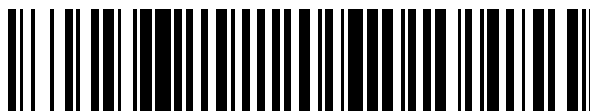


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 259**

51 Int. Cl.:

C05D 3/02 (2006.01)

C05D 5/00 (2006.01)

C05D 9/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2009** **E 09740399 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012** **EP 2328850**

54 Título: **Utilización de una composición mineral sólida para aumentar la fertilidad de un suelo de cultivo o de pradera**

30 Prioridad:

28.07.2008 FR 0855169

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

18.04.2013

73 Titular/es:

**P. R. P. HOLDING (100.0%)
31-33 Rue Falguière
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**MORA, PHILIPPE;
MIAMBI, EDOUARD;
ROY, VIRGINIE;
GIUSTI, STÉPHANIE;
BLIN, DIDIER;
VEYRIER, THIBAUT y
DARIDON, BRUNO**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 401 259 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

Utilización de una composición mineral sólida para aumentar la fertilidad de un suelo de cultivo o de pradera.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la agricultura y de la horticultura, y más precisamente al campo de las composiciones fertilizantes utilizadas en particular en agricultura, horticultura, arboricultura o en pradera de crianza.

10 **Técnica anterior**

La utilización de composiciones orgánicas o minerales que están dispersas en la superficie de los suelos de cultivo con el fin de aumentar la fertilidad es bien conocida en el estado de la técnica.

15 Así, una pluralidad de composiciones fertilizantes orgánicas o minerales son conocidas y utilizadas desde hace mucho tiempo en la agricultura, la horticultura y la arboricultura.

Para ser fértil, un suelo debe comprender un equilibrio óptimo de constituyentes orgánicos y de constituyentes minerales.

20 Hoy en día no existe definición alguna de las características que permitan calificar de manera unívoca la fertilidad de un suelo.

25 Sin embargo, una medición de la actividad biológica de los organismos animales, de los organismos vegetales y de los microorganismos contenidos en un suelo se tiene en cuenta de manera creciente con el fin de materializar la capacidad de regeneración del suelo, que está en relación con sus propiedades de fertilidad. Se puede citar por ejemplo unos ensayos de fertilidad de un suelo basados en la medición de la producción de dióxido de carbono por una muestra representativa de dicho suelo.

30 Según otros estudios, la calidad de un suelo, y por lo tanto sus propiedades de fertilidad, están, por lo menos en parte, relacionadas con la actividad enzimática de dicho suelo, que refleja en particular su actividad microbiana.

35 El estudio del impacto de los métodos de fertilización sobre la microflora y sobre las actividades enzimáticas del suelo es un enfoque clásico para las materias fertilizantes orgánicas (abono compuesto, estiércol, purín, paja, abonos verdes, etc.) ya que estas materias constituyen una fuente directa de nutrimentos, fuentes de carbono y de nitrógeno para los microorganismos del suelo.

Algunos trabajos muestran que la microflora de los suelos agrícolas es menor en los planos cuantitativos y cualitativos que en los suelos forestales originales correspondientes.

40 El estudio de la microflora del suelo se puede realizar mediante diferentes métodos, que engloban la extracción total por fumigación-extracción, la medición de la actividad respiratoria o mineralizante global del suelo, la citometría de flujo, la extracción y el cultivo de la microflora total revivificable, el análisis de marcadores específicos de ciertas poblaciones tales como los ácidos grasos, los esteroides tal como el ergosterol, los perfiles metabólicos en microplacas, el análisis de actividades enzimáticas extraídas del suelo, o también las técnicas más recientes tales como la extracción de los ácidos nucleicos totales del suelo (metagenoma) y después la amplificación específica de los genes que codifican los ARN ribosómicos (16S para las bacterias o 18S para los hongos) mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), seguida de un análisis por DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) de los fragmentos amplificados.

50 Se considera comúnmente en la técnica anterior que las actividades enzimáticas pueden constituir un índice importante de la actividad biológica de un suelo, debido a que las reacciones enzimáticas están implicadas en la dinámica de reciclaje de los elementos nutritivos y en la transferencia de energía hacia los organismos vegetales multicelulares.

55 Se admite que las reacciones enzimáticas están estrechamente asociadas a la calidad de fertilidad de un suelo, debido a que las reacciones enzimáticas realizan la conversión de formas no metabolizables de ciertos nutrimentos en formas directamente asimilables por las plantas y por la biomasa microbiana. En particular, las enzimas del suelo participan en la descomposición y en la síntesis de sustancias orgánicas importantes para el crecimiento de los vegetales, que no están sintetizadas por los vegetales en sí.

60 En otras palabras, la actividad enzimática refleja la intensidad y la naturaleza de los procesos bioquímicos que se realizan en la matriz del suelo. De esta manera, la actividad enzimática constituye un indicador de la capacidad biológica de un suelo para realizar los procesos bioquímicos que son importantes para el mantenimiento de sus propiedades de fertilidad.

Para fertilizar los suelos, la adición de materia orgánica exógena (purín, abono compuesto, estiércol, lodo) aporta una biodiversidad a corto y medio plazo, pero la composición de la microflora parece transferirse hacia una "composición de equilibrio" inicial después de un periodo de varias semanas o meses tras el aporte del fertilizante orgánico (Plassart, P., ISME 11th International Symposium on Microbial Ecology, 20-25 de agosto, 2006, Vienna, Austria *et al.* 2006). Existen numerosos trabajos relativos a la microflora y a la dinámica de descomposición de las materias orgánicas aportadas al suelo o también sobre los lodos procedentes de desechos orgánicos urbanos ricos en metales pesados.

Los trabajos anteriores publicados que se refieren a los efectos de las materias fertilizantes minerales sobre la microflora y sobre las actividades enzimáticas del suelo son mucho más raros y los estudios disponibles están sobre todo centrados en los fertilizantes nitrogenados (Enwall, K. *et al.*, Applied and Environmental Microbiology 2005, 71, 12, 8335-8343), en el impacto de los metales pesados (Gremion, F., Tesis nº 2862, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, 2003), en las consecuencias de dosis de oligoelementos acumuladas en los suelos agrícolas por una fertilización sostenida y frecuente, como en el caso del cobre que es y ha sido muy utilizado en las formulaciones fitosanitarias, en particular sobre la vid. Se pueden citar asimismo algunos trabajos relativos a la adición de compuestos minerales tales como el yeso y la ferrihidrita cuyo impacto se ha evaluado sobre las poblaciones de metanogénesis en el suelo de arrozales (Lueders, T. *et al.* Applied and Environmental Microbiology 2002, 68, 5, 2484-2494).

Existe sin embargo una necesidad constante en el estado de la técnica de unas composiciones destinadas a mantener o aumentar la fertilidad de un suelo, que poseen unas propiedades ventajosas sobre la actividad enzimática de dicho suelo.

Sumario de la invención

La presente invención tiene por objeto la utilización de una composición mineral sólida que comprende la fórmula (I) siguiente:

- Carbonato de calcio	del 4,58% al 77,8%
- Dolomita	del 3,85% al 69,29%
- Cloruro de sodio	del 5,7% al 12,4%
- Lignosulfato	del 4,25% al 8,49%
- Sulfato de potasio	del 0,37% al 2,44%
- Óxido de magnesio	del 0,01% al 0,07%
- Azufre elemental	del 0,009% al 0,066%

consistiendo los porcentajes anteriores en los porcentajes en peso de cada uno de los compuestos, con respecto al peso total de materia seca de dicha composición mineral,

para aumentar la fertilidad de un suelo provocando el aumento de por lo menos una actividad enzimática contenida en dicho suelo, seleccionada de entre (i) la fosfatasa, (ii) la β -xilosidasa, (iii) la α -glucosidasa y (iv) la β -glucosidasa.

Descripción de las figuras

La figura 1 ilustra los resultados de medición de las actividades enzimáticas de diversos suelos. En las figuras 1A a 1G, se ilustran las mediciones de diversas actividades enzimáticas de un suelo con cobertura vegetal y lombrices de tierra, respectivamente en ausencia de la composición mineral de fórmula (I) (barra de la izquierda) y con tratamiento por la composición mineral de fórmula (I) (barra de la derecha). En las ordenadas, la actividad enzimática se expresa en unidad de actividad por gramo de suelo seco y por hora. La figura 1A ilustra la medición de la actividad enzimática global. La figura 1B ilustra la medición de la actividad enzimática fosfatasa ácida. La figura 1C ilustra la medición de la actividad enzimática fosfatasa alcalina. La figura 1D ilustra la medición de la actividad enzimática β -glucosidasa. La figura 1E ilustra la medición de la actividad enzimática β -xilosidasa. La figura 1F ilustra la medición de la actividad enzimática α -glucosidasa. La figura 1G ilustra la medición de la actividad enzimática N-acetilglucosaminidasa.

La figura 2A representa el círculo de las correlaciones de las actividades enzimáticas medidas.

La figura 2B representa la proyección de los objetos (los diferentes microsomas) sobre los ejes 1 y 2 de la figura 2A.

La figura 3 representa un cliché de un gel de electroforesis sobre gel en gradiente desnaturizante (DGGE). Pista de la izquierda: suelo sin cobertura vegetal y sin lombrices de tierra. Pista de la derecha: el mismo suelo tratado con la composición mineral de fórmula (I).

La figura 4 representa un cliché de un gel de electroforesis sobre gel en gradiente desnaturizado (DGGE). Pista de la izquierda: suelo sin cobertura vegetal y sin lombrices de tierra. Pista del medio: suelo que comprende una cobertura vegetal sin lombrices de tierra. Pista de la derecha: el mismo suelo que comprende una cobertura vegetal

sin lombrices de tierra, tratado con la composición mineral de fórmula (I).

La figura 5 representa un cliché de un gel de electroforesis sobre gel en gradiente desnaturalizado (DGGE). Pista de la izquierda: suelo sin cobertura vegetal y sin lombrices de tierra. Pista del medio: suelo sin cobertura vegetal y que comprende lombrices de tierra. Pista de la derecha: el mismo suelo sin cobertura vegetal y que comprende lombrices de tierra, tratado con la composición mineral de fórmula (I).

La figura 6 representa un cliché de un gel de electroforesis sobre gel en gradiente desnaturalizado (DGGE). Pista de la izquierda: suelo sin cobertura vegetal y sin lombrices de tierra. Pista del medio: suelo que comprende una cobertura vegetal y que comprende lombrices de tierra. Pista de la derecha: el mismo suelo que comprende una cobertura vegetal y unas lombrices de tierra, tratado con la composición mineral de fórmula (I).

La figura 7 representa un dendrograma de similitudes de los perfiles de poblaciones bacterianas encontradas en los diferentes suelos ensayados, realizado en base a unos perfiles de bandas de migración en DGGE que están representados en las figuras 3 a 6.

La figura 8 representa un cliché de un gel de electroforesis sobre gel en gradiente desnaturalizante (DGGE). Pista "S": suelo sin cobertura vegetal y sin lombrices de tierra. Pista "S+V": suelo "S" sin cobertura vegetal y que comprende lombrices de tierra. Pista "S+M": suelo "S" tratado con la composición mineral de fórmula (I). Pista "S+P": suelo "S" con cobertura vegetal y sin lombrices de tierra. Pista "S+V+M": suelo "S+V" tratado con la composición mineral de fórmula (I). Pista "S+V+P": suelo "S" con cobertura vegetal y que comprende unas lombrices de tierra. Pista "S+P+M": suelo "S+P" tratado con la composición mineral de fórmula (I). Pista "S+V+P+M": suelo "S+V+P" tratado con la composición mineral de fórmula (I).

La figura 9 representa una reconstrucción filogenética de la división TM7 basada en el ADN_r 16S, mediante el método de Neighbor Joining, que incluye los grupos bacterianos secuenciados a partir de ciertas bandas de migración del gel DGGE representado en la figura 8 y las secuencias devueltas de los bancos de datos.

La figura 10 ilustra el efecto de la composición mineral de fórmula (I) sobre la producción de la biomasa vegetal. En las ordenadas: medición de la producción de la biomasa vegetal, expresada en gramos de peso seco. La figura 10A ilustra la comparación de producción de biomasa vegetal por (i) un suelo con cobertura vegetal y sin lombrices de tierra (barra de la izquierda) y (ii) el mismo suelo tratado con la composición mineral de fórmula (I). La figura 10B ilustra la comparación de producción de biomasa vegetal por (i) un suelo sin cobertura vegetal y que comprende unas lombrices de tierra (barra de la izquierda) y (ii) el mismo suelo tratado con la composición mineral de fórmula (I).

Descripción detallada de la invención

Se ha mostrado según la invención que la adición de una composición mineral específica a un suelo provoca una modificación importante del perfil de las actividades enzimáticas de dicho suelo y aumenta su fertilidad.

En particular, se ha mostrado según la invención que la adición de dicha composición mineral específica a un suelo provoca un aumento de la actividad de ciertas enzimas tales como la fosfatasa, la β -xilosidasa, la α -glucosidasa y la β -glucosidasa, que son conocidas por ser importantes para las propiedades de fertilidad.

Así, la presente invención se refiere a la utilización de una composición mineral sólida que comprende la fórmula (I) siguiente:

- Carbonato de calcio	del 4,58% al 77,8%
- Dolomita	del 3,85% al 69,29%
- Cloruro de sodio	del 5,7% al 12,4%
- Lignosulfato	del 4,25% al 8,49%
- Sulfato de potasio	del 0,37% al 2,44%
- Óxido de magnesio	del 0,01% al 0,07%
- Azufre elemental	del 0,009% al 0,066%

consistiendo los porcentajes anteriores en los porcentajes en peso de cada uno de los compuestos, con respecto al peso total de materia seca de dicha composición mineral,

para aumentar la fertilidad de un suelo provocando el aumento de por lo menos una actividad enzimática contenida en dicho suelo, seleccionada de entre (i) la fosfatasa alcalina, (ii) la β -xilosidasa, (iii) la α -glucosidasa y (iv) la β -glucosidasa.

Preferentemente, la composición mineral sólida anterior comprende también una combinación de uno o varios compuestos adicionales seleccionados de entre el bicarbonato de sodio, el sulfato de hierro, el sulfato de manganeso, el óxido de zinc, el yoduro de potasio, el sulfato de cobre y el ácido bórico.

Preferentemente, el o los compuestos adicionales anteriores están presentes en la composición mineral en las cantidades siguientes:

- 5 - del 0,007% al 0,158% de bicarbonato de sodio,
- del 0,0009% al 0,0434% de sulfato de hierro,
- del 0,004% al 0,040% de sulfato de manganeso,
- del 0,0006% al 0,0040% de óxido de zinc,
- del 0,0004% al 0,0032% de yoduro de potasio,
- 10 - del 0,0002% al 0,0040% de sulfato de cobre, y
- del 0,0006% al 0,0040% de ácido bórico,

consistiendo los porcentajes anteriores en los porcentajes en peso de cada uno de los compuestos, con respecto al peso total de materia seca de dicha composición mineral.

15 Una composición mineral preferida que se utiliza según la invención comprende la constitución siguiente:

- 45,78% de carbonato de calcio,
- 20 - 38,49% de dolomita,
- 9,52% de cloruro de sodio,
- 5,66% de lignosulfato,
- 25 - 0,49% de sulfato de potasio,
- 0,014 de óxido de magnesio,
- 30 - 0,015% de azufre elemental, y
- las cantidades apropiadas de un compuesto o de una combinación de por lo menos dos compuestos seleccionados de entre el bicarbonato de sodio, el sulfato de hierro, el sulfato de manganeso, el óxido de zinc, el yoduro de potasio, el sulfato de cobre y el ácido bórico, de manera que dicha composición mineral comprenda el 100% en peso de constituyentes,
- 35

consistiendo los porcentajes anteriores en los porcentajes en peso de cada uno de los compuestos, con respecto al peso total de materia seca de dicha composición mineral.

40 Preferentemente, para fertilizar un suelo, se añade la composición mineral de fórmula (I) a razón de una cantidad de por lo menos 0,01 kgs por m² hasta 0,10 kg/m².

45 Según otro aspecto, la presente invención se refiere asimismo a un procedimiento para fertilizar un suelo que comprende por lo menos una etapa durante la cual se añade a dicho suelo una cantidad de composición mineral de fórmula (I) de por lo menos 0,02 a 0,04 kg por m².

En general, la composición mineral de fórmula (I), que es una composición sólida que se presenta ventajosamente en forma de granulados, se añade al suelo a fertilizar simplemente por dispersión, encima del suelo a tratar.

50 La fosfatasa, que cataliza la hidrólisis de las uniones fosfoésteres, produce la liberación de fosfato inorgánico que puede ser después utilizado como metabolito por las plantas. Se admite que esta enzima desempeña un papel crítico en los ciclos metabólicos del fosfato e influye sobre el crecimiento de las plantas. Así, cuanto mayor es la actividad fosfatasa de un suelo, en particular la actividad fosfatasa alcalina de un suelo, mayor capacidad incrementada para favorecer el crecimiento de plantas posee suelo, incluso cuando el contenido de dicho suelo en fosfato inorgánico es reducido.

60 La β -xilosidasa, que interviene en la hidrólisis del xilano (hemicelulosa) permite proporcionar a la microflora del suelo unos compuestos nutritivos que, una vez mineralizados, son asimilados por la planta. La actividad β -xilosidasa interviene en las últimas etapas de degradación del xilano, que es uno de los componentes principales de la pared de las células vegetales y que se encuentra en los restos vegetales contenidos en los suelos.

65 La actividad β -glucosidasa se considera como un indicador de la calidad de los suelos. La actividad β -glucosidasa, que interviene en la hidrólisis de la celulosa es importante para las propiedades de fertilidad de un suelo ya que la celulosa es cuantitativamente el compuesto más abundante encontrado en los suelos. La β -glucosidasa desempeña un papel importante en los suelos, ya que esta enzima es responsable de la hidrólisis de β -glucósidos variados

presentes en los restos vegetales en descomposición encontrados en los suelos. La degradación de la celulosa está considerada como uno de los procesos mayores del ciclo de carbono en el suelo. La descomposición microbiana de la celulosa en el suelo es un proceso complejo que hace intervenir por lo menos tres tipos de enzimas, respectivamente las endo- β -1,4-glucanasas, las exo- β -1,4-glucanasas y las β -1,4-glucosidasas. La actividad β -1,4-glucosidasa hidroliza los productos de degradación de la celulosa, tal como el disacárido (celobiosa), en moléculas de glucosa directamente asimilables por los microorganismos del suelo. Así, la descomposición de la celulosa contenida en los suelos está completa sólo en presencia de actividad β -glucosidasa. La actividad β -glucosidasa está considerada como un indicador de la renovación ("turnover") de la biomasa vegetal.

La actividad α -glucosidasa hidroliza los oligosacáridos procedentes de la degradación del almidón presente en los restos vegetales en descomposición contenidos en los suelos generando la D-glucosa como producto final, que es directamente asimilable por los microorganismos del suelo.

En el sentido de la invención, se entiende por "suelo" más particularmente un suelo de cultivo o un suelo de pradera.

Los suelos de cultivo engloban los suelos cultivados que se utilizan en todos los campos de la agricultura vegetal, incluyendo la horticultura, la arboricultura y el cultivo de la vid.

Los suelos de praderas engloban los suelos no cultivados que se utilizan en particular para proporcionar un material vegetal fresco o seco para la alimentación de los animales, en particular del ganado.

Globalmente, los suelos están generalmente constituidos de una combinación de elementos minerales y de elementos orgánicos, que comprenden unas proporciones variables de arena, arcilla(s), limo(s), cal de cualquier grosor, humus, restos orgánicos, microorganismos, aire y agua.

Por "actividad enzimática" se entiende la actividad catalítica de transformación de un compuesto de sustrato dado en un producto final de la reacción catalítica.

La medición de las actividades enzimáticas de los tipos (i) fosfatasa, (ii) β -xilosidasa, (iii) α -glucosidasa y β -glucosidasa se puede realizar según cualquier técnica bien conocida por el experto en la materia.

Ventajosamente, se pone en suspensión una pequeña muestra de suelo en un volumen adaptado de agua destilada con el fin de realizar un extracto bruto que se utiliza después para las dosificaciones enzimáticas específicas.

Las dosificaciones enzimáticas pueden estar realizadas de manera convencional, por incubación de una fracción alícuota del extracto bruto de tierra a ensayar con el sustrato de la actividad enzimática durante un tiempo determinado, y después, tras la parada de la reacción enzimática, cuantificación del producto de la reacción catalítica, en general mediante lectura con espectrofotómetro.

A título ilustrativo, se pueden utilizar los sustratos siguientes:

- para la actividad fosfatasa: sal di- o tri-fosfato de 4-nitrofenilo,
- para la actividad β -glucosidasa: 4-nitrofenil β -D-glucopiranosidasa,
- para la actividad β -xilosidasa: 4-nitrofenil β -xilósido, y
- para la actividad α -glucosidasa: 4-nitrofenil α -glucósido.

Para ensayar la actividad N-acetil-glucosaminidasa, se puede utilizar el 4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminido.

Cuando se utilizan los sustratos anteriores, la cuantificación del producto final de la reacción catalítica se realiza mediante espectrofotometría con determinación de la densidad óptica (D.O.) a la longitud de onda de 405 nanómetros.

Se ha mostrado según la invención que la adición de una composición mineral de fórmula (I) a un suelo (i) que comprende una cobertura vegetal en ausencia de lombrices o a un suelo (ii) que comprende una cobertura vegetal y que comprende unas lombrices, induce a un aumento significativo de la actividad fosfatasa alcalina. Se ha demostrado así que, con la adición de la composición mineral de fórmula (I) al tipo de suelo (i) anterior, se encuentra una actividad fosfatasa alcalina diez veces superior a la actividad fosfatasa alcalina determinada para un suelo de tipo (i) desprovisto de la composición de fórmula (I). Con un suelo de tipo (ii) anterior, la actividad fosfatasa alcalina está generalmente aumentada en un factor de por lo menos dos veces, con respecto a la actividad fosfatasa determinada para un suelo de tipo (ii) de igual composición, pero desprovista de la composición mineral de fórmula (I).

Se ha mostrado asimismo según la invención que la adición de una composición mineral de fórmula (I) a un suelo (i) que comprende una cobertura vegetal con ausencia de lombrices, a un suelo (ii) que comprende una cobertura vegetal y que comprende unas lombrices, o a un suelo (iii) sin cobertura y que comprende unas lombrices, induce un

aumento significativo de la actividad β -xilosidasa. Se ha mostrado así que, con la adición de la composición mineral de fórmula (I) al tipo de suelo (i), se encuentra una actividad β -xilosidasa por lo menos tres veces superior a la actividad β -xilosidasa determinada para un suelo de tipo (i) desprovisto de la composición mineral de fórmula (I). Se ha demostrado asimismo que la actividad de la β -xilosidasa determinada para un suelo de tipo (ii) después de la adición de la composición mineral de fórmula (I) es por lo menos dos veces superior a la actividad β -xilosidasa determinada para un suelo de tipo (ii) desprovisto de la composición mineral de fórmula (I). Con un suelo de tipo (iii) anterior, la actividad β -xilosidasa está generalmente aumentada en un factor de por lo menos cinco veces superior a la actividad β -xilosidasa determinada para un suelo de tipo (iii) desprovisto de la composición mineral de fórmula (I).

Se ha mostrado asimismo según la invención que la adición de una composición mineral de fórmula (I) a un suelo (i) con cobertura vegetal y con ausencia de lombrices, (ii) a un suelo que comprende una cobertura vegetal y que comprende unas lombrices o (ii) a un suelo sin cobertura vegetal y que comprende unas lombrices, induce un aumento significativo de la actividad α -glucosidasa cuatro veces superior a la actividad α -glucosidasa determinada para un suelo de tipos (i), (ii), (iii) desprovistos de la composición mineral de fórmula (I).

Se ha mostrado asimismo que la adición de una composición mineral de fórmula (I) a un suelo (ii) que comprende una cobertura vegetal y que comprende unas lombrices, induce un aumento significativo de la actividad α -glucosidasa por lo menos una vez y media superior a la actividad β -glucosidasa, determinada para un suelo (ii) desprovisto de la composición mineral de fórmula (I).

En referencia a la figura 2B, se ha mostrado según la invención que la composición de fórmula (I) ejerce un efecto estadísticamente significativo sobre el aumento de las actividades enzimáticas (i) a (iv) definidas anteriormente, sea cual sea el tipo de suelo tratado.

Sin querer estar vinculado a cualquier teoría, el solicitante cree que el incremento del potencial enzimático del suelo que es provocado por la adición de la composición de fórmula (I) permite mejorar los procesos telúricos de mineralización de la materia orgánica.

Como se ha descrito anteriormente, la composición mineral de fórmula (I) induce, al nivel de la actividad enzimática, principalmente el aumento de actividades enzimáticas denominadas "menores" desde el punto de vista de su relación cuantitativa con la actividad enzimática global del suelo, tales como la β -xilosidasa, la α -glucosidasa o también la fosfatasa alcalina. Se recuerda sin embargo que la composición mineral de fórmula (I) induce asimismo el aumento de actividades enzimáticas denominadas "mayores" desde el punto de vista de su relación cuantitativa con la actividad enzimática global del suelo, tal como la β -glucosidasa.

Sin querer estar vinculado a cualquiera teoría, el solicitante cree que la composición mineral de fórmula (I) provoca un "reequilibrio" del perfil enzimático del suelo por incremento de ciertas actividades enzimáticas, sin provocar al mismo tiempo una reducción significativa de las demás actividades enzimáticas.

Además, los resultados obtenidos según la invención muestran que el efecto de la composición de fórmula (I) sobre las actividades enzimáticas varía según los tipos de suelo a los que se añade esta formulación, lo cual muestra que el efecto de esta formulación sobre las actividades enzimáticas depende de la composición cualitativa y/o cuantitativa en organismos vivos, en particular de la flora y de la fauna contenidas en el suelo tratado, incluyendo los microorganismos, en particular los microorganismos bacterianos y fúngicos. Estos resultados muestran que la composición mineral de fórmula (I) posee un efecto de estimulación de las actividades biológicas de los suelos.

Como se muestra en los ejemplos, los aumentos que se observan para cada una de las actividades enzimáticas (i) fosfatasa alcalina, (ii) β -xilosidasa, (iii) α -glucosidasa y (iv) β -glucosidasa en los suelos de tipo (i), (ii) y (iii) en presencia de la composición mineral de fórmula (I) no significa que la adición de la composición de fórmula (I) provoque un aumento general de las actividades enzimáticas de los suelos tratados. Así, se muestra que la actividad enzimática global de un suelo tratado con una composición mineral de fórmula (I) es sustancialmente idéntica a la actividad enzimática global del mismo suelo no tratado con la composición mineral de fórmula (I). La actividad enzimática global de un suelo se puede determinar por cuantificación de la degradación no específica del sustrato de fluoresceína diacetato (FDA).

Sin embargo, el incremento de las propiedades de fertilidad de un suelo tratado con una composición de fórmula (I), debido al aumento específico de las actividades enzimáticas (i) a (iv) anteriores se ilustra por el hecho de que la adición de una composición de fórmula (I) induce un aumento de la producción de biomasa vegetal aérea y de raíces de por lo menos 1,5 veces con respecto a un suelo idéntico pero no tratado con la composición de fórmula (I). Así, se ha mostrado que la adición de una composición de fórmula (I) a un suelo (i) que comprende una cobertura vegetal en ausencia de lombrices induce un incremento de la producción de biomasa vegetal aérea y de raíces de por lo menos 1,5 veces, tal como se calcula en base al peso seco de biomasa vegetal después de la cosecha. Se ha mostrado asimismo que la adición de una composición de fórmula (I) a un suelo (ii) que comprende una cobertura vegetal y que comprende unas lombrices induce un aumento de la producción de biomasa vegetal aérea y de raíces de por lo menos dos veces, tal como se calcula en base al peso seco de biomasa después de la cosecha.

De manera general, el solicitante ha observado que el incremento de la calidad de los suelos que se obtiene por la adición de la composición mineral de fórmula (I) se ilustra por un incremento de la biomasa vegetal aérea y de raíces para el cultivo de la mayoría de las plantas denominadas "de gran cultivo" y unos cultivos de hortalizas y también en arboricultura y en el cultivo de la vid.

Además, se muestra en los ejemplos que la composición mineral de fórmula (I) provoca asimismo una modificación del perfil de las poblaciones bacterianas presentes en el suelo.

Un estudio del perfil de las poblaciones bacterianas por análisis del ADN ribosómico 16S por la técnica de electroforesis sobre gel de gradiente desnaturalizante (DGGE por "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis") ha mostrado que la adición de una composición de fórmula (I), sea cual sea el tipo de suelo estudiado, induce (i) un incremento de la abundancia relativa de ciertos taxones bacterianos, lo cual se visualiza sobre el gel de electroforesis por un aumento de la densidad relativa de coloración de una o varias bandas de migración y (ii) una reducción de la abundancia relativa de otros taxones bacterianos, lo cual se visualiza por una reducción de la densidad relativa de coloración de una o varias otras bandas de migración.

Así, los resultados presentados en los ejemplos muestran que la composición mineral de fórmula (I) provoca unas modificaciones detectables importantes de las relaciones de predominio de los diferentes taxones bacterianos, con respecto a los suelos no tratados por la composición mineral de fórmula (I).

Como se ilustra en los ejemplos, cuando se comparan los perfiles de migración de bandas que corresponden a los fragmentos de ADNr 16S obtenidos por DGGE, se muestra que la composición mineral de fórmula (I) induce los cambios más importantes de los perfiles de poblaciones bacterianas en los suelos que no comprenden un entorno de flora y fauna compleja, en particular en los suelos que comprenden una cobertura vegetal y/o unas lombrices, entendiéndose que el efecto de la composición de fórmula (I) se incrementa con la complejidad del suelo tratado.

Se ha realizado asimismo un análisis por secuenciación de los fragmentos de ADNr 16S que corresponden a ciertas bandas predominantes en DGGE que se encuentran respectivamente en cada uno de los diferentes suelos de complejidad biológica distinta, no tratados o tratados con una composición mineral de fórmula (I). Después, a partir de la información de secuencia, se ha determinado el parentesco filogenético de las bacterias mayoritarias correspondientes. Debido al hecho de que numerosas bacterias telúricas no son cultivables y no son, por lo tanto, identificables, la comparación de las secuencias del solicitante con los datos publicados no resultó siempre de una identificación taxonómica. Sin embargo, los resultados muestran que para un suelo (i) que comprende una cobertura vegetal sin lombrices y para un suelo (iii) sin cobertura vegetal y que comprende unas lombrices, la composición mineral de fórmula (I) favorece el predominio de poblaciones bacterianas emparentadas con las bacterias de la división TM7 que se encuentran a nivel de la rizosfera y en las turberas. De manera general, se desprende del análisis después de la secuenciación del ADNr 16S que la adición de la composición mineral de fórmula (I) induce grandes modificaciones en la abundancia relativa de los taxones bacterianos, favoreciendo el desarrollo de algunos y frenando el desarrollo de otros, incluso de taxones bacterianos que son mayoritarios en un suelo idéntico pero no tratado por la composición de fórmula (I). En todos los casos, la composición mineral de fórmula (I) provoca unas modificaciones del perfil de las poblaciones bacterianas cuya importancia aumenta con la complejidad biológica del suelo. Ilustrativamente, se observan unas modificaciones cada vez más importantes del perfil de las poblaciones bacterianas inducidas por la composición de fórmula (I), cuando se pasa de un suelo sin cobertura vegetal y sin lombrices a un suelo que comprende una cobertura vegetal y que comprende unas lombrices.

Los resultados de los ejemplos muestran por lo tanto que la acción de la composición mineral de fórmula (I) difiere, tanto en el plano cuantitativo como cualitativo, en función del tipo de entorno telúrico, en particular según la presencia o la ausencia de una cobertura vegetal, y/o según la presencia o la ausencia de lombrices.

De manera general, las modificaciones del perfil de las actividades enzimáticas y del perfil de las poblaciones bacterianas que son inducidas por la adición de una composición mineral de fórmula (I) constituyen unos indicadores del incremento de la fertilidad de un suelo que está ilustrado por el incremento que se ha observado de la producción de biomasa vegetal aérea y de raíces.

La presente invención está además ilustrada por los ejemplos siguientes.

Ejemplos

A. Materiales y métodos de los ejemplos

A.1. Materiales

El suelo es un suelo agrícola extraído en la región de Tardenois (región de Picardía, Francia), de tipo limo-arcilloso. Las extracciones de las muestras de suelo se han efectuado de manera aleatoria. El suelo se ha secado después a temperatura ambiente y después se ha tamizado sobre un tamiz que tiene un tamaño de mallas de 2 mm.

La planta utilizada para realizar la cobertura vegetal del suelo es un raigrás, especie muy ampliamente difundida comercialmente. Se puede utilizar un raigrás comercializado por la compañía Jardiland (Logne, Francia).

- 5 Las lombrices de tierra (lombrices) utilizadas durante este experimento son unas lombrices de tierra anécicas que pertenecen a la especie *Nicodrilus giardi* (asimismo denominada *Allolobophora terrestris* o *Aporrectodea terrestris*).

La composición mineral de fórmula (I) se ha añadido a la dosis equivalente a 200 kg/ha en cada muestra de ensayo de tierra, salvo en las muestras de tierra control.

- 10 A.2. Realización de las muestras de tierra control (microcosmos control) y de las muestras de ensayo (microcosmos de ensayo).

- 15 Los microcosmos están constituidos por macetas de plástico que contienen cada una 1 kg de tierra seca. Ésta se re-humidifica a su capacidad en el campo.

En las macetas en cuestión, los gusanos se añaden a razón de una biomasa de 6 g/kg de tierra seca.

- 20 Se utiliza un gramo de semilla de raigrás para sembrar las macetas en cuestión.

Los gusanos se añaden a las macetas cuando las plántulas de raigrás tienen una altura de aproximadamente 5 cm.

- 25 El experimento está constituido por tres repeticiones (o serie) que corresponden cada una a 8 modalidades, es decir un total de 24 microcosmos.

- 30 Estos microcosmos están colocados a temperatura ambiente (20 a 23°C) durante 1,5 meses. Después de este lapso de tiempo, se cosecha el raigrás (parte aérea y parte subterránea de las raíces) y después se coloca en la estufa para la medición del peso seco. Para cada maceta, se extraen dos lotes de muestras de suelo con el fin de proceder a los análisis bioquímicos y moleculares.

- A.3. Análisis enzimáticos

- 35 Se resuspende un gramo de suelo en 5 ml de agua destilada a 4°C. Esta suspensión constituye el extracto bruto para las dosificaciones enzimáticas.

1. Dosificaciones de las heterosidasas (PNP)

Preparación de los agentes reactivos:

- 40 * Na_2CO_3 : se disuelven 2 g en 100 ml de agua destilada

- * sustrato enzimático:

- 45 Las disoluciones se han realizado a razón de 80 mg de sustrato disuelto en 10 ml de agua destilada

- 4-nitrofenilfosfato di(tri) sal) (PNP-fosfato). Este sustrato permite poner en evidencia la actividad de las fosfatasas enzimas que intervienen en la mineralización del fosfato orgánico.

- 50 - 4-nitrofenil β -D-glucopiranosido (PNP- β -glucósido). La hidrólisis de este sustrato permite dosificar la actividad de la β -glucosidasa que interviene en las etapas últimas de la degradación de la celulosa.

- 55 - 4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminidina (PNP N-acetil- β -D-glucosaminida). La quitina es un sustrato muy ampliamente esparcido en los suelos y procede de la cutícula de los artrópodos y entra en la composición membranaria de numerosos hongos. La degradación de este sustrato por las quitinasas y la N-acetil-glucosaminidasa constituye una etapa previa a la liberación de los azúcares aminos que intervienen al mismo tiempo en el ciclo del carbono y del nitrógeno.

- 60 - 4-nitrofenil β -xilósido, (PNP- β -D-xilósido), es hidrolizado por la β -xilosidasa que interviene en las últimas etapas de degradación del xilano, uno de los componentes principales de la pared de las células vegetales.

- 4-nitrofenil α -glucósido (PNP- α -D-glucósido). La α -glucosidasa que hidroliza este sustrato es una de las enzimas que intervienen en la degradación del almidón.

- 65 Estas disoluciones se conservan a 4°C en unos frascos ahumados.

- * Tampón fosfato pH 5: 24,3 ml de ácido cítrico 0,1 M se mezclan con 25,7 ml de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a 0,2 M.
- * Tampón borato pH 9: 10 ml de HCl a 0,1 M se mezclan con 90 ml de borato de sodio a 0,1 M.

5 Las disoluciones de tampón se conservan a 4°C.

Dosificación en microplacas:

10 Las dosificaciones se realizan en microplacas. Para cada enzima (fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, β -glucosidasa, α -glucosidasa y β -xilosidasa) se realizan un blanco, tres sustratos control, tres enzimas control y tres ensayos de la manera siguiente.

* Blanco:

- 100 μl de agua destilada
- 25 μl de tampón Mc Ilvain pH 5 o 9 según la enzima dosificada.

* Sustrato control:

- 50 μl de agua destilada
- 25 μl de tampón fosfato pH 5 o borato pH 9 para la fosfatasa alcalina
- 50 μl de sustrato PNP

* Enzima control:

- 50 μl de agua destilada
- 25 μl de tampón Mc Ilvain pH 5 o 9
- 50 μl de disolución enzimática (tierra)

* Ensayo

- 50 μl de sustrato PNP
- 25 μl de tampón Mc Ilvain pH 5 o 9
- 50 μl de disolución enzimática (tierra)

Esta dosificación se realiza en una primera placa de fondo cónico y que es incubada durante 2 h en una estufa a 37°C bajo agitación.

Después de la incubación se añaden 75 μl de Na_2CO_3 al 2% en cada pocillo.

La microplaca se centrifuga después a 2500 rpm durante 10 minutos. Para cada pocillo, se transfieren 50 μl de sobrenadante a una segunda placa cuyos pocillos contienen 250 μl de Na_2CO_3 al 2%. Después de la agitación manual, la microplaca se lee con espectrofotómetro a 405 nm contra el blanco.

A partir de una gama patrón efectuada previamente, la relación entre la DO y la cantidad de fenol se da mediante la fórmula siguiente:

$$X (\mu\text{g de fenol}) = \text{D.O. calculada} \times 1,14,$$

siendo D.O. calculada = D.O ensayo - (D.O. control sustrato + D.O. control enzimático)

La actividad enzimática se define como la cantidad de fenol liberado/g de suelo/h.

2. Dosificación de la actividad microbiana por la FDA (Fluoresceína diacetato)

Preparación de los agentes reactivos

- * FDA: se alicuotan 0,3 g de FDA disuelto en 10 ml de acetona en unos frascos de vidrio a razón de 1 ml por frasco. Esta disolución conservada a -20°C constituye la disolución madre. Esta disolución madre se diluye extemporáneamente al 1/10^a antes de proceder a las dosificaciones.

- * Tampón fosfato pH 7: 6,5 ml de ácido cítrico al 0,1 M + 43,6 ml de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a 0,2 M.

Dosificación en microplacas

Las dosificaciones se realizan en microplacas. Para cada dosificación se realizan un blanco, tres sustratos control, tres enzimas control y tres ensayos de la manera siguiente,

* Blanco:

- 150 µl de H₂O
- 50 µl de tampón fosfato pH7

* Enzima control:

- 50 µl de H₂O
- 50 µl de tampón Mac Ilvain pH 7
- 100 µl de suelo

• Sustrato control:

- 100 µl de H₂O
- 50 µl de tampón Mac Ilvain pH 7
- 50 µl de FDA (disolución hija)

• Ensayo:

- 100 µl de suelo
- 50 µl de tampón Mac Ilvain pH 7
- 50 µl de FDA

La microplaca se coloca en la estufa a 37°C durante 2 horas. Después, se centrifuga durante 10 minutos a 2500 rpm.

Un volumen de 100 µl de sobrenadante de cada uno de los pocillos se deposita en los pocillos de una segunda placa de fondo redondo, en la que se habrán depositado previamente 100 µl de tampón Mac Ilvain pH 7 helado (4°C). La lectura de la placa al espectrofotómetro se efectúa a una longitud de onda de 490 nm contra el blanco.

Para el FDA, la actividad enzimática se expresa en cantidad de fluoresceína/g de suelo/h.

La realización de una gama patrón ha permitido establecer la relación entre la DO y la cantidad de fluoresceína (µg) según la fórmula siguiente:

$$X (\mu\text{g de fenol}) = \text{D.O. calculada} \times 0,086$$

3. Análisis moleculares

Con el objetivo de secuenciar los genes del ADN ribosómico 16S específicos de las poblaciones bacterianas predominantes y/o de interés para los diferentes tratamientos aplicados al suelo, los ADN se han re-extraído a partir de las muestras de suelo contenidos en el alcohol.

3.1. Extracción del ADN del suelo

El método seleccionado para extraer el ADN del suelo se basa en la utilización de un tampón CTAB (*Cetyl-Trimethyl-Ammonium Bromide*). Se extraen 500 mg de cada una de las 24 muestras de suelo (8 modalidades: S, S+P, S+M, S+V, S+V+P, S+P+M, S+V+M, S+V+M+P x 3 repeticiones) y mezclados con 1000 µl de tampón de extracción CTAB, en unos tubos que contienen unas bolas de cerámica, de sílice y de vidrio (Lysing Matrix E, MP Biomedicals). La lisis de las células se efectúa con la ayuda de un homogeneizador de tipo FastPrep-24 (MP Biomedicals) durante 45s a 6,5 m/s. Las muestras se incuban después en baño maría a 65°C durante 1h. La extracción y la purificación de los ácidos nucleicos se efectúan con la ayuda del Fenol Cloroformo Isoamil (24:24:1) y de Cloroformo Isoamil (24:1), asociados a unos *Phase Lock Gel Tubes* (VWR). El ADN se precipita después con PEG (polietilenglicol), los residuos se lavan con etanol al 70° y se recogen en 50 µl de tampón EB (Tris HCl). Los ADN extraídos para las 3 repeticiones se reúnen para cada una de las 8 modalidades, con el fin de tener suficiente ADN para las reacciones subsecuentes. El ADN está así cuantificado y su pureza evaluada (ausencia de ácidos húmicos, de proteínas) en el espectrofotómetro (Nanodrop).

3.2. Amplificación de los fragmentos de ADNr 16S bacteriano por PCR

Los PCR (*Polymerase Chain Reactions*) se efectúan utilizando un termociclador de tipo TC-3000 (Techne) con unos cebadores bacterianos universales. Para cada una de las reacciones, se añaden 0,25 μ M de cada uno de los cebadores, 10 μ l de tampón PCR 10X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs (*deoxyNucleoside TriPhosphates*), 6U de Taq polimerasa (Invitrogen), 15-80 ng de ADN matriz y agua estéril para un volumen final de 100 μ l. Los cebadores utilizados para la PCR son 518r (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG- 3' - SEC ID n° 1) y GC-338f (5'-CGC CCG CCG GCG GCG GGC GGC GGC GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3' - SEC ID n° 2) y amplifican precisamente la región variable V3 del ADN ribosómico 16S conservada en las bacterias (aproximadamente 200 pb). La secuencia rica en GC (GC-clamp) enlazada al extremo 5' del cebador GC-338f impide la completa desnaturalización de las dobles cadenas de ADN durante la separación de los fragmentos PCR por la DGGE. La amplificación por PCR empieza por una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 32 ciclos de 1) desnaturalización a 94°C durante 30 s, 2) hibridación a 54°C durante 45 s y 3) extensión a 72°C durante 1 min. 30 s. Se termina por una extensión final a 72°C durante 20 minutos.

3.3. Visualización y cuantificación de los productos PCR

Los productos de PCR se depositan sobre gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe (Invitrogen) a una concentración de 1X. Los fragmentos PCR se visualizan sobre placa UV y se cuantifican con la ayuda de un marcador de tamaño cuantitativo, de tipo SmartLadder (Eurogentec).

3.4. DGGE

El análisis DGGE (electroforesis sobre gel de poliacrilamida en presencia de un gradiente de agente desnaturalizante) se efectúa sobre un sistema *DCode Universal Mutation Detection* (BioRad). Se cargan las muestras de productos PCR (100 μ l, es decir aproximadamente 500 ng) sobre un gel de poliacrilamida 8% en TAE 0,5X (Tris-ácido acético-EDTA). Para obtener un gel de poliacrilamida que presenta un gradiente lineal de desnaturalización de 30-70%, se mezclan 11,2 ml de una disolución al 0% (acrilamida 20 ml, TAE 50X 2 ml y H_2O csp 100 ml) y 4,8 ml de una disolución al 100% (acrilamida 20 ml, TAE 50X 2 ml, formamida 40 ml, urea 42 g y H_2O csp 100 ml) para la disolución *Low* (30%) así como 4,8 ml de la disolución al 0% y 11,2 ml de la disolución al 100% para la disolución *High* (70%). La electroforesis se efectúa a 60°C durante 16 h a 75V. Después de la migración, el gel se revela en un baño de bromuro de etidio y se fotografía bajo UV. Las bandas de interés se cortan y extraen con la ayuda de un escalpelo.

3.5. Secuenciación de las bandas de interés

El ADN contenido en las bandas se eluye individualmente haciendo reposar las bandas cortadas durante una noche a 4°C en 50 μ l de agua ultra-pura. Se utilizan 2 μ l de eluido para reamplificar las bandas individualmente por PCR según el protocolo descrito anteriormente. Con el fin de verificar la presencia de una banda única en cada uno de los productos PCR, los productos PCR son depositados sobre un gel de DDGE (gradiente 30-50%) al lado de la muestra original. La operación se repite hasta obtener una banda única para cada producto PCR. Los productos de PCR puros son enviados después para secuenciación (Gexbyweb, Genome Express).

A.4. Análisis estadísticos de los perfiles de las bandas de migración DGGE

1. Análisis gráfico y estadístico de los perfiles

La fotografía del gel se recupera y se analiza gracias al programa Quantity One V4.6.5 (Biorad), que permite la detección automática de las bandas sobre el perfil DGGE. Una matriz binaria representativa de las bandas del perfil se coloca de la manera siguiente: la presencia de una banda se codifica '1', su ausencia se codifica '0', con respecto a las bandas detectables en todas las muestras de un mismo gel. A partir de esta matriz binaria, se genera una matriz de distancias utilizando un coeficiente de similitud. En este caso, se utiliza el coeficiente de Dice ($S_{Dice} = 2N_{AB}/(N_A+N_B)$) en el que N_A y N_B son respectivamente el número de bandas de las muestras A y B, y N_{AB} el número de bandas comunes). La matriz de distancias se analiza después mediante un método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pairwise Grouping with Mathematical Average) y Neighbor Joining, que permite inferir un dendrograma que describe de manera gráfica las distancias entre todas las diferentes muestras.

2. Análisis molecular y filogenético de las secuencias

Los cromatogramas de secuencias se recuperan y se visualizan con el programa Chromas LITE versión 2.01, que permite también una correlación manual de las secuencias. Las secuencias son comparadas con todas las secuencias disponibles en los bancos de datos NCBI por análisis BLAST, que devuelve las secuencias que tienen los resultados más altos de identidad con las secuencias ensayadas. Un análisis suplementario de asignación taxonómica se realiza con el Ribosomal Database Project II Classifier.

Las secuencias obtenidas son después alineadas con 47 secuencias representativas de la división bacteriana TM7, 2 secuencias TM6, 2 secuencias del grupo I Termita, y 2 secuencias de bacterias Green sin azufre disponibles en las bases de datos NCBI, con la ayuda del programa CLUSTALW. La alineación (140 pb) se corrige manualmente con el programa SEAVIEW. Un árbol de Neighbor Joining se genera finalmente con el programa MEGA4, con 1000 repeticiones de "bootstrap".

B. Resultados

Ejemplo 1: Efecto de la composición de fórmula (I) sobre las actividades enzimáticas de los suelos

El conjunto de los resultados de medición de las actividades enzimáticas se presenta en la figura 1, respectivamente para: la actividad enzimática global (figura 1A), la actividad de la fosfatasa ácida (figura 1B), la actividad de la fosfatasa alcalina (figura 1C), la actividad de la β -glucosidasa (figura 1D), la actividad de la β -xilosidasa (figura 1E), la actividad de la α -glucosidasa (figura 1F) y la actividad de la N-acetil-glucosaminidasa (figura 1G).

1. A/ En presencia de suelo

Sea cual sea la enzima estudiada, no se ha demostrado ningún aumento significativo entre los suelos sin cobertura vegetal y sin lombrices, tratados o no con la composición mineral de fórmula (I). Asimismo, no se ha medido ningún efecto deletéreo.

1. B/ En presencia del suelo y del raigrás

La degradación del FDA no está afectada por la presencia de la composición mineral de fórmula (I). Las actividades de la fosfatasa ácida, de la β -glucosidasa y de la N-acetil-glucosaminidasa en presencia de la composición mineral de fórmula (I) son superiores a las medidas en los controles. Sin embargo, debido a la variabilidad, las diferencias observadas no son significativas al riesgo α del 5%. Por el contrario, las actividades de la fosfatasa alcalina, de la α -xilosidasa y de la α -glucosidasa han aumentado de manera significativa con unos factores de multiplicación que son respectivamente de 10, 4 y 4.

Estos resultados muestran que en presencia de una cobertura vegetal:

- 1/ existe un efecto de la composición mineral de fórmula (I) sobre la actividad enzimática del suelo
- 2/ que este efecto se refiere a las enzimas cuyas actividades eran menores en términos de intensidad.

1. C/ En presencia del suelo y de lombrices de tierra

Cuando la composición mineral de fórmula (I) se añade a un suelo en presencia de gusanos (lombrices), dos enzimas presentan un aumento significativo de su actividad. Estas enzimas son la β -xilosidasa, cuya actividad está multiplicada por 6, y la α -glucosidasa, que de una actividad de 25 en el control pasa a 112 unidades g de suelo $\text{sec}^{-1} \text{h}^{-1}$. Las actividades de las demás enzimas ensayadas no están modificadas.

1. D/ En presencia de lombrices de tierra y de raigrás

En presencia de lombrices de tierra y de raigrás, la composición de fórmula (I) permite incrementar en un factor de 3 la actividad de la fosfatasa alcalina, en un factor de 1,5 la actividad de la β -glucosidasa, en un factor de 2,5 la actividad de la β -xilosidasa y en un factor de 4 la actividad de la α -glucosidasa.

1. E/ Análisis en componentes principales

Este análisis tiene por objetivo validar estadísticamente la presencia de un efecto de la composición mineral de fórmula (I) sobre las actividades enzimáticas del suelo en función de las diferentes modalidades ensayadas (presencia de planta y/o de lombrices de tierra, etc.).

El círculo de las correlaciones representado en la figura 2A muestra que el eje 1 que representa el 35% de la varianza total está definido por las actividades de la fosfatasa alcalina, de la α -glucosidasa, de la β -xilosidasa y por la degradación del FDA. El eje 2, que corresponde al 21% de la varianza, está descrito a su vez por las actividades de la fosfatasa ácida, de la N-acetilglucosaminidasa y de la α -glucosidasa.

Como se representa en la figura 2B, la proyección de los objetos sobre estos dos ejes muestra una oposición clara entre los tratamientos con la composición mineral de fórmula (I) y los diferentes controles. Existe por lo tanto realmente un efecto de la composición de fórmula (I) sobre el perfil enzimático del suelo ensayado.

Los resultados de las mediciones de actividades enzimáticas representados en las figuras 1A a 1G se describen más precisamente en la tabla 1 al final de la presente descripción. En dicha tabla 1:

- "S" significa un suelo sin cobertura vegetal y sin lombrices de tierra,
- "S+M" significa el suelo "S" tratado con la composición mineral de fórmula (I),
- "S+V" significa un suelo sin cobertura vegetal y que comprende unas lombrices de tierra,
- "S+V+M" significa un suelo "S+V" tratado con la composición mineral de fórmula (I),
- "S+P" significa un suelo que comprende una cobertura vegetal sin lombrices de tierra,
- "S+P+M" significa un suelo "S+P" tratado con la composición mineral de fórmula (I),
- "S+V+P" significa un suelo que comprende una cobertura vegetal y que comprende unas lombrices de tierra, y
- "S+V+P+M" significa un suelo "S+V+P" tratado con una composición mineral de fórmula (I).

Este estudio ha permitido demostrar de manera experimental que la adición de la composición mineral de fórmula (I) permite incrementar significativamente la producción de biomasa vegetal.

Se ha mostrado asimismo que se ha confirmado también la adición de la composición mineral de fórmula (I) que permite incrementar el potencial enzimático del suelo, con el fin de optimizar el proceso de mineralización de la materia orgánica, como lo muestra el análisis en componentes principales. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que el efecto beneficioso de la composición mineral de fórmula (I) depende

- 1/ de la enzima considerada. Así, las dos actividades mayores, a saber la de la fosfatasa ácida y de la β -glucosidasa, que caracterizan este suelo no son las enzimas influenciadas principalmente por la composición mineral de fórmula (I). En efecto, este efecto beneficioso se observa para unas enzimas menores (menores no por su importancia en el funcionamiento del suelo, sino en términos de actividad), tales como la β -xilosidasa, la α -glucosidasa o la fosfatasa alcalina. Esto significa que la composición mineral de fórmula (I) permite "reequilibrar" el perfil enzimático del suelo sin generar bajada de las demás actividades.
- 2/ de las modalidades de presencia. En efecto, según la modalidad ensayada (presencia o ausencia de raigrás/lombrices de tierra) las respuestas obtenidas son diferentes. El efecto de la composición mineral de fórmula (I) depende por lo tanto de los organismos vivos (plantas/animales). Este resultado sugiere en gran medida que la composición mineral de fórmula (I) actúa como un catalizador que estimula ciertas actividades biológicas del suelo.

La demostración de una modificación de los perfiles enzimáticos del suelo, en particular de las vías de degradación de los agro-polímeros de sacáridos por la composición mineral de fórmula (I) plantea entonces la cuestión de saber si esta modificación está subordinada a una modificación de las comunidades microbianas. Es el objeto del ejemplo 2 siguiente.

Ejemplo 2: Efecto de la composición mineral de fórmula (I) sobre las poblaciones bacterianas del suelo

Se han comparado los análisis DGGE de los fragmentos de los genes del ARNr 16S amplificados por PCR, obtenidos para los 8 microcosmos para visualizar los cambios en la diversidad genética de las comunidades bacterianas, después de los diferentes tratamientos. La inspección visual de los perfiles DGGE revela que el número de poblaciones bacterianas no está sustancialmente modificado para los tratamientos aplicados al suelo. Por el contrario, las poblaciones microbianas predominantes no parecen ser de ninguna manera las mismas según los tratamientos aplicados al suelo.

A/ Impacto de la disolución mineral PRP en presencia de suelo únicamente

Los resultados están representados en la figura 3.

La adición de la composición mineral de fórmula (I) provoca unas modificaciones en la estructura de las comunidades bacterianas con respecto al suelo solo (perfil S). Las poblaciones predominantes del suelo solo (en rojo) no son más mayoritarias en el suelo con adición de la composición (I) (las bandas desaparecen o son más débiles). Sin embargo, no siempre se interpreta la desaparición/disminución de intensidad de las bandas como la desaparición de los taxones en cuestión. En efecto, puede reflejar simplemente el cambio de densidad relativa entre poblaciones, en el que el aumento de ciertas poblaciones puede llevar a otras bajo el límite de detección de la DGGE. En el suelo con adición de la composición (I), una población bacteriana está representada mayoritariamente (en verde), a pesar de estar ya presente en el suelo solo. Esto puede sugerir o bien un desarrollo de esta población en presencia de la composición (I), o bien una regulación de las poblaciones que eran predominantes en el suelo

solo. Esta última hipótesis estaría confirmada por el hecho de que el perfil es más homogéneo, en términos de intensidades de las bandas, para la muestra de suelo tratado con la composición (I) que actuaría por lo tanto como un modulador.

5 B/ Impacto de la formulación mineral PRP en presencia de raigrás

Los resultados están representados en la figura 4.

10 En presencia de raigrás (perfil S+P), la estructura de las comunidades bacterianas está muy modificada con respecto al suelo solo. Entre las poblaciones predominantes, se puede observar una población ampliamente mayoritaria (banda 9) que no fue detectada en el suelo solo.

15 Añadiendo la composición (I) en presencia de raigrás, ya no se observan más estas poblaciones mayoritarias. La banda E, que aparece como la más intensa en este perfil, corresponde a una población que o bien ha podido ser activada en presencia de la composición (I), o bien se vuelve predominante debido a la regulación de las poblaciones que eran mayoritarias en presencia de raigrás solo.

20 También en este caso, aparece por lo tanto claramente un efecto modulador de la composición (I) sobre las comunidades bacterianas del suelo.

C/ Impacto de la formulación mineral PRP en presencia de lombrices de tierra

Los resultados están representados en la figura 5.

25 En presencia de lombrices de tierra (perfil S+V), las comunidades bacterianas del suelo parecen asimismo ser remodeladas. A pesar de que un número importante de bandas son comunes, la proporción relativa de las poblaciones está muy modificada. Se observa en particular la presencia de tres poblaciones mayoritarias en presencia de lombrices de tierra (bandas 1, 4 y 7).

30 La adición de la composición (I) en presencia de gusanos es el origen de una estructura de las comunidades todavía diferente. Si se encuentran unas poblaciones comunes al perfil S+V, su proporción relativa parece modificada. En efecto, las poblaciones que corresponden a las bandas A y 6 son menos dominantes, y por el contrario la población que corresponde a la banda 3 se vuelve mayoritaria en presencia de composición (I). Esta banda 3 no corresponde a la banda C detectada en el perfil S+V (véanse las secuencias).

35 Aunque existen unas bandas intensas y por tanto unos grupos mayoritarios, en el conjunto del perfil en presencia de la composición (I) se constata que el efecto PRP se traduce por una mayor diversidad de comunidades microbianas con las densidades relativamente homogéneas. En este caso, se observa de nuevo un efecto modulador de la composición (I), incluso en presencia de lombrices de tierra.

40 D/ Impacto de la formulación mineral PRP en presencia de raigrás y de lombrices de tierra

Los resultados están representados en la figura 6.

45 La asociación raigrás y lombrices de tierra (perfil S+V+P) tiene un impacto sobre las comunidades bacterianas con respecto al suelo solo (perfil S). Las poblaciones que corresponden a las bandas D y 8 se vuelven mayoritarias. La otra población mayoritaria en la asociación gusanos/raigrás, corresponde a la banda 8.

50 La adición de la composición (I) en presencia de raigrás y de gusanos modifica mucho las comunidades bacterianas. Las poblaciones que corresponden a las bandas D y 8 ya no son mayoritarias y otra población (en verde, secuencia no obtenida) parece ser activada directamente por la composición (I) o aprovechar la regulación efectuada sobre las demás poblaciones. En este caso particular, el efecto modulador de la composición (I) observado para las demás modalidades está menos marcado.

55 **Ejemplo 3: Especificidad del efecto de la composición mineral de fórmula (I) sobre las poblaciones bacterianas mayoritarias**

El análisis de la similitud entre los tratamientos se ha efectuado teniendo en cuenta al mismo tiempo la presencia de las bandas (por lo tanto de las comunidades bacterianas) y de su intensidad (figura 7).

60 Este análisis podía presentar dos supuestos:

65 1º el efecto de la composición (I) está poco marcado. En este caso, el perfil bacteriano de un suelo sin la composición (I) debe presentar una fuerte similitud con el perfil bacteriano de un suelo idéntico tratado con la composición (I). En el dendrograma de similitud representado en la figura 7, estas dos modalidades están entonces agrupadas o poco alejadas.

2º el efecto de la composición (I) es muy significativo, y en este caso los perfiles bacterianos de los suelos tratados con la composición (I) presentan un bajo coeficiente de similitud con los perfiles bacterianos de los mismos suelos no tratados. Sus posiciones respectivas en el dendrograma están entonces relativamente alejadas.

El análisis representado gráficamente en la figura 7 muestra que el suelo (S) y el suelo solo tratado con la composición (I) (S+M) están presentes a nivel de un mismo grupo. Esto significa que la composición (I) sobre un suelo desprovisto de lombrices de tierra y de planta conlleva unas modificaciones relativamente moderadas en comparación con los otros tratamientos ensayados.

Por el contrario, el efecto de la composición (I) es muy marcado en lo que se refiere al suelo puesto en presencia de lombrices de tierra y de raigrás (S+V+P+M) ya que este tratamiento está muy alejado del conjunto de los otros tratamientos, en particular del tratamiento con lombrices de tierra/planta sin la composición (I) (S+V+P). Esto se observa también en el caso del suelo puesto en presencia de raigrás (S+P) ya que este último está relativamente alejado del suelo con el césped de tierra y la composición (I) (S+P+M). En el caso del suelo con las lombrices de tierra (S+V) con respecto al suelo con las lombrices de tierra y la composición (I) (S+V+M), el efecto, a pesar de no ser discutible, es sin embargo menos marcado.

Ejemplo 4: Ensayo de identificación por secuenciación de los fragmentos de ADN_r 16S que corresponden a las poblaciones bacterianas mayoritarias

A/ Presentación del gel DGGE que ha servido para la secuenciación

El gel DGGE presente en la figura 8 indica las diferentes bandas que se han extraído, purificado y después secuenciado. Estas bandas se han elegido debido a su fuerte intensidad relativa en el perfil. Se precisa que ciertas bandas mayoritarias no se han podido secuenciar debido a numerosas dificultades para purificarlas.

B/ Comparación de las secuencias de los pocillos suelo (S) + PRP (S+M)

En el suelo con adición de composición (I) (S+M), una población bacteriana está mayoritariamente representada (banda 15). El análisis BLAST acerca la secuencia de este grupo a la de un taxón bacteriano no cultivable, por lo tanto no identificable morfológicamente (número de acceso Genbank: EF 157158, porcentaje de identidad: 97%). Según el *Classifier* RDPII (accesible en particular a la dirección Internet siguiente: «<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier> »), esta población se emparenta con la división bacteriana TM7 con un porcentaje de asignación del 91%. Esta división, descrita recientemente, tiene unos miembros distribuidos muy ampliamente en el medio ambiente. En el suelo, se han puesto así en evidencia unas bacterias TM7 a nivel de la rizosfera y en turberas.

C/ Comparación de las secuencias de los pocillos suelo + raigrás (S+P)/ suelo+ + raigrás + PRP (S+P+M)

La secuenciación del ADN_r 16S de la banda 9 no permite identificar esta población muy ampliamente mayoritaria en el suelo en presencia de raigrás. En efecto, la secuencia más próxima dada por el análisis BLAST (número de acceso Genbank EU 134275, 99% de identidad) corresponde a un clon bacteriano no identificado, que procede de un suelo de pradera (tabla 2 siguiente).

Añadiendo la composición (I) en presencia de raigrás, la banda E aparece como la más intensa. La secuenciación del ADN_r 16S indica que la secuencia más próxima corresponde al número de acceso EU283406 (98% de identidad, población que procede de un lodo activado) (véase la tabla 2 al final de la presente descripción). Según el *Classifier* RDPII, esta población se emparenta con la división bacteriana TM7 con un porcentaje de asignación del 97%.

D/ Comparación de las secuencias de los pocillos suelo+ + gusanos (S+V)/suelo + gusanos + PRP (S+V+M)

En lo que se refiere al suelo en presencia de gusanos (S+V), el análisis molecular y la asignación taxonómica muestran que las tres poblaciones (bandas 1, 4, 7) se emparentan con la división bacteriana TM7 (secuencias respectivas más próximas: AN EU283406, 98% de identidad; AN AJ232811, 99% de identidad y AN AF269024, 99% de identidad) (tabla 2). El análisis filogenético (figura 2) confirma este emparejamiento. A pesar de que presenta una afinidad con la secuencia DQ 828869 (98% de identidad) que procede de un suelo agrícola, la población C no se ha podido unir a un grupo bacteriano identificado hoy en día.

En presencia de los gusanos y de la composición (I) (S+V+M) se encuentran unas poblaciones comunes al perfil S+V, pero su proporción relativa parece modificada. En efecto, por ejemplo, la población que corresponde a la banda A (idem 1, división TM7) es menos dominante en presencia de la formulación mineral PRP. Por otro lado, mientras que las poblaciones que corresponden a las bandas 1, 4 y 7 eran ampliamente mayoritarias en el perfil S+E, las poblaciones dominantes en el perfil (S+E+M) son las que corresponden a las bandas 6 (secuencia más próxima AN AF269024, 99%, división TM7) y 3 (secuencia más próxima: AN AY820689, 99% de identidad, división TM7).

E/ Comparación de las secuencias de los pocillos suelo + gusanos + raigrás (S+V+P/suelo + gusanos + raigrás + PRP (S+V+P+M))

- 5 En la muestra S+V+P, es interesante señalar que la población que corresponde a la banda D (predominante en el perfil S+V+P) es la misma (o es muy similar) que las de las bandas E (predominantes en el perfil S+P+M), 1 (predominante en el perfil S+V) y A (predominante en el perfil S+V+M), es decir unas bacterias emparentadas con la división TM7. La otra población mayoritaria en la asociación gusanos/raigrás (S+V+P) que corresponde a la banda 8, no se ha podido identificar molecularmente. La secuencia más próxima dada por BLAST es, en efecto, un clon bacteriano no identificado que procede de suelos asociados a álamos (AN EF020305, 97% de identidad) y la asignación taxonómica RDPII no permite acercar esta secuencia a una división.
- 10

- En la muestra con la formulación mineral PRP (S+V+P+M), las poblaciones que corresponden a las bandas D y 8 no son más mayoritarias y otra población (banda la más intensa) cuyo ADN se ha podido purificar parece estar activada directamente por la disolución mineral PRP o aprovechar la regulación efectuada sobre las otras poblaciones.
- 15

- Los resultados de biología molecular presentados en los ejemplos muestran indiscutiblemente que estas modificaciones de las actividades enzimáticas están relacionadas con unos cambios de las comunidades microbacterianas. Esto confirma por lo tanto que la composición mineral de fórmula (I) tiene una acción biológica. Pero esta acción biológica depende de organismos tales como las plantas y los gusanos que son conocidos por tener un efecto sobre la microflora telúrica a través de las esferas de influencias que crean (rizosfera y drilosfera). Las modificaciones de las comunidades microbianas resultan por lo tanto de un proceso doble, (i) la composición mineral de fórmula (I) por un lado y, (ii) de ciertos organismos, por otro lado.
- 20

25 Ejemplo 5: Efectos de la composición mineral de fórmula (1) sobre la producción de biomasa vegetal

Los resultados están representados en las figuras 10A y 10B.

- La producción de raigrás en presencia de la composición mineral de fórmula (I) permite una duplicación significativa de la biomasa en peso seco. En presencia de gusanos, se observa la misma tendencia.
- 30

Tabla 1: Síntesis de los resultados obtenidos

	S	S+M	S+P	S+P+M	S+V	S+V+M	S+P+V	S+P+V+M
Biomasa	Ø	Ø	0,89±0,03	1,49±0,08	Ø	Ø	0,42±0,01	0,85±0,05
Fosfatasa ácida	542,49±185,17	407,78±98,88	501,39±50,63	594,36±95,25	538,93±80,19	426,56±63,56	557,07±54,37	472,34±71,13
Fosfatasa alcalina	102,48±23,87	110,47±15,89	7,22±6,49	68,36±31,22	89,92±14,66	99,56±61,99	20,54±24,76	55,04±31,79
α-glucosidasa	42,61±39,62	103,75±35,52	16,23±8,13	68,61±9,32	28,41±16,23	113,52±18,64	25,49±26,99	105,27±61,00
β-glucosidasa	454,21±106,98	512,81±35,09	445,96±180,41	624,93±84,91	554,41±86,25	620,37±77,86	415,14±38,06	613,14±97,36
N-acetil-glucosaminidasa	153,60±51,81	91,32±27,90	117,45±28,83	148,40±14,69	106,41±12,39	114,91±33,63	160,19±136,54	179,60±14,45
β-xilosidasa	186,96±123,04	210,80±59,66	24,51±25,13	109,84±4,53	23,17±2,92	144,59±35,75	63,29±22,90	165,52±6,97
FDA	24,87±4,78	33,13±4,11	27,31±4,66	27,52±3,62	29,16±3,12	31,75±2,38	25,82±7,12	33,94±7,25

Tabla 2

Bandas(s)	Secuencias más emparentadas	% de identidad	Nº de acceso	Procedencia inicial	Clasificación RDPII	"Bootstrap" Estimación de confianza *
1, A, D, E	Bacteria no identificada	98%	EU283406	activated sludge from membrane bioreactor DQ828869	TM7 genera incertae sedis	99%
C	Bacteria no identificada	98%		agricultural soil from Switzerland	Unclassified bacterium	-
3	Bacteria no identificada	99%	AY820689	drilling fluid, China	TM7 genera incertae sedis	100%
4	Bacteria no identificada	99%	AJ232811	rhizoplane of Trifolium repens	TM7 genera incertae sedis	93%
15	Bacteria no identificada	97%	EF157158	heavy oil seeps of the Rancho La Breatar pits	TM7 genera incertae sedis	91%
6, 7	Bacteria no identificada	99%	AF269024	full-scale sewage treatment plant trembling	TM7 genera incertae sedis	100%
8	Bacteria no identificada	97%	EF020305	aspen rhizosphere soil from an undisturbed mixed	Unclassified bacterium	-
9	Bacteria no identificada	99%	EU134275	grass prairie preserve, Oklahoma	Unclassified bacterium	-

5 **Listado de secuencias**

<110> PROCEDES ROLAND PIGEON

10 <120> Utilización de una composición mineral sólida para incrementar la fertilidad de un suelo de cultivo o de pradera

<130> V928FR

<160> 2

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 17

20 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> cebador

<400> 1

attaccgcgg ctgctgg

17

30 <210> 2

<211> 60

<212> ADN

<213> secuencia artificial

35 <220>

<223> cebador

<400> 2

40 cgcccgccgc gcgcggcggg cggggcgggg gcacgggggg actcctacgg gaggcagcag

60

REIVINDICACIONES

1. Utilización de una composición mineral sólida que comprende la fórmula (I) siguiente:

- Carbonato de calcio	del 4,58% al 77,8%
- Dolomita	del 3,85% al 69,29%
- Cloruro de sodio	del 5,7% al 12,4%
- Lignosulfato	del 4,25% al 8,49%
- Sulfato de potasio	del 0,37% al 2,44%
- Óxido de magnesio	del 0,01% al 0,07%
- Azufre elemental	del 0,009% al 0,066%

5
consistiendo los porcentajes anteriores en los porcentajes en peso de cada uno de los compuestos, con respecto al peso total de materia seca de dicha composición mineral,

10
para incrementar la fertilidad de un suelo provocando el aumento de por lo menos una actividad enzimática contenida en dicho suelo, seleccionada de entre (i) la fosfatasa, (ii) la β -xilosidasa, (iii) la α -glucosidasa y (iv) la β -glucosidasa.

15
2. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha composición mineral sólida provoca un aumento de por lo menos 1,5 veces, y ventajosamente de por lo menos dos veces la actividad enzimática seleccionada de entre (i) la fosfatasa alcalina, (ii) la β -xilosidasa, (iii) la α -glucosidasa y la β -glucosidasa.

3. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha composición mineral sólida provoca un aumento de por lo menos dos veces la actividad fosfatasa.

20
4. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha composición mineral sólida provoca un aumento de por lo menos dos veces la actividad β -xilosidasa.

5. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha composición mineral sólida provoca un aumento de por lo menos dos veces la actividad α -glucosidasa.

25
6. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha composición mineral sólida provoca un aumento de por lo menos dos veces la actividad β -glucosidasa.

30
7. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha composición mineral sólida provoca unas modificaciones detectables de las relaciones de predominio de los taxones bacterianos presentes en el suelo, unos con respecto a los otros.

8. Utilización según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada porque dicha composición mineral sólida provoca un aumento de por lo menos 1,5 veces la producción de biomasa vegetal por dicho suelo.

35
9. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la composición mineral de fórmula (I) se añade al suelo a fertilizar a razón de una cantidad de por lo menos 0,01 kg por m², y hasta 0,10 kg/m², preferentemente entre 0,02 y 0,04 kg/m².

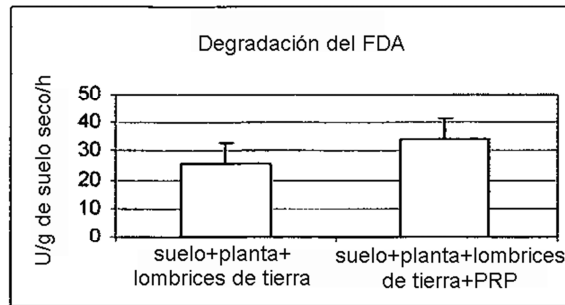


Figura 1A

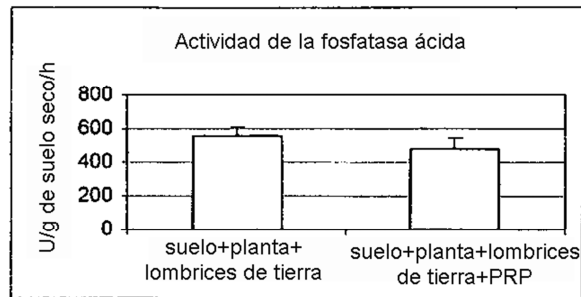


Figura 1B

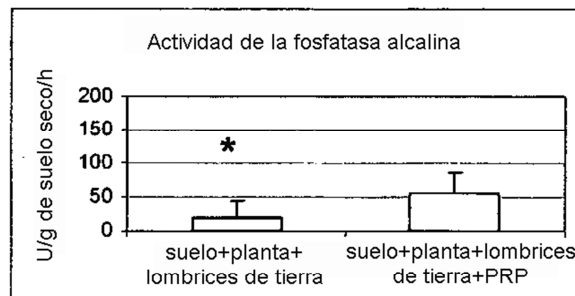


Figura 1C

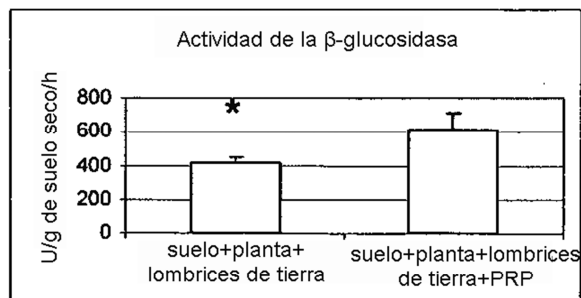


Figura 1D

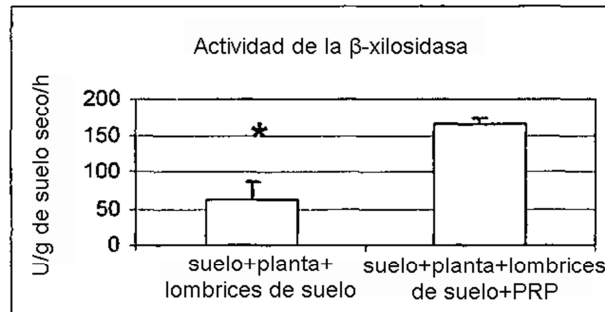


Figura 1E

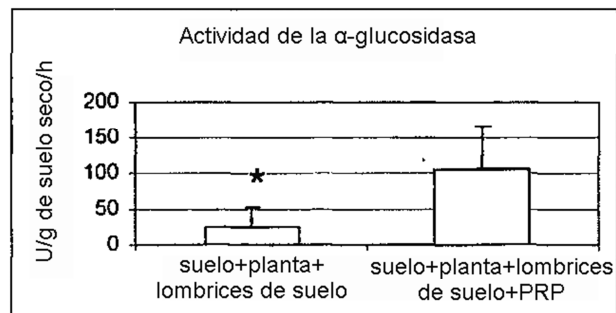


Figura 1F

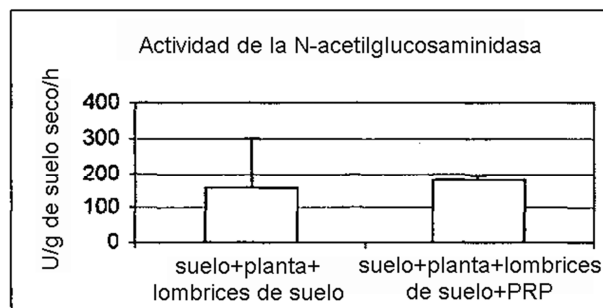
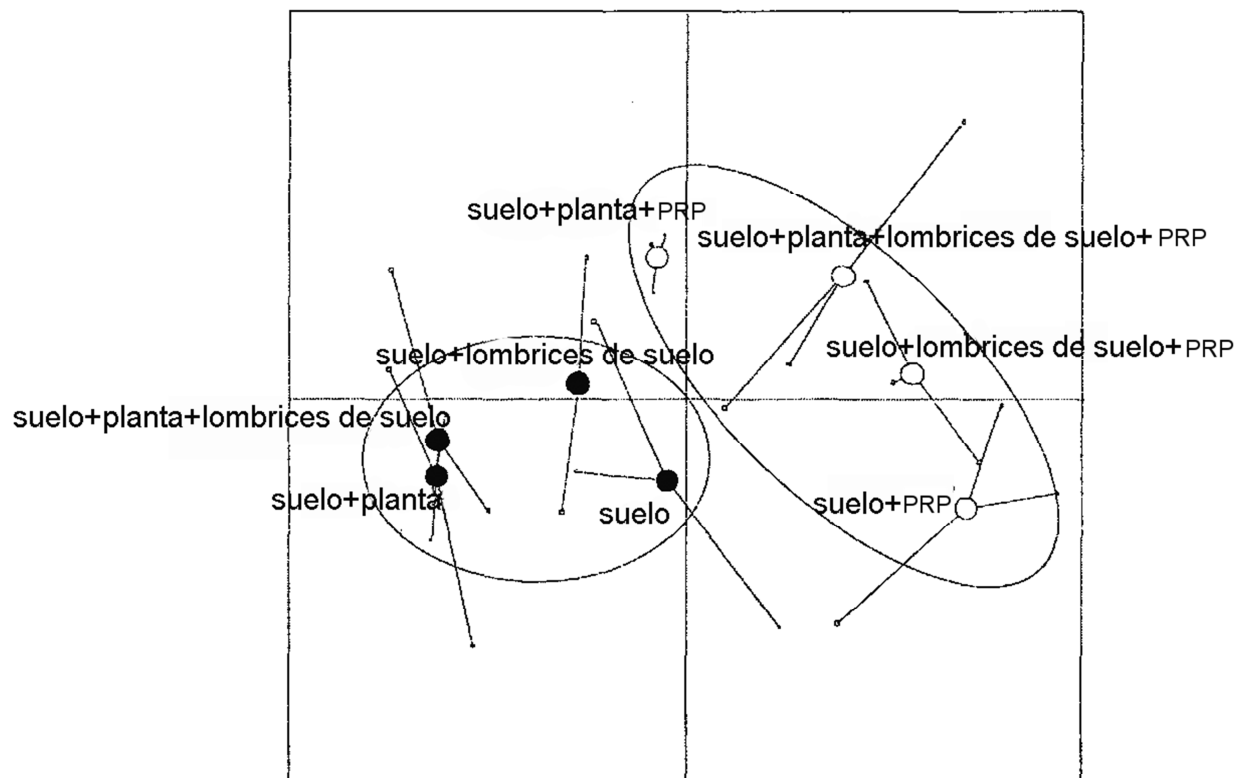
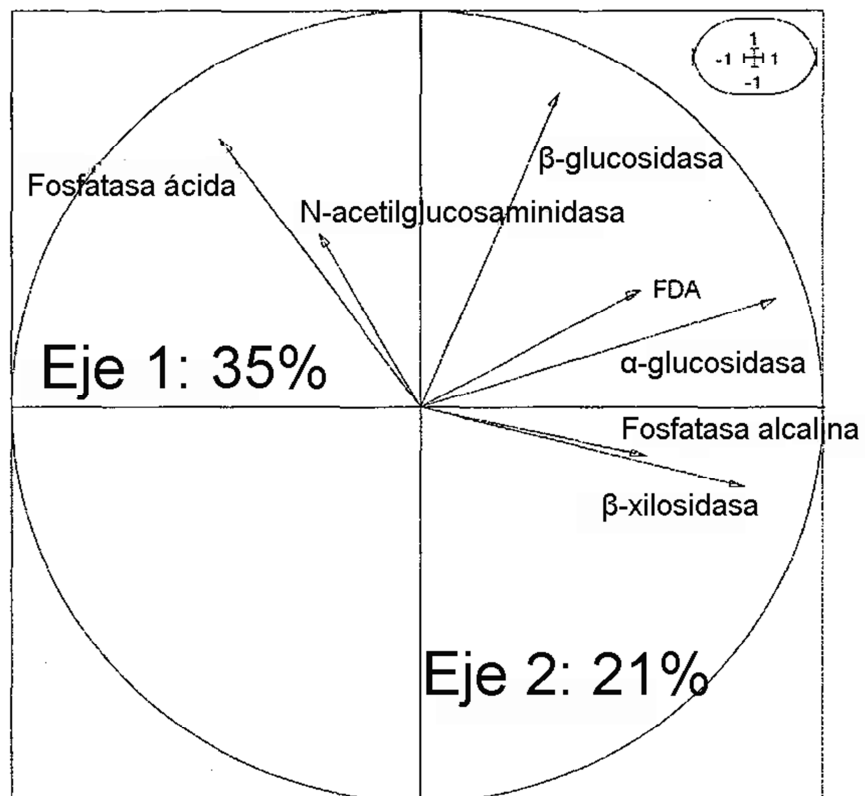


Figura 1G



Figuras 2A (parte superior) y 2B (parte inferior)

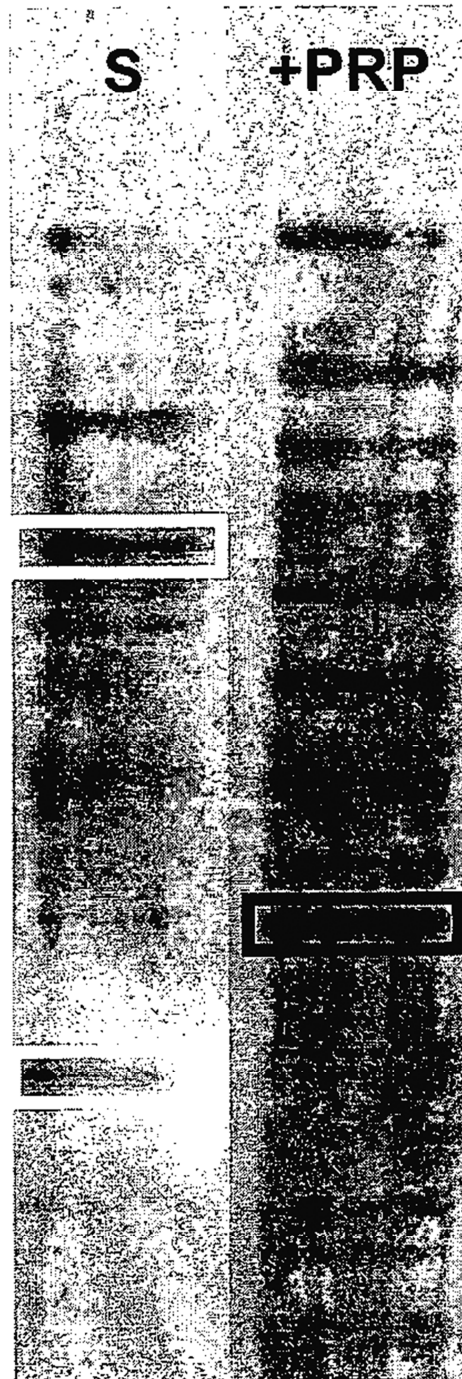


Figura 3

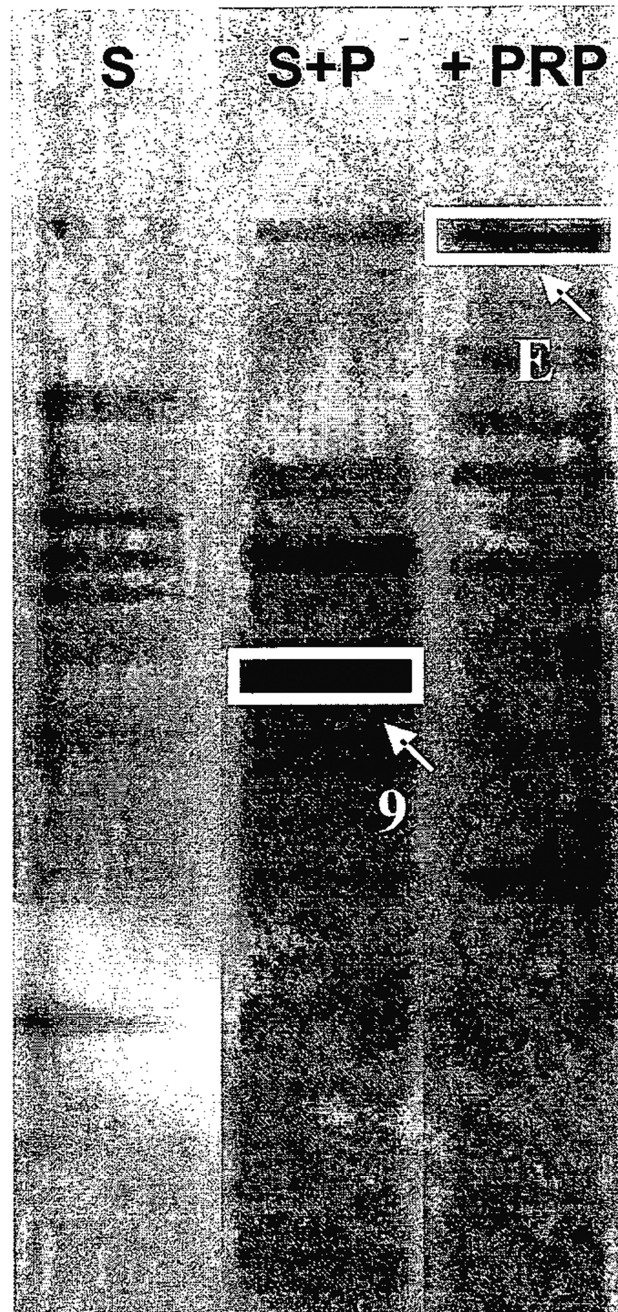


Figura 4

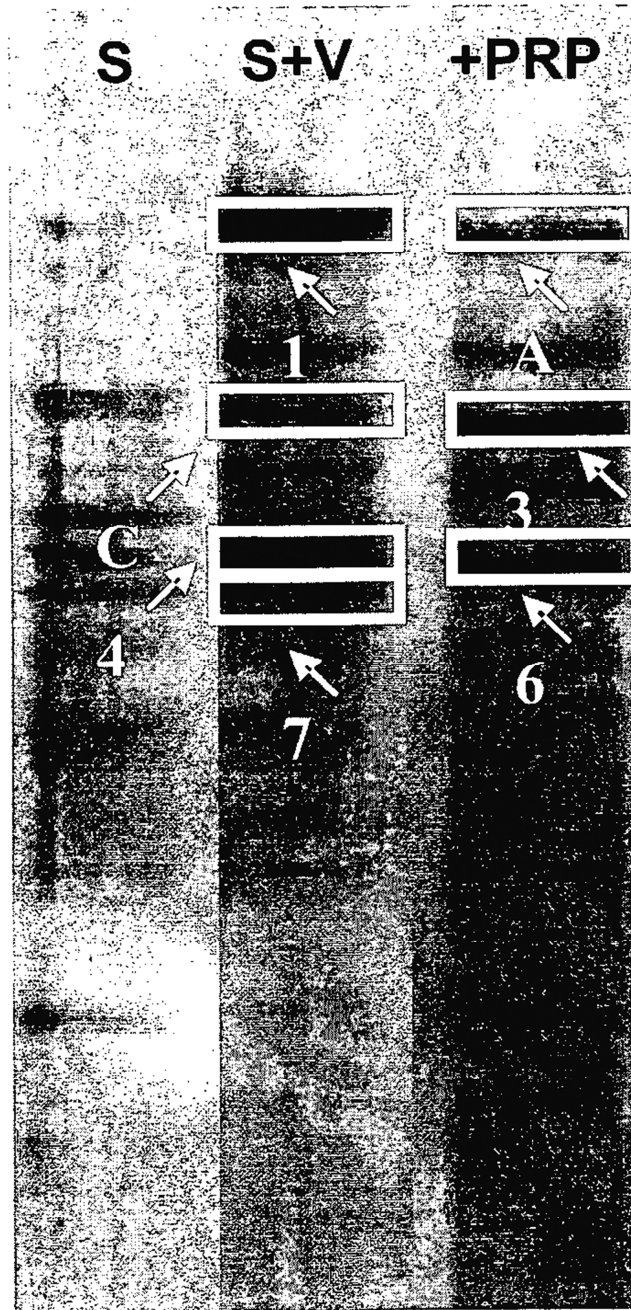


Figura 5

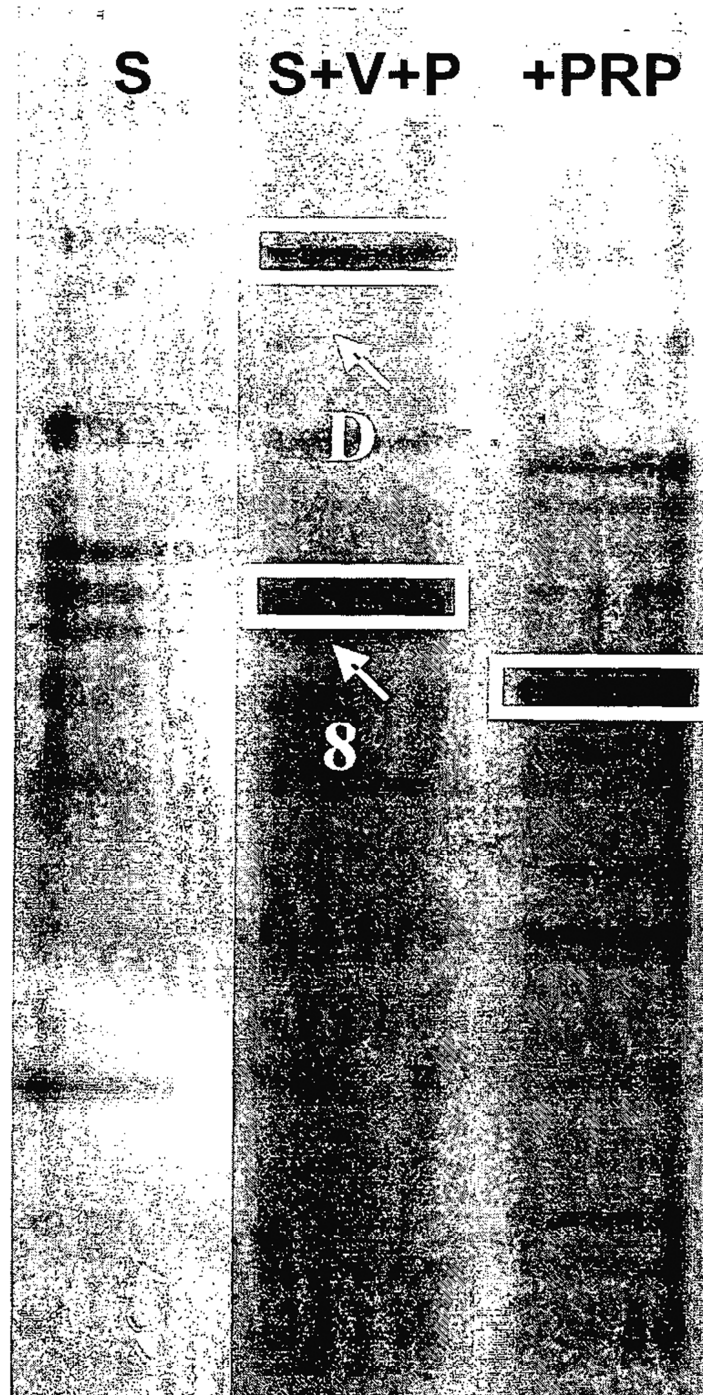


Figura 6

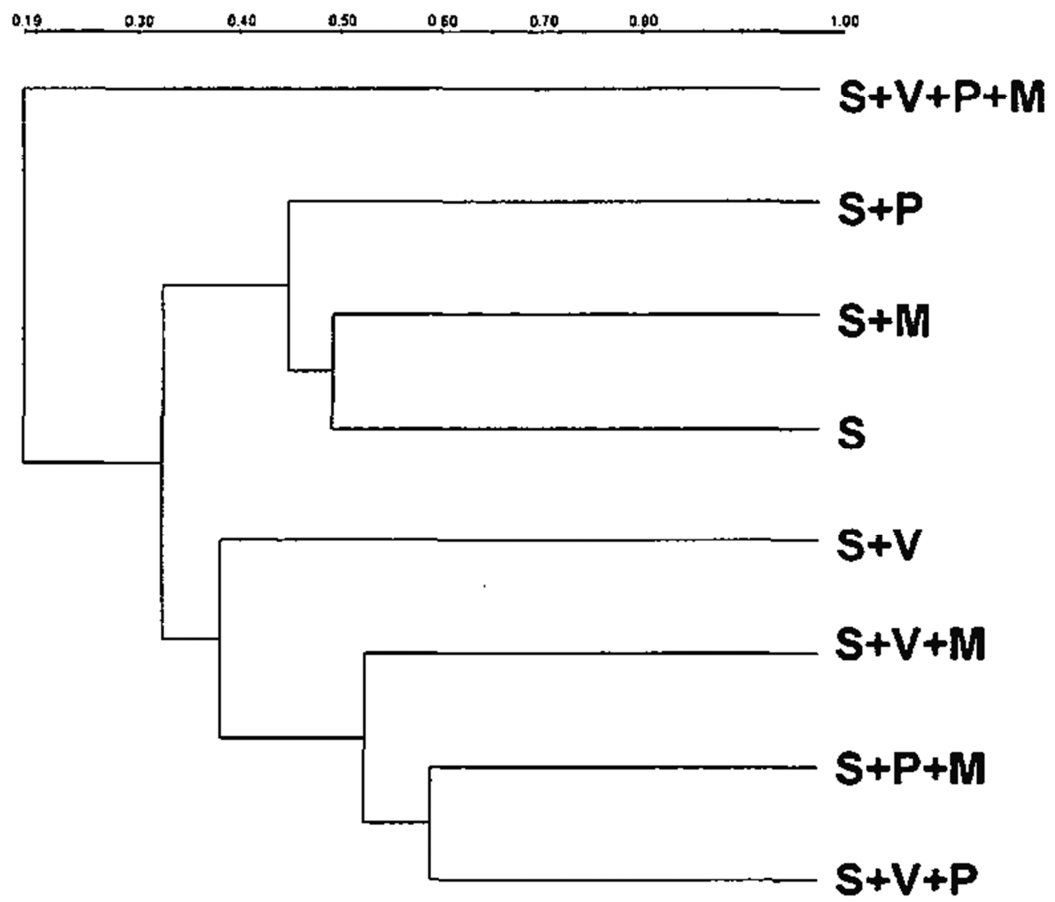


Figura 7

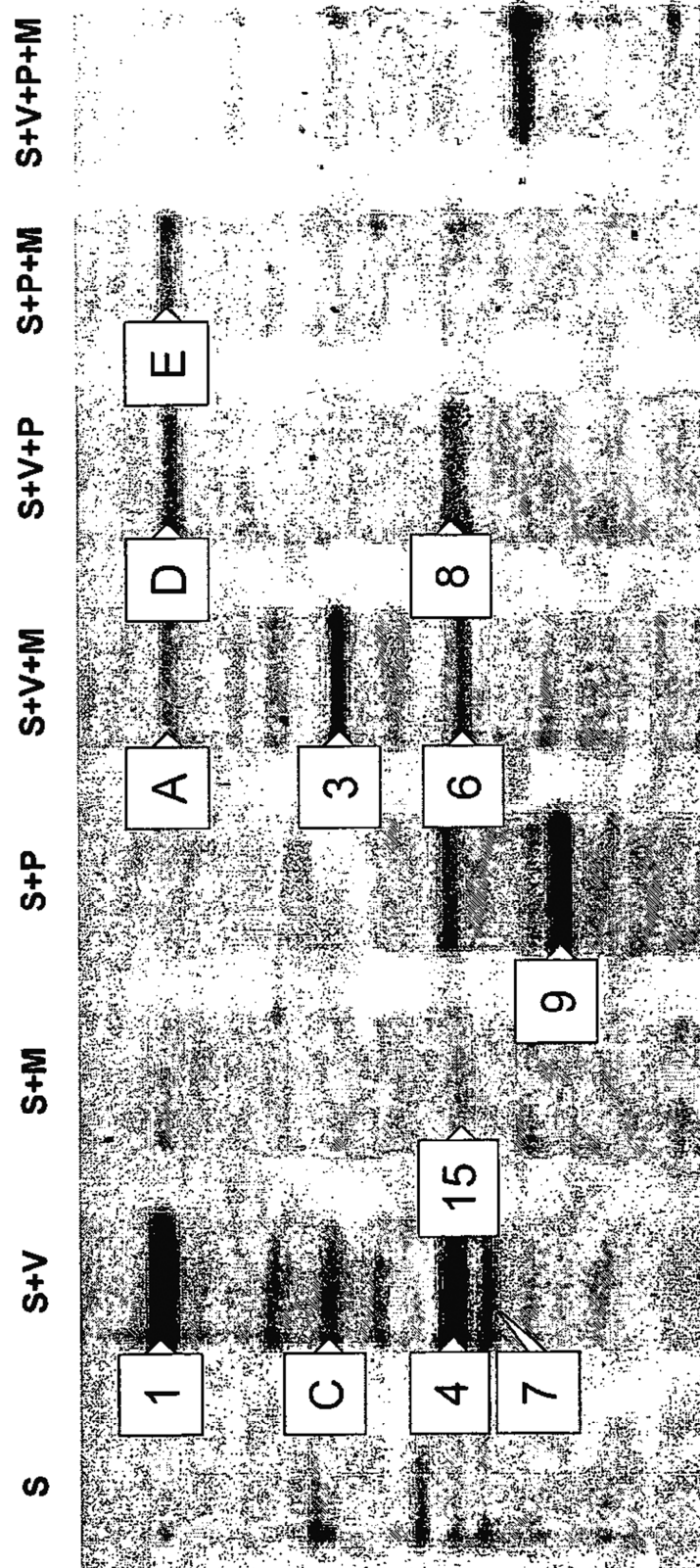


Figura 8

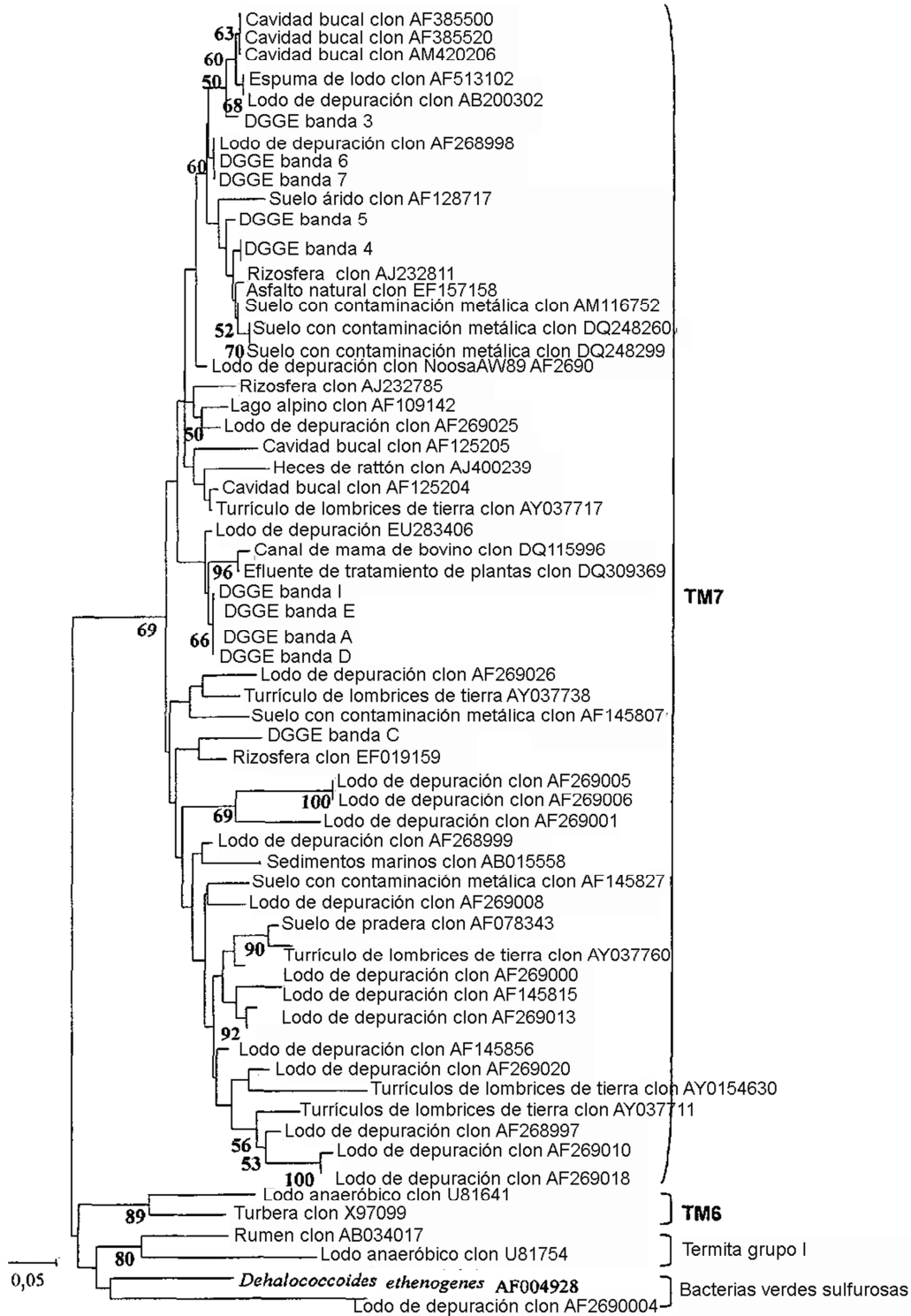


Figura 9

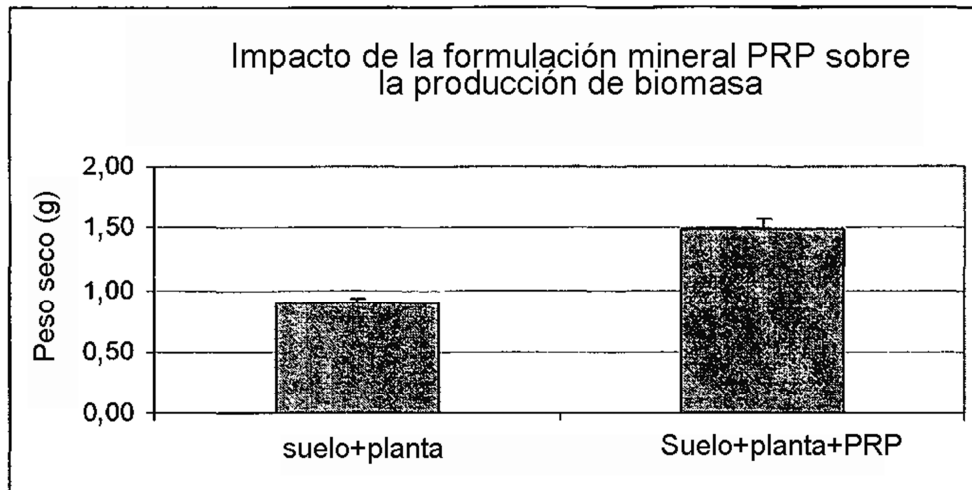


Figura 10A

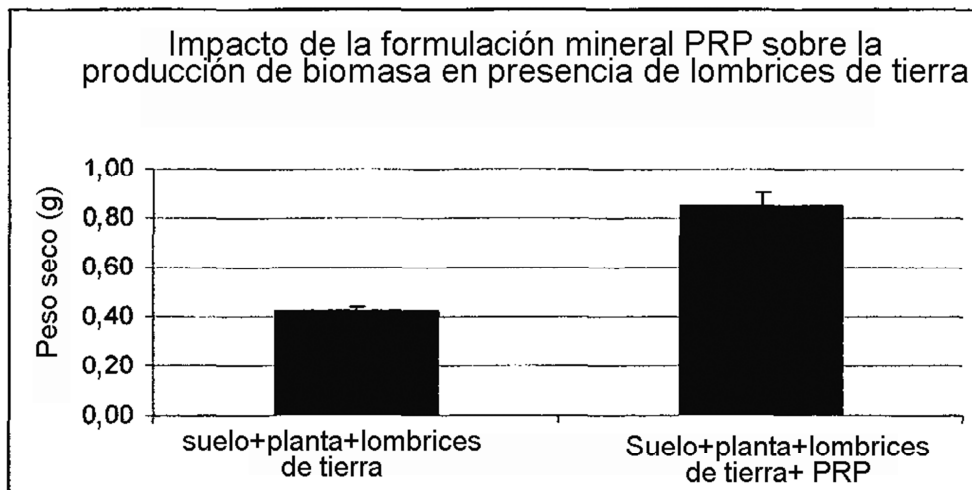


Figura 10B