



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **113736** (13) **C2**  
(51) МПК (2017.01)**A01N 37/44** (2006.01)**A01N 43/16** (2006.01)**A01N 63/02** (2006.01)

A01P 15/00

A01P 3/00

A01P 5/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2014 00577</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Лопес-Сервантес Хайме (MX)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>25.06.2012</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>АГРІНОС АС,</b> Fornebuveien 1, N-1366 Lysaker, Norway (NO)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>10.03.2017</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Ошарова Ірина Олександрівна, реєстр. №9</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>61/500,543</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 89/01288 A1, 23.02.1989 US 4964894 A, 23.10.1990 KR 2005117990 A, 15.12.2005 JP 2003160420 A, 03.06.2003 LOPEZ-CERVANTES J ET AL: Analysis of free amino acids in fermented shrimp waste by high-performance liquid chromatography // JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V, NL, vol. 1105, no. 1-2, 10.-2006, Pages 106-110
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>23.06.2011</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>25.07.2014, Бюл.№ 14</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.03.2017, Бюл.№ 5</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>РСТ/EP2012/062240, 25.06.2012</b>	

**(54) КОМПОЗИЦІЯ, ЯКА МІСТИТЬ ХІТОЗАН, ГЛЮКОЗАМІН ТА АМІНОКИСЛОТИ, ДЛЯ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОГО ЗАСТОСУВАННЯ****(57) Реферат:**

Винахід належить до процесів та композицій, які підвищують урожайність сільськогосподарських культур, підсилюють захисні процеси у рослинах, знижують рівень патогенів рослин і знижують кількість добрив, що використовуються. Заявлено композицію, яка містить НУТd, причому зазначений НУТd містить рідку фракцію, отриману в результаті ферментації НУТb і НУТс з використанням НQE (патентне позначення депозиту ATCC PTA-10861), причому зазначений НУТb містить рідку фракцію, отриману в результаті ферментації хітиновмісних членистоногих з використанням НQE, а зазначений НУТс містить тверду фракцію, отриману в результаті ферментації хітиновмісних членистоногих з використанням НQE. Також заявлено спосіб обробки ґрунту, насіння, саджанців або листя рослин за допомогою композицій, що містять НУТа, НУТb, НУТс та НУТd.

UA 113736 C2



[0001] Дана заявка претендує на пріоритет за попередньою заявкою США № 61/500543, яка була подана 23 червня 2011 р.

Галузь техніки

[0002] У даній заявці описуються процеси та композиції, які підвищують урожайність сільськогосподарських культур, підсилюють захисні процеси у рослинах, знижують рівень патогенів рослин, і знижують кількість добрив, що використовуються.

Рівень техніки

[0003] Мікроорганізми застосовували в сільському господарстві й раніше. Приклади включають мікроорганізми, описані в патентах США 4,952,229; 6,232,270 і 5,266,096.

[0004] Хітин також застосовують у сільському господарстві у вигляді білкового комплексу (патент США 4,536,207) або в комбінації з різними мікроорганізмами (патенти США 6,524,998 і 6,060,429)

[0005] Хітозан застосовують у сільському господарстві в комбінації з іншими компонентами. Див., наприклад, патенти США № 6,649,566; 4,812,159; 6,407,040; 5,374,627 і 5,733,851. Його також застосовують для обробки насіння зернових культур. Див., наприклад, патент США 4,978,381. Крім того, у патенті США 6,524,998 описано, що хітозан можна застосовувати в комбінації зі специфічними мікроорганізмами в сільському господарстві.

[0006] НУТb сам по собі або в комбінації з НУТc і мікробіологічною композицією НУТа можна застосовувати для обробки ґрунту, насіння, саджанців і листя, як описано в заявці на патент США № 61/355447, яка була подана 16 червня 2010 р. під назвою Мікробіологічний спосіб і композиція для сільськогосподарського застосування, і заявці на патент США № 13/160333, яка була подана 14 червня 2011 р. під назвою Мікробіологічний спосіб і композиція, кожна з яких повністю включена в дану заявку за допомогою посилання.

[0007] Не дивлячись на вищевикладене, існує потреба в забезпеченні поліпшених композицій і способів, що підвищують урожай культур і знижують кількість традиційних фунгіцидів та інсектицидів, які застосовуються у сільському господарстві та садівництві.

Суть винаходу

[0008] Дана заявка описує композиції, які містять хітозан, глюкозамін і амінокислоти, причому концентрація хітозану в зазначених композиціях становить більше 1,5 мас.%, а глюкозаміну - більше 1,5 мас.%. У переважних варіантах реалізації концентрація хітозану становить від 2 до 2,5 мас.%, а глюкозаміну - від 2 до 6 мас.%. Композиція також може містити твердий хітин, але зазвичай в кількості не більше 2 мас.%.

[0009] Композиція також може містити мікроелементи, білок та інші полісахариди.

[0010] У загальному випадку композиція є рідкою, але може бути твердою. У більшості варіантів реалізації тверду речовину можна розчинити у воді перед застосуванням.

[0011] У переважних варіантах реалізації композиція містить НУТd і, щонайменше, один з НУТа, НУТb і НУТc. В інших варіантах реалізації композиція містить НУТd і два або більше з НУТа, НУТb і НУТc. Композиція також може містити НУТd, НУТа, НУТb і НУТc.

[0012] У способах, що описуються, ґрунт, насіння, саджанці або листя рослин взаємодіють з НУТd або будь-якою з вищезазначених композицій.

[0013] Крім того, описана оброблена ґрунтова композиція, що містить ґрунт, оброблений НУТd або будь-якою з вищезазначених композицій.

[0014] Крім того, описана оброблена рослина, що включає рослину, оброблену НУТd або будь-якою з вищезазначених композицій.

[0015] Крім того, описано оброблене насіння або саджанець, що включають насіння або саджанець, оброблені НУТd або будь-якою з вищезазначених композицій.

Короткий опис креслень

[0016] На Фігурі 1 показані результати обробки спаржі НУТа + НУТb.

[0017] На Фігурі 2 показані результати обробки спаржі НУТа + НУТb + НУТd.

[0018] Фігура 3 являє собою графік, на якому показана кількість бульб і розподіл за розміром картоплі, обробленої НУТа, у порівнянні з контролем.

[0019] Фігура 4 являє собою графік, на якому показана кількість бульб і розподіл за масою картоплі, обробленої НУТа, у порівнянні з контролем.

[0020] Фігура 5 містить фотографії, що порівнюють картоплю, отриману після обробки НУТа, з контролем.

[0021] Фігура 6 являє собою графік, на якому показана кількість бульб і розподіл за розміром картоплі, обробленої НУТа, у порівнянні з контролем.

[0022] Фігура 7 являє собою графік, на якому показана кількість бульб і розподіл за масою картоплі, обробленої НУТа, НУТc, НУТс і НУТd, у порівнянні з картоплею, обробленою НУТа.

[0023] Фігура 8 містить фотографії, що порівнюють картоплю, отриману після обробки НУТа,

НУТс, НУТс і НУТd, з картоплею, отриманою після обробки НУТа.

[0024] Фігура 9 являє собою графік, на якому показана кількість бульб і розподіл за розміром картоплі, обробленої НУТа, НУТс, НУТс і НУТd, у порівнянні з картоплею, обробленою метам-натрієм.

5 [0025] Фігура 10 являє собою графік, на якому показана кількість бульб і розподіл за масою картоплі, обробленої НУТа, НУТс, НУТс і НУТd, у порівнянні з картоплею, обробленою метам-натрієм.

[0026] Фігура 11 містить фотографії, що порівнюють картоплю, отриману після обробки НУТа, НУТс, НУТс and НУТd, з картоплею, обробленою метам-натрієм.

10 [0027] Фігура 12 являє собою блок-схему, що ілюструє розкладання ракоподібних для утворення НУТb і НУТс. Потім НУТс і НУТb обробляють НQE з утворенням НУТd, розчину з відносно високою кількістю хітозану та глюкозаміну в порівнянні з НУТb.

15 [0028] Фігура 13 являє собою блок-схему, що ілюструє розкладання грибів, у тому числі міцеліальних грибів, дріжджів та/або комах для утворення НУТb і НУТс. Потім НУТс і НУТb необов'язково обробляють НQE з утворенням НУТd, розчину з відносно високою кількістю хітозану та глюкозаміну в порівнянні з НУТb.

#### Докладний опис

Дана заявка описує композиції, які містять хітозан, глюкозамін і амінокислоти, причому концентрація зазначеного хітозану становить більше 1,5 мас.%, а зазначеного глюкозаміну -  
 20 більше 1,5 мас.%. У переважних варіантах реалізації концентрація хітозану становить від 2 до 2,5 мас.%, а глюкозаміну - від 2 до 6 мас.%. Композиція також може містити твердий хітин, але зазвичай в кількості не більше 2 мас.%. Композиція також може містити мікроелементи, білок та інші полісахариди. У загальному випадку композиція є рідкою, але може бути твердою. У  
 25 більшості варіантів реалізації тверду речовину можна розчинити у воді перед застосуванням. У переважних варіантах реалізації композиція містить НУТd. В інших варіантах реалізації композиція містить НУТd і, щонайменше, один з НУТа, НУТb і НУТс. В інших варіантах реалізації композиція містить НУТd і два або більше з НУТа, НУТb і НУТс. Композиція також може містити НУТd, НУТа, НУТb і НУТс. В описуваних способах ґрунт, насіння, саджанці або  
 листя рослин взаємодіють з НУТd або будь-якою з вищезазначених композицій.

30 НУТа

[0029] У даному описі термін "НУТа" відноситься до консорціуму мікроорганізмів, отриманих зі зразків родючого ґрунту та комерційних джерел. НУТа депонований в Американській колекції типових культур (ATCC), Роквілл, штат Меріленд, США, 19 травня 2010 р. з привласненим позначенням депозиту РТА-10973.

35 [0030] У Таблиці 1 визначені деякі з мікроорганізмів у складі НУТа, які, як вважається, відповідають за сприятливу дію, яка спостерігається при його застосуванні для обробки ґрунту та/або листя.

Таблиця 1

#### Бактерії

##### I. *Azotobacter*

1. *Azotobacter vinlandii*

##### II. *Clostridium*

1. *Clostridium pasteurianum*

2. *Clostridium beijerinckii*

3. *Clostridium sphenoides*

4. *Clostridium bifermentans*

##### III. *Lactobacillus*

1. *Lactobacillus paracasei* ss. *paracasei*

2. *Lactobacillus acidophilus*

3. *Lactobacillus delbrueckii* ss. *Bulgaricus*

4. *Lactobacillus brevis*

##### IV. *Bacillus*

1. *Bacillus amyloliquefaciens* (*Bacillus subtilis* ((Silosil® BS)))

2. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstakii* (*Bacillus thuringiensis* (Strains HD-1))

3. *Bacillus thuringiensis* var. *canadensis* (*Bacillus cereus* group)

4. *Bacillus pasteurii* (*Bacillus cereus* group)

5. *Bacillus sphaericus* (subgroup I, III, and IV)

6. *Bacillus megaterium* (subgroup A)

V. *Acetobacter* or *Gluconacetobacter*

Таблиця 1

1. *Acetobacter aceti* ss. *liquefaciens*
2. *Acetobacter aceti* ss. *xylinum*
- VI. *Enterococcus*
1. *Enterococcus faecium* (subgroup A)
- VII. *Pediococcus*
1. *Pediococcus pentosaceus*
- VII. *Rhizobium*
1. *Rhizobium japonicum*
- Гриби
- I. *Saccharomyces*
1. *Saccharomyces cerevisiae*
- II. *Penicillium*
1. *Penicillium roqueforti*
- III. *Monascus*
1. *Monascus ruber*
- IV. *Aspergillus*
1. *Aspergillus oryzae*
- V. *Trichoderma*
1. *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL)
- Рослини
- I. *Arthrospiro*
1. *Arthrospira platensis*
- II. *Ascomyllum*
1. *Ascomyllum nodosum*

[0031] Інші мікроорганізми, що містяться в НУТа: *Nitrobacter*, *Nitrosomonads*, *Nitrococcus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus luteus*, *Actinomycete*, *Azotobacter vinelandii*, *Lactobacillus casei*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas fluorescens* і *Streptomyces*.

- 5 [0032] Активні мікроорганізми в складі НУТа включають азотофіксатори, що зустрічаються в ґрунті в природних умовах. Зазначені азотофіксатори являють собою *Azotobacter vinelandii* і *Clostridium pasteurianum*. *Bacillus subtilis* забезпечує ферменти для розщеплення рослинних залишків. *Bacillus cereus* забезпечує додаткові ферменти для розщеплення рослинних залишків і пеніциліназу для придушення небажаних бактерій. *Bacillus megaterium* руйнує складні вуглеводи після розщеплення залишків сільськогосподарських культур. *Lactobacillus* забезпечує
- 10 поживні речовини для мікроорганізмів у складі НУТа і контролює рН навколишнього середовища. Організми *Nitrobacter* окислюють аміак до нітриту ( $\text{NO}_2$ ), а мікроорганізми *Nitrosomonas* окислюють нітрит до нітрату ( $\text{NO}_3$ ).

- 15 [0033] Важлива властивість НУТа - фіксація атмосферного азоту. Здатність мікроорганізмів НУТа до фіксації азоту підсилюється іншими організмами НУТа. Для фіксації азоту потрібні фосфор (P), калій (K) і вуглець (C). НУТа містить мікроорганізми, здатні розкладати P, K і C ґрунту. Крім того, бактерії-азотофіксатори забезпечують азотом інші мікроорганізми в складі НУТа.

- 20 [0034] Фіксація азоту може відбуватися бактеріями *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Azotobacter vinelandii* і *Clostridium pasteurianum*, які є наявними в НУТа, не симбіотично або в симбіозі, як відбувається в бульбочках за допомогою бактерій *Rhizobium*.

- [0035] Вуглець, необхідний для азотфіксуючих мікроорганізмів у складі НУТа, надають редуценти C, які перетворюють складні органічні сполуки ґрунту в прості сполуки, наприклад, вуглеводи, спирти та органічні кислоти. До редуцентів C відноситься багато з вищезазначених
- 25 мікроорганізмів.

- [0036] Фосфор необхідний мікроорганізмам-азотфіксаторам для розмноження; його джерелом є метаболічна активність редуцентів P, які перетворюють іммобілізований фосфор ґрунту в біодоступний фосфор. Редуценти P у складі НУТа включають *Azotobacter*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* і *Micrococcus luteus*.

- 30 [0037] Калій, необхідний для азотфіксаторів, забезпечують мікроорганізми-редуценти K, які є наявними в НУТа, що активують калій ґрунту. Редуценти K у складі НУТа включають *Pseudomonas fluorescens*.

- [0038] Три важливі мікроорганізми в складі НУТа являють собою штами *Bacillus subtilis* (SILoSIL® BS), *Bacillus thuringiensis* HD-1 і HD-73 (SILoSIL® BT) і *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL). Зазначені організми являють собою депозит ATTC PTA-10973. Спочатку їх
- 35

отримали від Biotecnologia Agroindustrial S.A. DE C.V., Морелія, Мічоакан, Мексика.

[0039] *Bacillus subtilis* (SILoSIL® BS) - граммпозитивна мезофільна бактерія з оптимальною температурою росту від 25 до 35 °C. Зазначена бактерія є аеробною і може рости в анаеробних умовах і використовувати широкий спектр джерел вуглецю. Зазначена бактерія містить дві

нітритредуктази, одна з яких використовується для асиміляції азоту. Зазначена бактерія здатна секретувати амілазу, протеази, пулуланази, хітинази, ксиланази та ліпази.

[0040] *Bacillus thuringiensis* (штами HD-1 і HD-2 (SILoSIL® BT)) - граммпозитивні факультативно-анаеробні бактерії з перитрихціальним розташуванням джгутиків. Штами HD-1 і HD-73 у ході споруляції синтезують білкові кристали різної геометричної форми, що мають інсектицидну активність. Штами HD-1 і HD-2 у хітиновмісному середовищі секретують екзохітинази і можуть застосовуватися для руйнування залишків ракоподібних при отриманні хітоолігосахаридів.

[0041] *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL) - сапрофітний гриб. Зазначений гриб проявляє дію антибіотика і є здатним до біологічної конкуренції, і тому має властивості біологічного контролю. Зазначений гриб продукує ферменти, що руйнують клітинні стінки або, що мають комбіновану дію. Зазначений гриб продукує глюконази, хітинази, ліпази та позаклітинні протеази при взаємодії з деякими патогенними грибами, наприклад, *Fusarium*.

[0042] Як показано вище, метаболізм будь-якої групи бактерій є незалежним, і вони існують у тісній симбіотичній взаємодії, забезпечуючи правильне функціонування НУТа.

[0043] Крім вуглецю, водню, фосфору, калію, сірки та різних мікроелементів, для оптимального росту бактерій важлива суміш специфічних факторів росту, наприклад, В-Комплекс, вільні L-Амінокислоти та високорозчинні мікроелементи. Для забезпечення зазначених компонентів до складу НУТа включені дріжджі, які ферментують. Процес фіксації N<sub>2</sub> вимагає великої кількості АТФ. Кількості АТФ, наявної в природних умовах, недостатньо для енергетичного забезпечення фіксації N<sub>2</sub>. Ферментація дріжджів в НУТа компенсує зазначений значний недолік енергії. Під час ферментації за рахунок дихального процесу утворюються органічні кислоти, і разом з вивільненням фосфору редуцентами Р утворюється АТФ. Зазначена АТФ використовується в процесі біологічної фіксації азоту.

[0044] НУТа містить ферменти та корисні ґрунтові мікроорганізми, що заміщають мікроорганізми, виснажені внаслідок інтенсивного застосування хімікатів, що призводить до зниження врожайів культур. За рахунок посилення мікробіологічної активності в ґрунті за допомогою НУТа зазначені бактерії викликають більш ефективне поглинання поживних речовин і мікроелементів рослинами.

[0045] Деякі з мікроорганізмів, що входять до складу НУТа, і що проникають як у ґрунт, так і в кореневу систему рослини, перетворюють гумус. Зазначений процес забезпечує рослину посиленням живленням. Це підвищує кількість поживних речовин і незамінних елементів, які є наявними у ґрунті, і які можуть поглинатися рослинами.

[0046] Застосування НУТа самого по собі або в комбінації з хітином, хітозаном, глюкозаміном та/або амінокислотами (1) забезпечує поживні речовини та елементи ґрунту, що підвищують урожай культур на 25-55%, (2) знижує вивільнення газів парникового ефекту, (3) підвищує ефективність мінеральних добрив (3) знижує застосування традиційних фунгіцидів та інших пестицидів, (4) підвищує продукцію регуляторів росту рослин, (5) поліпшує структуру, обробку ґрунту, проникність і втримання води, (6) видаляє хімічні залишки і (7) зсуває рН ґрунту в область нейтральних рН.

Мікробіологічні композиції

[0047] НУТа можна застосовувати окремо або в комбінації з одним або більше компонентами, обраних з групи, яка складається з однієї або більше амінокислот, хітину, хітозану та/або глюкозаміну. У деяких випадках у мікробіологічну композицію включають ацетил-d-глюкозамін. Мікробіологічна композиція містить різноманітні комбінації вищезазначених компонентів. Особливо переважні комбінації включають: (1) НУТа і хітин; (2) НУТа і хітозан; (3) НУТа і глюкозамін; (4) НУТа і амінокислоти; (5) НУТа, хітин і амінокислоти; (6) НУТа, хітин, хітозан і амінокислоти; (7) НУТа, хітозан, глюкозамін і амінокислоти; (8) НУТа, хітозан і глюкозамін і (9) НУТа, хітин, хітозан, глюкозамін та амінокислоти, причому остання комбінація є особливо переважною. НУТb і, особливо, НУТd є переважними джерелами хітозану, глюкозаміну та амінокислот.

[0048] Якщо НУТа росте за наявності хітину, хітозану та/або амінокислот, він може містити залишковий хітин, хітозан та/або амінокислоти. При деяких обставинах, культура бактерій НУТа містить описану мікробіологічну композицію та її можна вносити безпосередньо в ґрунт, насіння, саджанці або листя рослин. Як альтернативу, до композиції для зміни або доповнення її складу можна додати один або кілька другорядних компонентів.

[0049] У даній заявці термін "амінокислоти" відноситься до композиції, що містить дві або більше амінокислоти. Амінокислоти включають триптофан, гістидин, треонін, тирозин, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, фенілаланін, лізин, аспарагінову кислоту, цистеїн, глутамінову кислоту, глутамін, серин, гліцин, аланін, пролін, аспарагін та аргінін. У переважних варіантах реалізації амінокислоти забезпечуються за рахунок застосування НУТb (див. нижче).

[0050] У даній заявці термін "хітин" відноситься до біополімеру, що складається переважно з повторюваних одиниць бета-1-4-зв'язаного N-ацетил-D-глюкозаміну. Хітин зустрічається в природі як основний структурний матеріал екзоскелету тварин, наприклад, членистоногих (Arthropoda), наприклад, ракоподібних, комах, павуків і т.д., молюсків (Mollusca), наприклад, червононогих, головоногих і т.д., кишковопорожнинних (Coelentara), наприклад, таких організмів, як гідроїди та медузи, і круглих черв'яків (Nematoda), наприклад, некільчастих черв'яків. Хітин також зустрічається в різних грибах, включаючи членів роду *Fusarium*. Хітин можна виділити із зазначених природних джерел обробкою лугами або шляхом біорозкладання. Молекулярна маса хітину варіює залежно від його джерела та способу виділення. У переважних варіантах реалізації хітин отримують у вигляді твердої речовини при біорозкладанні хітиновмісних членистоногих (Arthropods), як описано в заявках *Bioderpac*. Переважний діаметр хітину становить приблизно 50-75 мікрон для полегшення його нанесення за допомогою краплинних та таких, що розприскують, систем зрошення.

[0051] У даній заявці термін "хітозан" являє собою полісахарид, що складається переважно з повторюваних одиниць D-глюкозаміну. Хітозан отримують деацетилюванням хітину. Ступінь деацетилювання в порівнянні з хітином становить переважно більше 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% і 95%. Переважно, щоб рівень деацетилювання був достатній для розчинності хітозану у воді при кислих рН. Молекулярна маса хітозану варіює залежно від його джерела і способу виділення. Хітозан включає олігомери хітозану. У переважних варіантах реалізації хітозан осаджують при рН 9,0 з водної фракції, отриманої при біорозкладанні хітиновмісних членистоногих, як описано в заявках *Bioderpac*.

[0052] У даній заявці термін "олігомер хітозану" відноситься до хітозану, що містить два або більше повторюваних ланок D-глюкозаміну та, у випадку неповного деацетилювання хітину, одну або більше одиниць N-ацетил-D-глюкозаміну. У переважних варіантах реалізації олігомери хітозану отримують із водної фракції, отриманої при біорозкладанні хітиновмісних членистоногих, як описано в заявках *Bioderpac*. У деяких варіантах реалізації олігомери хітозану використовують як другий компонент мікробіологічної композиції.

[0053] У даній заявці термін "глюкозамін" відноситься до аміномоносахариду. У переважних варіантах реалізації зазначений моносахарид представляє собою вуглеводний залишок, який утворює каркас біополімерів хітину та хітозану. Глюкозамін є наявним у водній фракції, отриманій при біорозкладанні хітиновмісних членистоногих, як описано в заявках *Bioderpac*. Глюкозамін індукує у рослинах синтез хітинази як засобу захисту від хітиновмісних шкідників.

НУТb і НУТc

[0054] У даній заявці термін "НУТb" відноситься до водної фракції, а "НУТc" відноситься до твердої фракції, отриманої при біорозкладанні хітиновмісних членистоногих, наприклад, описаних у заявці на патент США № 61/289706, яка була подана 23.12.09 під назвою "Біодеградація побічних продуктів ракоподібних", у заявці на патент США № 61/299869, яка була подана 20.01.10 під назвою "Спосіб біорозкладання і мікробіологічна композиція", у заявці на патент США № 61/355365, яка була подана 16.06.2010 під назвою "Спосіб і композиція для біорозкладання", і в заявці РСТ/EP2010/070285, яка була подана 20.12.2010 під назвою «Спосіб і композиція для біорозкладання», кожна з яких повністю включена в даний документ за допомогою посилання.

[0055] Коротко, у способі біорозкладання членистоногих для розкладання членистоногих або відходів членистоногих застосовують мікробіологічну композицію. Зазначений спосіб являє собою молочнокисле зброджування. Мікробіологічна композиція містить мікроорганізми, які продукують ферменти, які можуть розкласти хітиновмісні компоненти членистоногих на хітин, хітозан, N-ацетилглюкозамін і глюкозамін. Вона також містить мікроорганізми, які продукують ферменти, які можуть розкласти білки та жири з отриманням амінокислот і ліпідів.

[0056] Переважну мікробіологічну композицію для розкладання членистоногих називають HQE. HQE депонована в Американській колекції типових культур (ATCC), Манассас, штат Вірджинія, США, 27 квітня 2010 р. із привласненим патентним позначенням депозиту РТА-10861.

[0057] У переважному варіанті реалізації морське членистоноге є ракоподібним, а переважне ракоподібне є креветкою. Побічний продукт переробки креветок включає головогруди та/або екзоскелет креветок.

[0058] У процесі біорозкладання переважно, щоб ферментація була факультативною

аеробною ферментацією. Крім того, переважно, щоб ферментацію здійснювали при температурі приблизно 30-40 °С. рН переважно становить менше приблизно 6, більш переважно - менше приблизно 5,5. У той самий час рН слід підтримувати вище приблизно 4,3. Ферментацію проводять протягом приблизно 24-96 годин. У деяких варіантах реалізації ферментацію проводять протягом приблизно 24-48 годин, а більше переважно - 24-36 годин. Зазначений час зброджування значно коротший, ніж типовий час зброджування, описаний раніше і який становив від 10 до 15 днів для досягнення практично аналогічного гідролізу, хоча і без формування, що виявляється, хітозану і глюкозаміну.

[0059] Розділення суміші переважно здійснюють центрифугуванням (наприклад, приблизно 920 g). Крім того, можна використовувати гравітаційне розділення, однак воно не є переважним через час, необхідний для розділення.

[0060] Суміш розділяють на три фракції: тверду, водну і ліпідну. Тверда фракція містить хітин і називається НУТс. Водна фракція містить гідролізат білка, амінокислоти, хітозан і глюкозамін і називається НУТb. Ліпідна фракція містить стерини, вітамін А и Е та каротиноїдні пігменти, наприклад, астаксантин.

[0061] Застосування HQE у способі біодеградації є переважним. В інших варіантах реалізації переважним є додавання попередньо отриманого НУТb до HQE або ферментаційного середовища. Як описано вище, НУТb містить амінокислоти, хітозан, глюкозамін і мікроелементи, у тому числі кальцій, магній, цинк, мідь, залізо і марганець. НУТb також містить ферменти, наприклад, молочнокислі ферменти, протеази, ліпази, хітинази, молочну кислоту, поліпептиди та інші вуглеводи. НУТb може також містити неактивні мікроорганізми від попереднього процесу біорозкладання. Такі мікроорганізми можуть реактивуватися і, у комбінації з HQE, сприяти більш надійному біорозкладанню в порівнянні із застосуванням HQE окремо, як описано в іншому варіанті реалізації в даній заявці.

[0062] Більш докладно, зазначений спосіб включає наступні етапи:

a. Активацію мікробних клітин у вуглеводному основному розчині для стимуляції їхнього росту та утворення біомаси.

b. Перемельювання побічних продуктів креветок (головогрудей та екзоскелету) з отриманням однорідної пасти.

c. Однорідне змішування пасти побічного продукту креветок з, щонайменше, 10% активного інокуляту.

d. Регулювання рН до значень менше 6,0 у суміші з використанням розчину лимонної кислоти для інгібування росту мікроорганізмів і стимуляції розвитку мікробних клітин, що входять до складу інокуляту.

e. Ферментація суміші в періодичній системі, що перемішується, при температурах у діапазоні від 30 до 40 °С, протягом, щонайменше, 96 годин при рН, яке підтримується на рівні менше 5,0. Періодично виконують моніторинг рН. Якщо рН перевищує 5,0, додають цитратний буфер у такій кількості, щоб підтримувати рН нижче 5,0.

f. Центрифугування продукту зброджування для розділення трьох основних фракцій: хітину, рідкого гідролізату та пігментованої пасти.

g. Промивання неочищеного хітину та повторний збір промивних вод для відновлення дрібних твердих часток або мінеральних компонентів.

h. Висушування хітину та його зберігання.

i. Висушування та зберігання рідкого гідролізату.

j. Пігментовану пасту (ліпідну фракцію) зберігають у закритому резервуарі для збереження.

[0063] Для кращого розуміння зазначеного способу та основ його експлуатації наведене посилання на наступний докладний опис.

Активация мікробних клітин

[0064] Мікробну композицію, описану в даній заявці, використовують як інокулят. Інокулят HQE містить від приблизно 2,5 до 3,0% (мас/об) мікроорганізмів. HQE активують розведенням до 5% у розчині тростинного цукру (кінцева концентрація тростинного цукру 3,75%) та інкубують при 37 °С протягом 5 днів. Переважно додають НУТb (10 мол на літр культури) для забезпечення джерела мінералів і природних амінокислот. Ріст мікроорганізмів оцінювали за оптичною густиною, яка вимірювалась при 540 нм. Активация завершувалася при оптичній густині приблизно 1,7. Концентрація мікроорганізмів після активації становила приблизно 1,9-3,0% (мас/об).

Підготовка зразків

[0065] Зразки побічного продукту переробки креветок отримували на підприємствах з переробки креветок. Злегка розморожений і подрібнений залишок (1500 г на партію) змішують з 99 грамами тростинного цукру (кінцева концентрація 6,6% мас.%) і 85,5 мол активованої HQE



5% (об/мас) (оптична густина клітин = 1,7). Потім коректують рН до величини 5,5 за допомогою 2 М лимонної кислоти.

Контроль ферментації

- 5 [0066] Суміш інкубують при 36 °С і періодичному перемішуванні протягом 96 годин. У процесі ферментації рН контролюють за допомогою потенціометра, а загальну кислотність (ТТА,%), яка титрується, визначають титруванням 0,1 н. NAOH до одержання рН 8,5. ТТА виражали у відсотках молочної кислоти.

Умови розділення

- 10 [0067] Продукт ферментації являє собою в'язкий силос інтенсивного оранжевого кольору через наявність астаксантину. Зазначений силос центрифугують (5 °С) при 1250 об./хв.(930 g) протягом 15 хв. з отриманням хітину, рідкого гідролізату та пігментної пасту. Верхню фазу (пігментну пасту) відокремлюють вручну. Рідкі гідролізати відокремлюють декантацією, а осад, який являє собою неочищений хітин, промивають дистильованою водою для відділення дрібних твердих часток. Отриману рідину збирають і висушують. Неочищений хітин, рідкі гідролізати та дрібні тверді частки висушують при 60 °С. Усі фракції зберігають без доступу світла.

15 [0068] Інші мікробіологічні композиції для одержання НУТb і НУТc представлено в наступній Таблиці 2.

Таблиця 2

Композиція культур

Мікроорганізм	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

- 20 Зазначені мікроорганізми переважно отримані з HQE і відносяться до *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),
- 25 *Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008), *Bacillus thuringiensis* strains HD-1 and HD-73 (SILoSIL® BT), *Streptomyces* (Bioderpac, 2008), *Micrococcus* (Bioderpac, 2008), *Nitrobacter* (Bioderpac, 2008) і *Proteus* (Bioderpac, 2008). Кожний з цих організмів легко виділити з HQE і рекомбінувати з утворенням описаної мікробіологічної композиції для розкладання членистоногих з отриманням НУТb і НУТc.

- 30 НУТb

- [0069] НУТb містить амінокислоти (приблизно 12 мас.%), хітозан (приблизно 1,2 мас.%), глюкозамін (приблизно 1 мас.%) і мікроелементи (приблизно 6 мас.% , у тому числі кальцій, магній, цинк, мідь, залізо та марганець. Він також містить ферменти, наприклад, у числі іншого, молочнокислі ферменти, протеази, ліпази, хітинази, молочну кислоту, поліпептиди та інші вуглеводи. Питома вага НУТb зазвичай становить приблизно 1,050-1,054. Середній вміст деяких амінокислот в НУТb представлено в Таблиці 2.
- 35

Таблиця 3

Амінокислотний профіль сухих  
порошкоподібних гідролізатів (мг на г сухої  
ваги)

Амінокислота	Сухі порошкоподібні гідролізати
Аспарагінова кислота	38
Глутамінова кислота	39
Серин	16
Гістидин	9
Гліцин	28
Треонін	14
Аланін	36,1
Пролін	25,8
Тирозин	70
Аргінін	22,2
Валін	20
Метіонін	16,4
Ізолейцин	18,3
Триптофан	3,1
Лейцин	23
Фенілаланін	39
Лізін	13
Усього	431

[0070] У деяких варіантах реалізації НУТb може являти собою другий компонент, який поєднують із НУТа або застосовують окремо як добриво для ґрунту та/або при обприскуванні листя.

5 НУТс

[0071] Основним компонентом НУТс є хітин. Його середня молекулярна маса дорівнює приблизно 2300 дальтон, і він становить приблизно 64 мас.% композиції. Приблизно 6% НУТс містить мінерали, включаючи кальцій, магній, цинк, мідь, залізо та марганець, близько 24 мас.% білка та 6% води. Його питома вага дорівнює приблизно 272 кг/м<sup>3</sup>. У деяких варіантах реалізації НУТс може являти собою другий компонент, який поєднують з НУТа або застосовують окремо як добриво для ґрунту та/або при обприскуванні листя.

10

[0072] НУТа переважно застосовують з НУТb і НУТс у комбінації або окремо як добриво для ґрунту або при обприскуванні листя.

15

[0073] Мікроорганізмам у складі НУТа необхідні мікроелементи кальцій, магній, сірка, бор, марганець, цинк, молібден, залізо, мідь, натрій і кремній. Ці важливі мікроелементи часто можна отримати за рахунок токсичних хімічних реакцій, які не підходять для органічної сертифікованої продукції. Відповідно, переважним є одержання зазначених мікроелементів з органічних джерел, наприклад, НУТb та/або НУТс.

НУТd

20

[0074] НУТd отримують шляхом ферментації хітину з мікробіологічною композицією, наприклад, HQE, суспендованою в НУТb. Зазначений спосіб аналогічний способу, описаному вище для одержання НУТb і НУТс, за винятком того, що субстратом є хітин, наприклад, НУТс, а не хітиновмісні членистоногі.

25

[0075] Фігура 12 являє собою блок-схему, що ілюструє розкладання ракоподібних для утворення НУТb і НУТс. Потім НУТс і НУТb обробляють HQE з утворенням НУТd, розчину з відносно високою кількістю хітозану та глюкозаміну в порівнянні з НУТb.

[0076] Фігура 13 являє собою блок-схему, що ілюструє розкладання грибів, у тому числі міцеліальних грибів, дріжджів та/або комах для утворення НУТb і НУТс. Потім НУТс і НУТb переробляються з HQE для утворення НУТd.

30

[0077] НУТb вже містить хітозан (приблизно 0,5-1,5 мас.%) і глюкозамін (приблизно 0,5-1,5 мас.%). Кількість хітозану та глюкозаміну в НУТd становить приблизно 2-2,5 мас.% хітозану і приблизно 2-5 мас.% глюкозаміну. Це є збільшенням кількості хітозану та глюкозаміну в порівнянні з НУТb, де міститься приблизно 0,5-2,5 мас.% хітозану та приблизно 0,5-5 мас.%

глюкозаміну.

[0078] НУТd у нерозведеному стані аналогічний НУТb, але містить більшу кількість хітозану та глюкозаміну. НУТd містить амінокислоти (приблизно 5-12 мас.%) і мікроелементи (приблизно 6 мас.%), у тому числі кальцій, магній, цинк, мідь, залізо і марганець. Він також містить ферменти, наприклад, у числі іншого, молочнокислі ферменти, протеази, ліпази, хітинази, молочну кислоту, поліпептиди та інші вуглеводи. У деяких варіантах реалізації ступінь ацетилювання отриманого хітозану становить 20% або менше, переважно 15% або менше, більш переважно 10% або менше, ще більш переважно 8% або менше і найбільш переважно 5% або менше. Переважний вміст деяких амінокислот в НУТd аналогічний НУТb. Див. Таблицю 3.

[0079] НУТd переважно містить 12 мас.% L-Амінокислот (аспарагінової кислоти, глутамінової кислоти, серину, гістидину, гліцину, треоніну, аланіну, проліну, аргініну, валіну, метіоніну, ізолейцину, триптофану, фенілаланіну, лізину та треоніну) і 5 мас.% глюкозаміну та хітозану. НУТd також переважно містить один або більше або всі з розчинних мінералів (P, Ca, Mg, Zn, Fe і Cu), ферментів і молочної кислоти, що містяться в продукті гідролізу хітину, а також інші полісахариди.

[0080] У даній заявці термін "глюкозамін" включає глюкозамін або суміш глюкозаміну та N-ацетилглюкозаміну. У більшості варіантів реалізації НУТd містить і N-ацетилглюкозамін.

[0081] НУТd може також містити не повністю гідролізовані частинки хітину. У загальному випадку ферментаційну суміш фільтрують для видалення великих частинок хітину. Фільтрат містить, як правило, не більше 2 мас.% хітину.

Активация НУТа

[0082] Вищезазначену мікробіологічну композицію можна застосовувати для обробки ґрунту, насіння, саджанців та/або листя рослин. Разом з тим, НУТа спочатку активують перед застосуванням.

[0083] У переважних варіантах реалізації НУТа активують шляхом інкубування інокуляту НУТа у водяному розчині протягом 24-168 годин, дозволяючи мікроорганізмам вирости і розмножитися перед застосуванням у способі обробки ґрунту, насіння, саджанців та/або листя рослин. Умови інкубування впливають на загальні вихідні властивості НУТа.

[0084] В одному варіанті реалізації інокулят НУТа розводять водою в співвідношенні 1/100 та інкубують при температурі приблизно 36 °C при pH 6,8-7,1 протягом від приблизно 24 до приблизно 168 годин (7 днів). Під час зазначеної активації необов'язково можна використовувати НУТb. Мікроорганізми-азотофіксатори *Azotobacter vinelandii* і *Clostridium pasteurianum* розмножуються в ростових умовах при зниженій концентрації азоту. Крім того, при зниженні концентрації кисню розмножуються *Lactobacilli*, у тому числі *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. Кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) деяких бактерій в активованій НУТа представлено в таблиці 3:

Таблиця 4

<i>Azotobacter vinelandii</i>	101050000 КУО/мол
<i>Clostridium pasteurianum</i>	104275000 КУО/мол
<i>Bacillus subtilis</i>	1100000 КУО/мол
<i>Bacillus cereus</i>	25000 КУО/мол
<i>Bacillus megaterium</i>	10000 КУО/мол
<i>Lactobacillus</i>	500000 КУО/мол
<i>Nitrobacter</i>	5000 КУО/мол
<i>Nitrosomonas</i>	2500 КУО/мол
Усього	206967000 КУО/мол

[0085] НУТа, отримана після цього інкубування, зберігає корисні властивості НУТа, але особливо підходить як ґрунтопокресувач для обробки ґрунтів, збіднених на азот, з урахуванням здатності *Azotobacter vinelandii* and *Clostridium pasteurianum* до азотофіксації.

[0086] Якщо є наявними або за припущенням є наявними ґрунтові патогени, наприклад, міцеліальні гриби з роду *Fusarium* або нематоди, НУТа можна активувати практично в тих же умовах, але за наявності хітину. Хітин стимулює розмноження хітин-чутливих мікроорганізмів, наприклад, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces*

sp., *Nitrobacter* sp., *Micrococcus* sp. і *Bacillus subtilis*. НУТа, отримана в цих умовах, має протигрибкові, фунгіцидні, протинематодні, нематодцидні та інсектицидні властивостями в тій мірі, у якій такі патогени містять хітин. Такі мікробіологічні композиції можна застосовувати для обробки ґрунту, насіння, саджанців та/або листя рослин. Такі мікробіологічні композиції також

[0087] На додаток до інкубування з хітином, НУТа можна активувати з хітином і амінокислотами. Переважним джерелом хітину є НУТс. При використанні НУТс білок і мінерали в складі НУТс також є наявними під час активації.

[0088] Крім того, НУТа можна активувати за наявності амінокислот і хітозану. Переважним джерелом амінокислот і хітозану є НУТb та/або НУТd. При використанні НУТb та/або НУТd глюкозамін та інші компоненти в складі НУТb та/або НУТd також є наявними під час активації.

[0089] Необов'язково НУТа можна інкубувати з хітином, амінокислотами та хітозаном. Переважним джерелом хітину є НУТс. Переважним джерелом амінокислот і хітозану є НУТb та/або НУТd. При використанні НУТb, НУТd і НУТс інші компоненти зазначених складів також є наявними під час активації.

#### Застосування активованої НУТа

[0090] Активовану НУТа можна застосовувати окремо або в комбінації з іншими компонентами, наприклад, хітином (наприклад, НУТс), хітозаном, глюкозаміном та амінокислотами (наприклад, НУТb та/або НУТd) для обробки ґрунту, насіння, саджанців або листя. У деяких варіантах реалізації комбінації зазначених компонентів можна застосовувати у вигляді суміші. В інших варіантах реалізації їх можна застосовувати окремо. В інших варіантах реалізації зазначені компоненти можна застосовувати в різний час.

[0091] В одному варіанті реалізації активовану НУТа можна вносити в ґрунт, на насіння або саджанці, або використовувати для позакореневого внесення шляхом безпосереднього нанесення на листя. У той же час, якщо є наявними рослинні патогени, те переважно, щоб мікробіологічна композиція містила активовану НУТа, хітин та/або хітозан. Як альтернативу, НУТа можна активувати за наявності хітину. Хітозан, як відомо, виявляє бактерицидну, фунгіцидну та противірусну дію, а також є здатним стимулювати ріст рослин і індукувати стійкість рослин до патогенів. В інших варіантах реалізації частиною мікробіологічної композиції є глюкозамін.

[0092] У переважному варіанті реалізації активовану НУТа наносять на ґрунт, насіння, саджанці та/або листя окремо або в комбінації з хітином (переважно, НУТс) та/або хітином, хітозаном і амінокислотами (наприклад, НУТb, НУТd та/або НУТс). Переважним є застосування НУТа у комбінації з хітином, хітозаном, глюкозаміном та амінокислотами. НУТс є переважним джерелом хітину, у той час як НУТb та/або НУТd є переважним джерелом хітозану, глюкозаміну та амінокислот. Проте, компоненти мікробіологічної композиції, а саме НУТа, хітин, хітозан, глюкозамін та амінокислоти можна застосовувати окремо або в будь-якій комбінації або субкомбінації. Їх можна застосовувати одночасно або послідовно, у будь-якому заданому порядку. Однак переважний спосіб застосування полягає в їхньому первісному одночасному застосуванні. Застосування вищезазначених компонентів передбачає безпосередню обробку патогенів рослин, індукцію шляхів стійкості до патогенів у рослин і підживлення мікроорганізмів НУТа, природної непатогенної ґрунтової флори і рослини.

[0093] Якщо ґрунт спочатку обробляють мікробіологічною композицією, що включає тільки активовану НУТа, існує можливість заселення ґрунту мікроорганізмами, що є наявними в композиції, і змінення її таксономічного складу. У деяких ситуаціях початкова колонізація НУТа забезпечує малу кількість поживних речовин або взагалі не забезпечує рослину поживними речовинами. У таких випадках важливо підтримувати запас поживних речовин у ґрунті для підтримки як росту мікробів при колонізації ризосфери, так і росту рослин. Можливо, необхідно повторити застосування НУТа, залежно від циклу росту рослини та режиму живлення. В інших випадках може бути достатньо забезпечити додаткове внесення амінокислот, хітину та/або хітозану, наприклад, НУТb і НУТс, у попередньо оброблений ґрунт.

[0094] Якщо НУТа використовують у комбінації з, наприклад, НУТb, НУТd та/або НУТс, для мікроорганізмів НУТа і рослин, що є наявними в обробленому ґрунті, доступні додаткові поживні речовини.

[0095] У Таблиці 5 наведена типова чотирнадцятитижнева програма застосування НУТа, НУТb і НУТс при краплинному поливі рослин, які вирощуються у ґрунті. Наведені значення на гектар. Для НУТа і НУТb значення виражені в літрах на тиждень. Для НУТс значення виражені в кілограмах на тиждень.

Таблиця 5

л/кг/ тиждень	БВ1	БВ2	БВ3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W12	W13	W14
НУТ-А	3	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
НУТ-В	10	5	0	3	2	3	2	3	2	3	2	3	2	3
НУТ-С	1			1				1				1		

[0096] Періодичність введення мікробіологічної композиції в систему зрошення повинна бути такою, при якій мікробіологічна композиція здатна досягти кореневої системи і залишатися там протягом ночі, під час відпочинку кореневої системи. Для максимальної продуктивності НУТс її слід наносити в той самий час у суміші з НУТа. Зазначену процедуру слід продовжувати, поки рослина продовжує плодоносити. Зазначений протокол охоплює всі етапи розвитку рослини, включаючи проростання, коренеутворення, ріст рослини, цвітіння, зав'язування плодів, збір і повторний збір урожаю. Зазначений протокол призначений для можливості отримання максимального врожаю і передбачає аспекти живлення, біостимуляції та захисту від захворювань, наприклад, нематод і грибів.

[0097] Зазначений спосіб можна здійснити шляхом обробки ґрунту з отриманням обробленого ґрунту. У деяких випадках зазначений спосіб застосовують повторно. У деяких випадках рослини, саджанці або насіння вже є наявними в ґрунті до обробки мікробіологічною композицією. В інших випадках рослини, саджанці або насіння пересаджують у ґрунт після обробки мікробіологічною композицією.

[0098] У загальному випадку перед застосуванням визначають число гектарів або акрів, що підлягають обробці. Потім рекомендовану кількість активованої НУТа на гектар або акр множать на оброблювану площу і розводять у достатній кількості води для зрошення або обприскування ґрунту або рослин на площі, що підлягає обробці. Аналогічну процедуру можна здійснювати для рідкої НУТb та/або НУТd. НУТс, оскільки він є твердою речовиною, можна вносити безпосередньо у вигляді твердої речовини або у вигляді суспензії у воді. НУТс переважно подрібнюють до часток мікронного розміру перед застосуванням.

[0099] Зазначений спосіб підходить для неродючого ґрунту. Такі ґрунти, як правило, мають, щонайменше одну з наступних характеристик: низька катіонообмінна ємність, низька водоутримуюча здатність, низький вміст органічних речовин і низький рівень доступних поживних речовин. У загальному випадку неродючі ґрунти не підтримують інтенсивного зростання рослин та/або дають низькі врожаї.

[00100] Для систем без ґрунту, наприклад, гідропонних, застосовують аналогічний протокол, але із щоденним розподіленням відповідно до програми підживлення і зрошення.

[00101] Мікробіологічні композиції можна застосовувати для будь-якої рослини, включаючи люцерну, банан, ячмінь, броколі, моркву, кукурудзу, огірок, часник, виноград, цибулю-порей, диню, цибулю, картоплю, малину, рис, сою, кабачки, полуницю, цукровий очерет, помідор і кавун, але не обмежуючись ними.

[00102] При нанесенні як ґрунтопокрощувача мікробна композиція, що містить НУТа, хітин, амінокислоти та хітозан, поліпшує врожайність сільськогосподарських культур у середньому приблизно на 25%-55% у порівнянні з 15-25% ростом урожайності культур, який спостерігався для E2001. Від Karl Co. SA de CV, Навохоа, штат Сонора, Мексика.

[00103] Мікробіологічні композиції також можуть призводити до зниження кількості хітину, який використовується. Наприклад, відомо застосування хітину як ґрунтопокрощувача. Як правило, використовують приблизно 600 кг хітину на гектар. Однак позитивний ефект від такого застосування не спостерігався протягом шести місяців. При активації НУТа за наявності хітину, а потім об'єднанні з хітином і застосуванні як ґрунтопокрощувача сприятливі ефекти спостерігалися через сім днів при використанні лише 4-6 кг хітину на гектар.

[00104] Хоча даний опис спрямований у першу чергу на застосування описаних мікробних композицій НУТb, НУТс та/або НУТd у сільському господарстві, такі композиції або їхні компоненти та способи також можна застосовувати в садівництві для поліпшеного утворення листя і квітів та зниження застосування традиційних інсектицидів і фунгіцидів.

[00105] При внесенні НУТd і активованої НУТа, НУТb та/або НУТс у ґрунт, насіння, саджанці або листя отримують оброблений ґрунт, оброблені насіння, оброблені саджанці, оброблене листя та оброблені рослини. НУТd також є новою композицією. Таким чином, ґрунт, насіння, саджанці, листя та рослини, оброблені НУТd і НУТа, НУТb та/або НУТс, також є новими. Оскільки НУТd, НУТа, НУТb і НУТс, як правило, розводять перед застосуванням, ґрунт, насіння,

саджанці та листя, як правило, містять компоненти НУТd, НУТа, НУТb і/або НУТс у розведеному виді.

[00106] Ґрунт, оброблений НУТа, визначають як ґрунт, що містить один або декілька унікальних для НУТа мікроорганізмів, диспергованих в обробленому ґрунті. Такі мікроорганізми можна генетично виявити в обробленому ґрунті за допомогою біочіпу, що виявляє популяції мікроорганізмів на основі ДНК. Див., наприклад, публікацію США 2007/0015175, включену в даний документ за допомогою посилання. Крім того, можна застосовувати інші методи, відомі спеціалістам у даній області техніки, наприклад, ПЛР. Особливо переважними мікроорганізмами у складі НУТа є *Bacillus subtilis* (SILoSIL® BS), *Bacillus thuringiensis* штам HD-1, *Bacillus thuringiensis* штам HD-73 (SILoSIL® BT) і *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL), кожний з яких можна виділити з депозиту НУТа або отримати з Biotechnologia Agroindustrial S.A. DE C.V., Морелія, Мічоакан, Мексика. *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL) є найбільш переважним мікроорганізмом, оскільки він відіграє важливу роль при активації НУТа, викликаючи міжкомпонентний синергізм з іншими мікроорганізмами в складі НУТа. Надалі ідентифікацію одного або більше з цих мікроорганізмів можна при необхідності об'єднати з ідентифікацією інших мікроорганізмів у складі НУТа для підтвердження наявності НУТа або слідів наявності НУТа. *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL) депоновано в ATCC 6 жовтня 2011 року з привласненим патентним позначенням депонування POTA-12152. *Bacillus subtilis* (SILoSIL® BS) депоновано в ATCC 7 жовтня 2011 року з привласненим патентним позначенням депонування POTA-12153. Штами *Bacillus thuringiensis* HD-1 і HD-73 (SILoSIL® BS) депоновано в ATCC 31 травня 2012 року з привласненим патентним позначенням депонування POTA-12967.

[00107] Аналогічним чином визначають оброблені насіння, саджанці, листя і рослини. У зазначених випадках мікроорганізми НУТа перебувають на поверхні обробленого насіння, саджанців, листя і рослин.

[00108] У даному документі термін "що складається практично з" у зв'язку з НУТа, НУТb і НУТс означає кожен з НУТа, НУТb та/або НУТс окремо або в комбінації без додаткових мікроорганізмів.

Спосіб отримання НУТd

[00109] Спосіб отримання НУТd описаний у заявці на патент США № 61/500527, яка була подана 23 червня 2011 р. під назвою «Процес отримання хітину і похідних хітину», прямо включеної в дану заявку за допомогою посилання.

[00110] Коротко, НУЕ або споріднену хітин-руйнуючу мікробіологічну композицію активують і додають до НУТb. Додають твердий хітин і зброджують суміш протягом 3-7 днів. Зазначений хітин можна отримати з НУТс або інших джерел, наприклад, шляхом хімічної обробки або біорозкладання хітиновмісних грибів, міцеліальних грибів, дріжджів та/або комах. НУТс є переважним джерелом хітину. У переважному випадку хітин є мікронізованим. Можна використовувати мікронізований хітин або залишковий хітин.

Застосування НУТd

[00111] НУТd можна застосовувати як біостимулятор росту коріння і листя, і як фунгіцид.

[00112] Якщо НУТd використовують окремо як фунгіцид, переважно застосовувати НУТd у кількості 20 літрів на гектар.

[00113] Якщо НУТd використовують для обробки рослин у стані стресу, переважно застосовувати НУТd у кількості 3-10 літрів на гектар.

[00114] НУТd також можна застосовувати в кількості 3-5 літрів на гектар.

[00115] НУТd можна вносити безпосередньо в ґрунт та/або на листя.

НУТd можна застосовувати в комбінації з іншими компонентами, наприклад, НУТb, НУТс та/або НУТа. При застосуванні з іншими компонентами НУТd можна поєднувати з компонентом з утворенням нових композицій. Такі композиції можна вносити безпосередньо в ґрунт та/або на листя. Як альтернативу, НУТd і один або більше з НУТа, НУТb та/або НУТс можна застосовувати окремо або в різний час.

Приклад 1

[00116] Наступний протокол використовували для обробки ґрунту з рослинами спаржі.

Таблиця 6

Тест	НУТа	НУТб	НУТс	НУТд
1	0	0	0	0
2	3 л/га, потім 1 л/га кожні 45 днів	0	0	0
3	3 л/га, потім 1 л/га кожні 45 днів	2 л/га, потім 1 л/га кожні 12 днів	0	0
4	3 л/га, потім 1 л/га кожні 45 днів	5 л/га, потім 2 л/га кожні 12 днів	0	5 л/га, потім 2 л/га кожні 12 днів

[00117] Результати показані на Фігурах 1 і 2. Як видно, за відсутності застосування будь-якого продукту НУТ отримана порівняно невелика рослина з поганим розвитком корінь. У міру проходження досліджень 2, 3 і 4 видно, що кожна обробка призводила до поліпшеного розвитку листя і корінь.

#### Приклад 2

[00118] У даному прикладі продемонстрована сприятлива дія обробки картоплі НУТа у порівнянні з контролем.

[00119] Ґрунт містив 1% органічної речовини або менше і мав рН 7,3-7,5. Протягом тесту на гектар вносили:

- 400-600 кг сульфату амонію.
- 250-400 кг 11-52-0, фосфору.
- 300 кг сульфату калію.
- 150-200 кг нітрату калію.
- 50-100 кг сульфату магнію.
- 25-50 кг сульфату цинку.
- НУТа - 10 л

[00120] Два літри НУТа на гектар ґрунту вносили при першому внесенні води. При посадці в ґрунт вносили 4 літра НУТа на гектар. Після розвитку стонів у ґрунт вносили 2 літра НУТа на гектар. Після досягнення бульбами розміру 4 см у ґрунт вносили 2 літра НУТа на гектар.

Результати представлено в Таблиці 7.

Таблиця 7

	ТЕСТ НУТ+А		КОНТРОЛЬ		ВІДМІННІСТЬ		% У ВІДНОШЕННІ ДО КОНТРОЛЮ	
	розмір	кількість	кілограми	кількість	кілограми	кількість	кілограми	кількість
Гігантський		0	0,00	0	0,00	0	0,00	
1-й	4	1,20	1	0,30	3	0,91	300%	307%
2-й	18	3,33	11	1,93	7	1,41	64%	73%
3-й	21	2,74	25	3,37	-4	-0,63	-16%	-19%
4-й	71	3,24	118	5,27	-47	-2,03	-40%	-39%
MONO	6	0,79	7	1,30	-1	-0,51	-14%	-39%
УСЬОГО	120	11,3	162	12,1	-42	-0,86	-26%	-7%

[00122] Найціннішою популяцією картоплі є гігантська картопля, потім картопля 1-го, 2-го й 3-го розміру. Наступні два розміри можна застосовувати для переробки картоплі або насінного матеріалу. На Фігурах 3 і 4 графічно представлені результати з Таблиці 7. Як можна бачити, існує значне збільшення кількості бульб і маси картоплі першого і другого розмірів. Фігура 5 містить фотографії, що порівнюють отриману картоплю.

#### Приклад 3

[00123] У даному прикладі продемонстрована сприятлива дія обробки картоплі НУТа, НУТб, НУТс і НУТд у порівнянні з обробкою картоплі НУТа.

[00124] Ґрунт містив 1% органічної речовини або менше і мав рН 7,3-7,5. Протягом дослідження на гектар вносили:

- 400-600 кг сульфату амонію.
- 250-400 кг 11-52-0, фосфору.
- 300 кг сульфату калію.

- 150-200 кг нітрату калію.
- 50-100 кг сульфату магнію.
- 25-50 кг сульфату цинку.
- НУТа - 10 л
- НУТb - 8 л
- НУТс - 4 кг
- НУТd - 5 л

[00125] Два літри НУТа на гектар ґрунту вносили при першому внесенні води. При посадці в ґрунт вносили 4 літра НУТа, 3 кілограма НУТс і 5 літрів НУТd на гектар. Після розвитку стелонів у ґрунт вносили 2 літра НУТа на гектар. Після досягнення бульбами розміру 4 см у ґрунт вносили 2 літра НУТа на гектар.

[00126] Після початку формування бульб на листя рослин кожні 6-10 днів наносили 1 літр НУТb. Цю процедуру повторювали вісім разів.

Результати представлено в Таблиці 8.

Таблиця 8

розмір	ТЕСТ НУТ+A+B+C+D		КОНТРОЛЬ		ВІДМІННІСТЬ		% У ВІДНОШЕННІ ДО КОНТРОЛЮ	
	кількість	кілограми	кількість	кілограми	кількість	кілограми	кількість	кілограми
Гігантський	4	1,54	0	0,00	4	1,54		
1-й	8	2,07	1	0,30	7	1,78	700%	602%
2-й	19	3,60	11	1,93	8	1,68	73%	87%
3-й	32	4,04	2,5	3,37	7	0,68	28%	20%
4-й	30	1,69	118	5,27	-79	-3,58	-67%	-68%
MONO	1	1,54	7	1,30	-6	0,24	-86%	19%
УСЬОГО	103	14,5	162	12,1	-59	2,32	-36%	19%

[00128] На Фігурах 6 і 7 графічно представлені результати з Таблиці 8. Як можна бачити, існує значне збільшення кількості і маси картоплі з гігантського по третій розмір у порівнянні з обробкою картоплі тільки НУТа. Фігура 8 містить фотографії, що порівнюють отриману картоплю.

Приклад 4

[00129] У даному прикладі продемонстрована сприятлива дія обробки картоплі НУТа, НУТb, НУТс і НУТd у порівнянні з обробкою картоплі метам-натрієм у ґрунті, зараженому грибами. Результати представлено в Таблиці 9.

ґрунт обробляли відповідно до опису у Прикладі 3. НУТа, НУТс і НУТd вносили, як описано в Прикладі 2. Вносили триста літрів метам-натрію на гектар.

Таблиця 9

розмір	ТЕСТ НУТ+A+B+C+D		КОНТРОЛЬ Метам-натрій		ВІДМІННІСТЬ		% У ВІДНОШЕННІ ДО КОНТРОЛЮ	
	кількість	кілограми	кількість	кілограми	кількість	кілограми	кількість	кілограми
Гігантський	4	1,54	1	0,43	3	1,11	300%	257%
1-й	8	2,07	1	0,32	7	1,75	700%	547%
2-й	19	3,60	35	6,46	-16	-2,86	-46%	-44%
3-й	32	4,04	24	2,67	8	1,38	33%	52%
4-й	39	1,69	88	3,63	-49	-1,94	-56%	-54%
MONO	1	1,54	6	1,47	-5	0,06	-83%	4%
УСЬОГО	103	14,5	155	15,0	-52	-0,50	-34%	-3%

[00130] На Фігурах 9 і 10 графічно представлені результати з Таблиці 9. Як можна бачити, існує значне збільшення кількості бульб і маси картоплі з гігантського, першого і третього розміру в порівнянні з обробкою картоплі метам-натрієм. Фігура 11 містить фотографії, що порівнюють отриману картоплю.

[00131] Метам-натрій - препарат для окулювання ґрунту, який застосовується як пестицид, гербіцид та фунгіцид. Його застосування заборонене в деяких країнах у зв'язку із



природоохоронними міркуваннями. Обробка НУТа, НУТб, НУТс і НУТд допомагає уникнути застосування метам-натрію в певних областях, тим самим знижуючи вплив на навколишнє середовище і витрати на застосування цього препарату для окурювання ґрунту.

Приклад 5

5 [00132] У даному прикладі продемонстрована дія обробки НУТа і НУТс огірка, зараженого нематодою *Rhabditis* і грибом *Fusarium oxisporum*.

[00133] У ґрунт вносили десять літрів НУТа і 3 кілограми НУТс на гектар. Зазначену процедуру повторювали через 8 днів.

[00134] Результати показано в Таблиці 10.

10

Таблиця 10

Нематоди	До			Через 18 днів		
	Популяція нематод на кг ґрунту			Популяція нематод на кг ґрунту		
	Невелика кількість < 100	Середня кількість >100 < 500	Велика кількість > 500	Невелика кількість < 100	Середня кількість >100 < 500	Велика кількість > 500
<i>Rhabditis</i>			9600			850
Популяція нематод на кг ґрунту						
Грибок	Невелика кількість < > 400	Середня кількість > 600	Велика кількість > 700	Невелика кількість < > 400	Середня кількість > 600	Велика кількість > 700
<i>Fusarium oxisporum</i>			770	3		

[00135] Як можна бачити, популяція зазначених організмів суттєво знижувалася через 18 днів після обробки.

Приклад 6

15 [00136] У даному прикладі продемонстрована дія обробки НУТа, НУТс і НУТд помідору, зараженого грибом *Fusarium oxisporum*.

[00137] У ґрунт вносили п'ять літрів НУТа, 1 кілограм НУТс і 5 літрів НУТд на гектар. Зазначену обробку повторювали кожні 15 днів.

[00138] Результати показано в Таблиці 11.

20

Таблиця 11

Колонієутворюючі одиниці (КУО/г)	НУТа, С + D	Контроль
<i>Fusarium oxysporum</i>	500	1666
<i>Rhizoctonia solani</i>	0	
<i>Phytophthora</i> sp.	0	
<i>Pythium</i> sp	0	

[00139] Як видно, обробка НУТа, НУТс і НУТд значно знижувала кількість колонієутворюючих одиниць гриба.

Приклад 6

25 [00140] Листя рослин помідору, заражених гнилизною (грибом *Phytophthora infestans*), обробляли НУТд. Два, 4, 6 і 8 літрів НУТд розбавляли 100 л води на гектар. Контролем були необроблені помідори. Через тиждень зараження припинили. Грибок на контрольній культурі на той час розвився до ватоподібної цвілі, що призвело до ушкодження рослин і розвитку некрозу (результати не показані). Оптимальна кількість НУТд для обробки *Phytophthora infestans* склала 30 6 літрів на гектар.

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

35 1. Композиція, яка містить НУТд, причому зазначений НУТд містить рідку фракцію, отриману в результаті ферментації НУТб і НУТс з використанням HQE (патентне позначення депозиту АТСС РТА-10861), причому зазначений НУТб містить рідку фракцію, отриману в результаті ферментації хітиновмісних членистоногих з використанням HQE, а зазначений НУТс містить

тверду фракцію, отриману в результаті ферментації хітиновмісних членистоногих з використанням HQE.

2. Композиція за п. 1, яка додатково містить щонайменше один з НУТа, НУТb і НУТс, причому зазначений НУТа містить композицію, що включає патентне позначення депозиту ATCC PTA-10973.

3. Композиція за п. 1, яка додатково містить два або більше з НУТа, НУТb і НУТс, причому зазначений НУТа містить композицію, що включає патентне позначення депозиту ATCC PTA-10973.

4. Композиція за п. 1, яка додатково містить НУТа, НУТb і НУТс, причому зазначений НУТа містить композицію, що включає патентне позначення депозиту ATCC PTA-10973.

5. Спосіб, який включає обробку ґрунту, насіння, саджанців або листя рослин за допомогою компонентів композицій за будь-яким з пп. 1-4.

6. Спосіб, який включає обробку ґрунту, насіння, саджанців або листя рослин за допомогою НУТd, причому зазначений НУТd містить рідку фракцію, отриману в результаті ферментації НУТb і НУТс з використанням HQE (патентне позначення депозиту ATCC PTA-10861), причому зазначений НУТb містить рідку фракцію, отриману в результаті ферментації хітиновмісних членистоногих з використанням HQE, а зазначений НУТс містить тверду фракцію, отриману в результаті ферментації хітиновмісних членистоногих з використанням HQE.

7. Спосіб за п. 6, який додатково включає обробку ґрунту, насіння, саджанців або листя рослин за допомогою щонайменше одного з НУТа, НУТb і НУТс, причому зазначений НУТа містить композицію, що включає патентне позначення депозиту ATCC PTA-10973.

8. Спосіб за п. 6, який додатково включає обробку ґрунту, насіння, саджанців або листя рослин за допомогою двох або більше з НУТа, НУТb і НУТс, причому зазначений НУТа містить композицію, що включає патентне позначення депозиту ATCC PTA-10973.

9. Спосіб за п. 6, який додатково включає обробку ґрунту, насіння, саджанців або листя рослин за допомогою НУТа, НУТb і НУТс, причому зазначений НУТа містить композицію, що включає патентне позначення депозиту ATCC PTA-10973.

10. Спосіб за будь-яким з пп. 6-9, який **відрізняється** тим, що один або більше з НУТа, НУТb, НУТс і НУТd застосовують у різний час.

11. Спосіб, який включає змішування НУТd зі щонайменше одним з НУТа, НУТb і НУТс, з утворенням суміші.

12. Спосіб за п. 11, який додатково включає обробку ґрунту, листя, насіння або саджанців за допомогою зазначеної суміші.

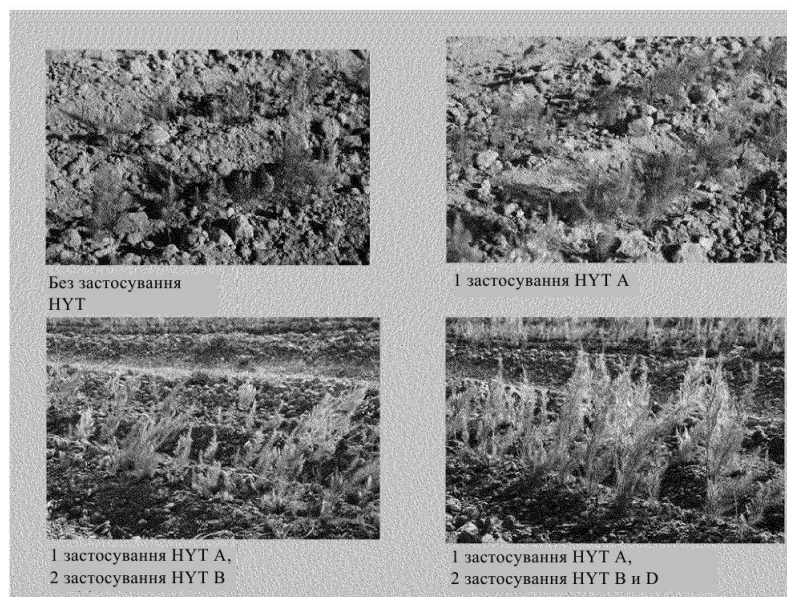
13. Оброблений ґрунт, який включає ґрунт, оброблений за допомогою композиції за будь-яким з пп. 1-4.

14. Спосіб, який включає висадку насіння, саджанців або рослин в оброблений ґрунт за п. 13.

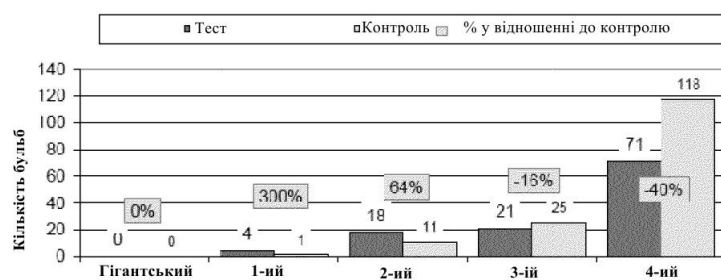
15. Оброблена рослина, насіння або саджанці, що включають рослину, насіння або саджанці, оброблені за допомогою композиції за будь-яким з пп. 1-4.



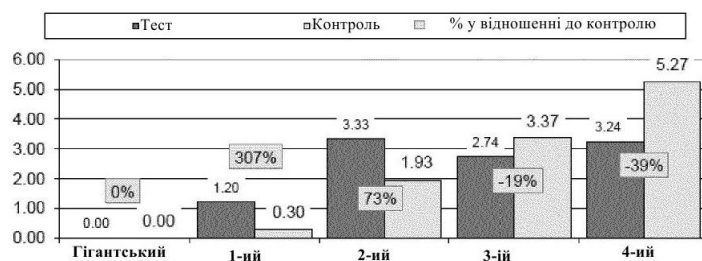
Фіг.1



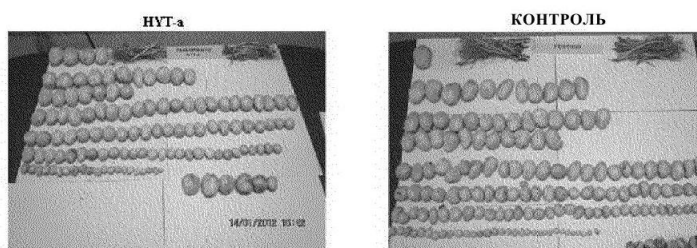
Фіг.2



Фіг.3



Фіг.4



Фіг.5

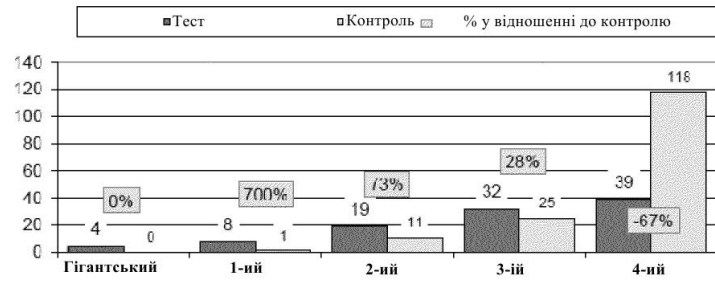


Fig. 6

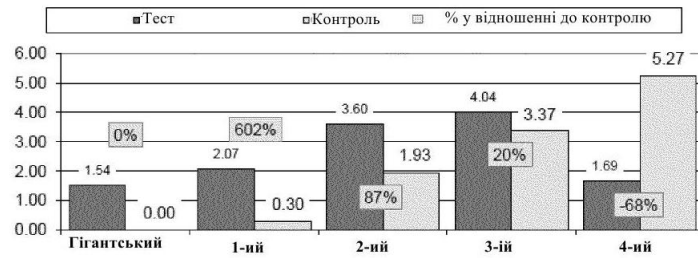
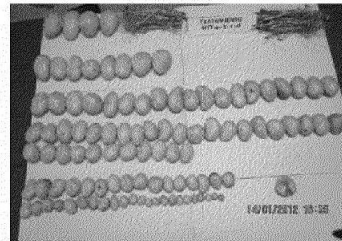


Fig. 7

НУТ-а-а-а-а



НУТ-а

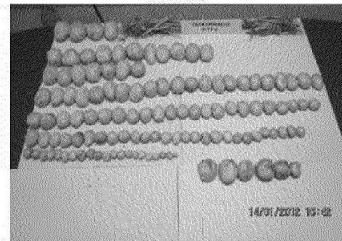
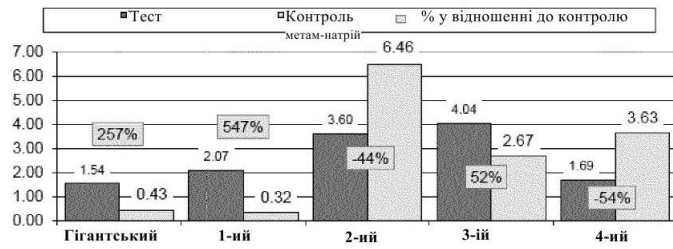


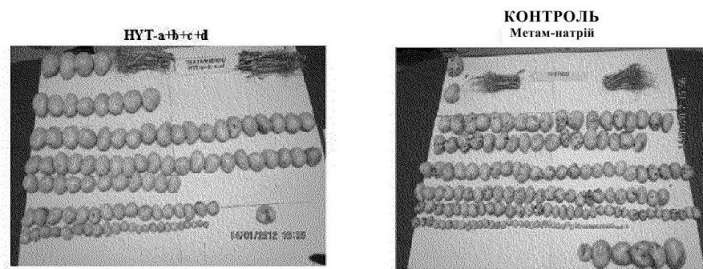
Fig. 8



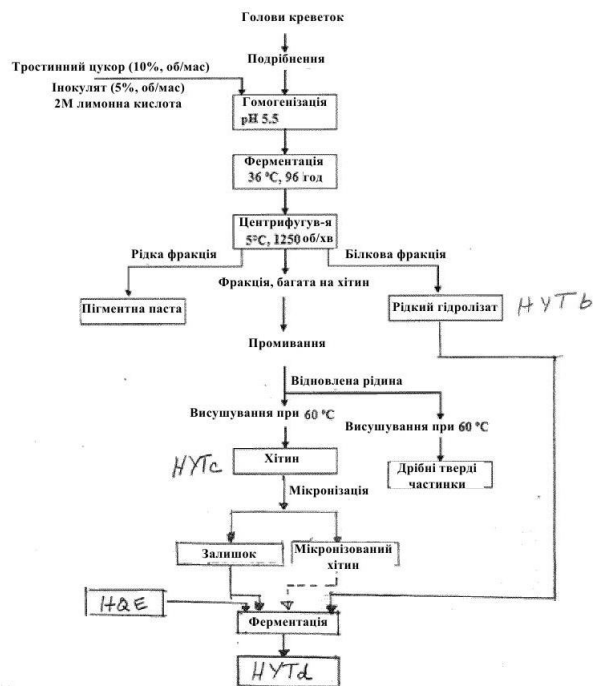
Fig. 9



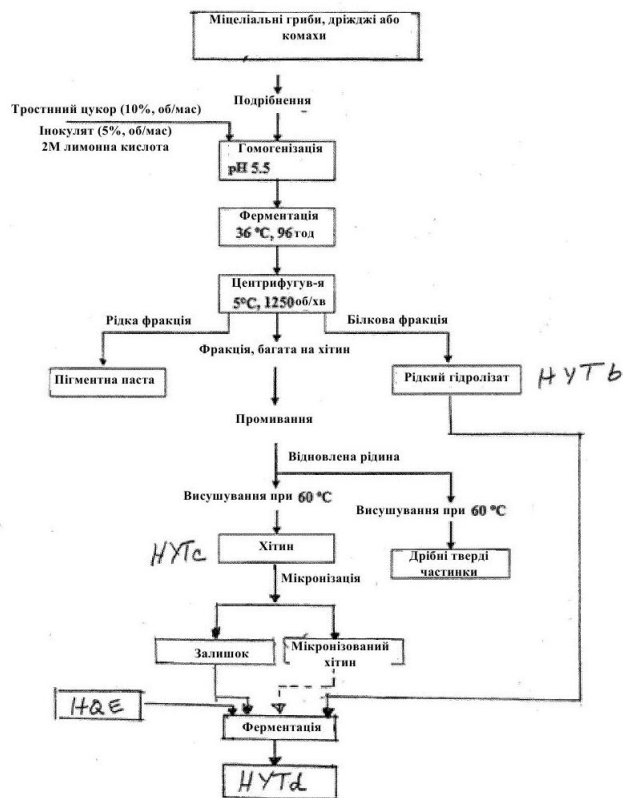
Фіг.10



Фіг.11



Фіг.12



Фіг.13