


Figura 5

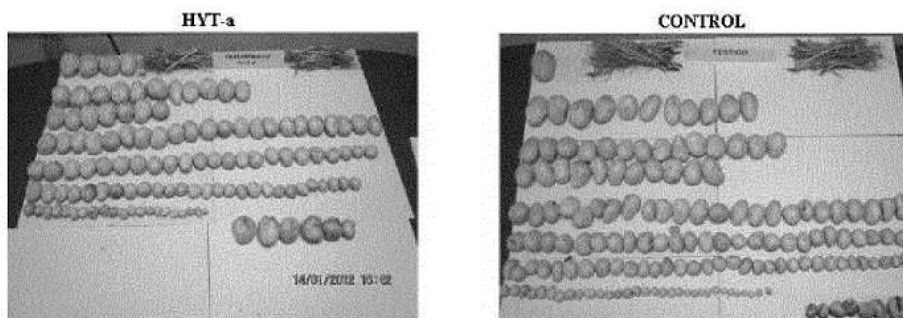


Figura 6

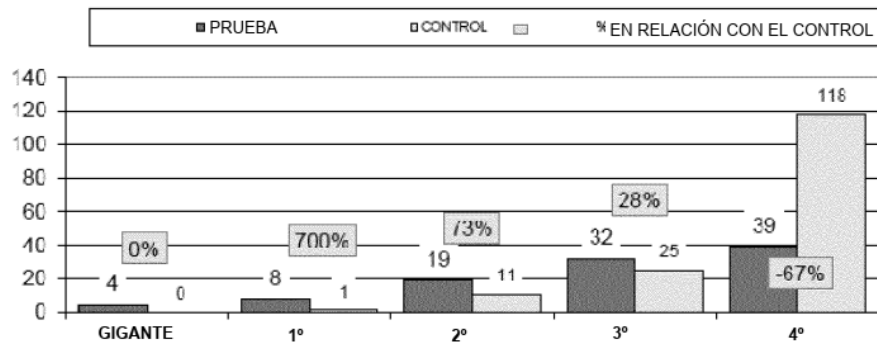


Figura 7

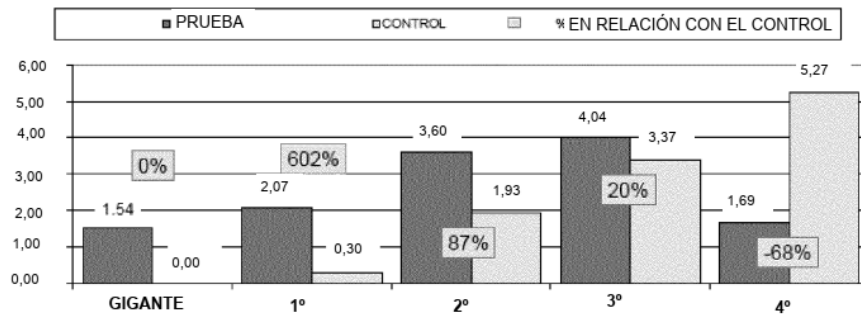


Figura 8

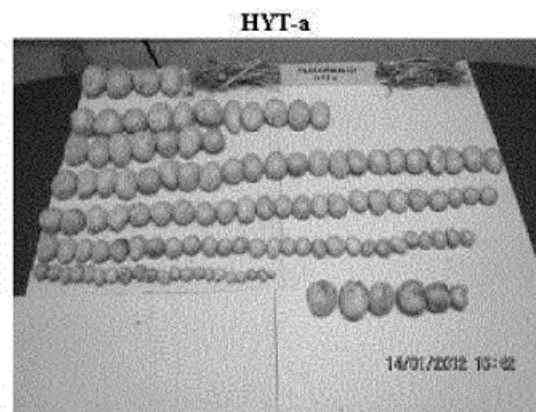
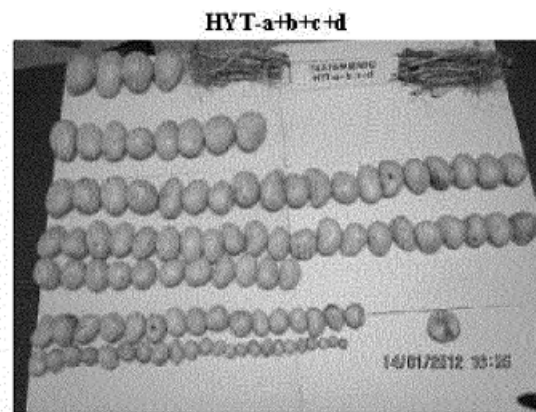


Figura 9

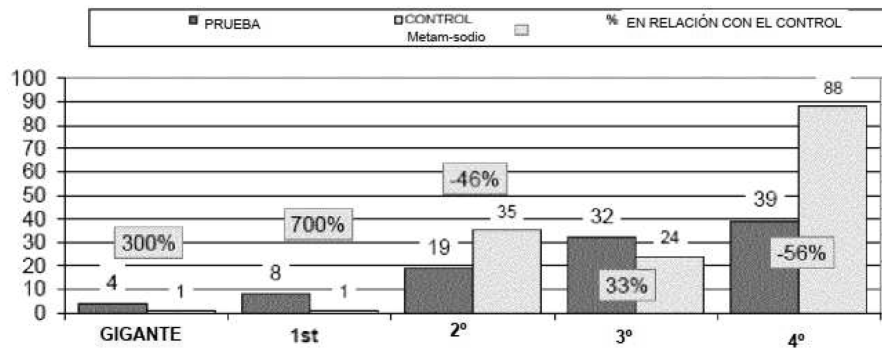


Figura 10

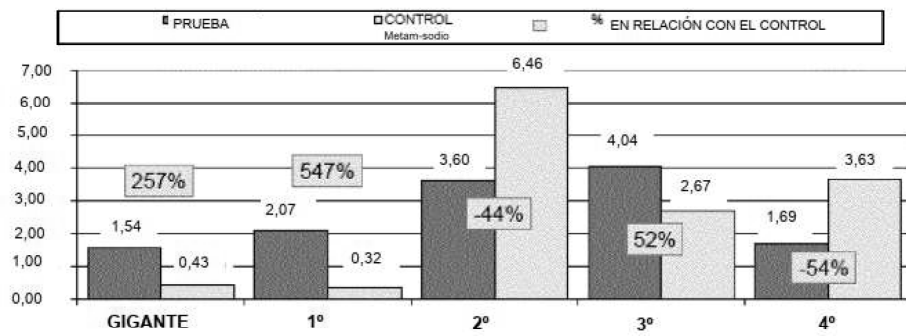


Figura 11

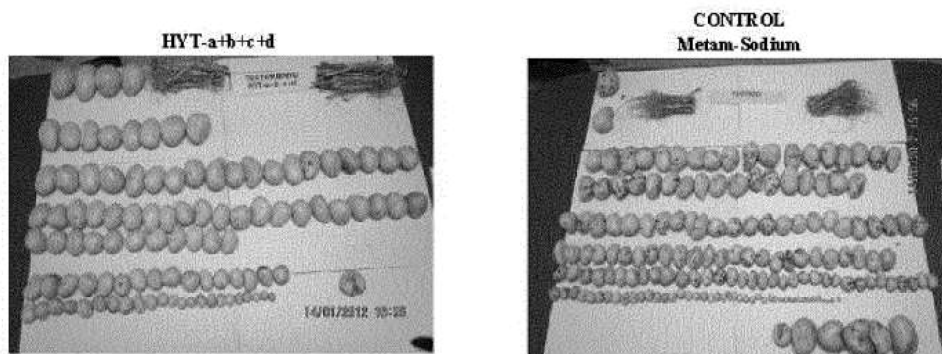


Figura 12

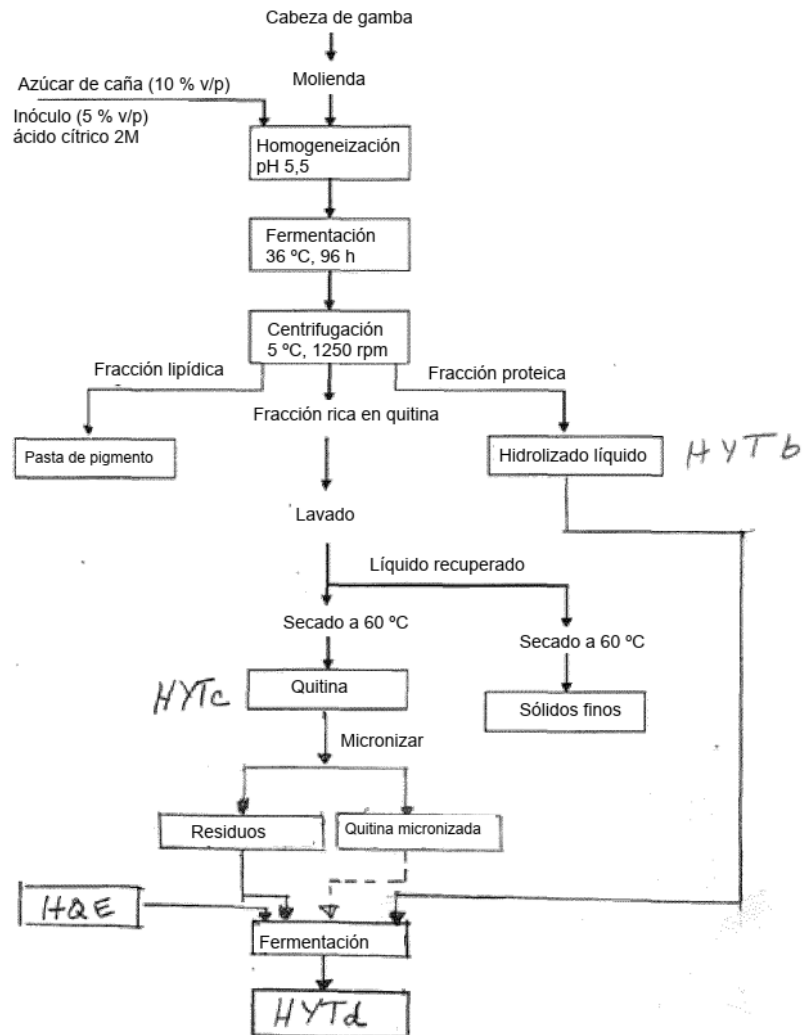


Figura 13

