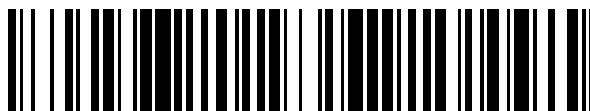


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 678**

51 Int. Cl.:

C12N 11/14 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

C05F 11/08 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2007** **E 07822905 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015** **EP 2194032**

54 Título: **Nuevo fertilizante biológico, procedimiento de obtención y su uso como estimulador del crecimiento vegetal**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.11.2015

73 Titular/es:

PROBELTE, S.A. (100.0%)
CTRA MADRID KM 384.6
30100 ESPINARDO (MURCIA), ES

72 Inventor/es:

VILLAYERDE FERNÁNDEZ, MARIO JORGE;
FERNÁNDEZ MARTÍNEZ, ANA ISABEL;
CASANOVA ROCA, JUAN ANTONIO;
MALO LÓPEZ-ROMÁN, JORGE;
NICOLÁS MARTÍNEZ, JOSÉ ANTONIO;
BLANCA PICÓ, ISIDRO;
GARCÍA GÓMEZ, ANTONIO y
MARTÍNEZ ORTIZ, PEDRO

74 Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

ES 2 551 678 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

Nuevo fertilizante biológico, procedimiento de obtención y su uso como estimulador del crecimiento vegetal.

5 Campo de la invención

La presente invención concierne a un producto para la fertilización biológica consistente en una formulación granulada que comprende dos cepas de bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Pantoea*, con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar fosfatos así como otros nutrientes minerales del suelo y producir cantidades elevadas de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal. Dichos microorganismos han sido inmovilizados mediante la técnica de adsorción a un soporte sólido, que actúa como sistema de liberación lenta, lo cual garantiza además una elevada estabilidad en la viabilidad celular, así como nutrientes orgánicos y sales suficientes para facilitar la colonización de las raíces de las plantas. Constituyen también objeto de esta invención, los microorganismos aislados, el procedimiento de inmovilización celular, y el uso del fertilizante biológico así obtenido como estimulador del crecimiento vegetal.

Estado de la técnica

El uso de fertilizantes resulta imprescindible para el mantenimiento de altos rendimientos en las cosechas. Mediante la fertilización química, son añadidas al suelo cantidades importantes de nitrógeno, fósforo y potasio, así como otros elementos minerales, sin embargo, las disponibilidades de éstos son muy bajas, ya que es bien conocido que una fracción queda inmovilizada en el suelo formando compuestos insolubles no asimilables por las plantas y otra es lavada mediante un proceso de lixiviación, lo cual además de pérdidas económicas, genera un importante problema de contaminación ambiental.

En el caso del fósforo, en particular, una parte importante de los fosfatos solubles añadidos es insolubilizada por el hierro y el aluminio en los suelos ácidos y por el calcio en los suelos calcáreos (Chabot y col, 1993), convirtiéndose progresivamente en formas menos asimilables. Como resultado de los diversos mecanismos de retención, la mayor parte del fósforo aplicado mediante la fertilización, no puede ser utilizada por las cosechas y es retenida en el suelo en forma insoluble (Stevenson, 1986). Dado este fenómeno y la aplicación cíclica de fertilizantes, la concentración de fósforo en el suelo ha aumentado notablemente por lo que en muchos suelos podrían establecerse cosechas a largo plazo si estas reservas pudieran ser explotadas económicamente (Kucey y col, 1989).

Es bien conocida la importancia que tienen los microorganismos en el ciclo de los nutrientes en el suelo y su papel en la nutrición de las plantas. Su participación activa en la descomposición y mineralización de la materia orgánica, así como en la fijación y liberación de nutrientes del suelo, es crucial para el mantenimiento de la productividad de las plantas. Las interacciones que se establecen entre los microorganismos del suelo y las raíces de las plantas, satisfacen importantes requerimientos nutricionales para ambos. Las raíces están directamente influidas por la composición y densidad de la comunidad microbiana que en ellas se desarrolla, conociéndose esto como "Efecto Rizosfera", el cual puede ser estimado, pero se sabe que depende particularmente de la planta y su madurez fisiológica (Atlas, R.M. y Bartha, R., 1993) La práctica de la inoculación de plantas con microorganismos es bien conocida desde hace muchos años (US Pat.570,813).

Un grupo de microorganismos que tiene una notable importancia en este fenómeno es aquel que participa en la solubilización del fósforo de fuentes que de otra forma serían inaccesibles para las plantas.(Kucey y col, 1989).

Los microorganismos solubilizadores de fosfato han sido aislados en prácticamente todos los suelos ensayados, aunque el número y proporción de estos varía de acuerdo con el tipo de suelo, el clima y otros factores tales como la evolución histórica del suelo. Muchos microorganismos son capaces de asimilar el fósforo insoluble del suelo, liberando una parte de este en forma de fosfatos solubles que a su vez pueden ser utilizados por las plantas, contribuyendo de esta forma a la nutrición vegetal (Chabot y col, 1993). En general es aceptado que la solubilización de fosfatos en el suelo es debida a la producción de ácidos orgánicos y oxo ácidos quelantes, a partir de azúcares (Leyval y Barthelin 1989, Deubel y Gransee 1996, Yadav y Dadarwal, 1997)

Los géneros *Enterobacter* y *Pantoea* han sido utilizados en la agricultura como solubilizadores de fosfato y para la protección contra enfermedades de las plantas. Dentro de éstos, *Pantoea dispersa* es una especie que ha sido utilizada para estos fines.

Otro aspecto que en la práctica ocupa un lugar muy importante es el empleo de los microorganismos de la rizosfera fijadores de nitrógeno atmosférico. Esta práctica es también conocida desde hace muchos años (US Pat. 1,212,196). Numerosos microorganismos han sido utilizados para esta función entre los que se encuentran bacterias de géneros tales como *Rhizobium*, *Azotobacter* y *Azospirillum* (Patente española. ES2093559; US Pat. 5,951,978), y hongos de los géneros *Saccharomyces*, *Hansenula* (US Pat 6,596,273) y *Aspergillus* (US Pat. 4,670,037) entre otros.

El nitrógeno es un elemento abundante, que compone casi el 80% de la atmósfera terrestre y una parte nutritiva muy escasa. La paradoja se resuelve fácilmente: el nitrógeno atmosférico es inerte y no pueden aprovecharlo la mayoría de los organismos, pudiendo solamente ser incorporado en la síntesis biológica cuando ha sido "fijado" o combinado con ciertos elementos como el hidrógeno o el oxígeno. Las bacterias son capaces de fijar $1,5 \times 10^8$ toneladas métricas por año, una parte importante de la cual es sintetizada mediante el proceso de Haber-Bosch. (Brill, W.F., 1977; Atlas y Bartha, 1993).

En los años 70 varios experimentos realizados en Brasil determinaron la significativa contribución del N_2 fijado para las plantas por diferentes microorganismos, encontrándose *Azospirillum* entre los géneros principales. (Döbereiner y Day, 1976; Neyra y Döbereiner, 1977 entre muchos otros).

Es sabido que diferentes especies de plantas, producen diversos efectos sobre la rizosfera, siendo también conocido que las cepas aisladas en un tipo de especie vegetal, tiene un efecto totalmente distinto sobre la rizosfera de la cual fue aislada con respecto a otros cultivos. Sin embargo, Basham y Levanony (1988), trabajando con *Azospirillum brasilense*, llegaron a la conclusión de que es capaz de colonizar plantas de diferentes especies adsorbiéndose a las raíces.

En la actualidad es muy común el uso de este género en la producción de fertilizantes biológicos (US Pats. 5,366,532 y 5,951,978 y Patente española ES2093559)

Las tendencias actuales en la inoculación de plantas con microorganismos se orientan en el sentido de utilizar cultivos mixtos (llamados también consorcios) que potencien fenómenos tales como el incremento de la eficiencia de la absorción del fósforo por las raíces, la fijación biológica del nitrógeno, la estimulación del crecimiento vegetal por la producción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, así como sideróforos y la protección contra enfermedades producidas por microorganismos patógenos entre otros. Esta práctica se ha revelado como la más efectiva en la biofertilización.

La forma física de un bioestimulador es también un factor determinante en el resultado práctico del producto elaborado y puede variar, siempre que sea compatible con las prácticas agrícolas, incorporándose fácilmente a las operaciones de rutina. En el producto, los microorganismos deben permanecer viables, en estado latente o metabólicamente activos. Este factor tiene dos aspectos determinantes, la durabilidad del producto y la capacidad de éste para colonizar las raíces de los cultivos que se quiere estimular o proteger, una vez aplicado en el campo. Pueden surgir algunos problemas cuando se trata de células que no tienen la capacidad de formar estructuras de resistencia, ya que los cultivos van perdiendo viabilidad con el tiempo y además su capacidad de supervivencia en el suelo es muy baja. Por esta razón, es imprescindible que el producto sea capaz de preservar la viabilidad celular en condiciones adversas durante largos periodos de tiempo y garantizar en la medida de lo posible la capacidad de colonización de las raíces una vez aplicado en el campo. Uno de los criterios más importante a tener en cuenta para esto es lograr preparados que liberen un número apreciable de células viables consistentemente. Para este fin, las técnicas de inmovilización celular ofrecen una serie de ventajas con respecto a las células libres, que las hacen muy atractivas para su aplicación en la práctica y muy particularmente para la biotecnología agrícola y ambiental. El empleo de células inmovilizadas puede potenciar los efectos de los microorganismos sin crear problemas de contaminación, dando lugar a productos muy activos y novedosos. Una técnica muy utilizada en la práctica es la adsorción. Numerosos han sido los soportes empleados con este fin. En agricultura en particular, el empleo de arcilla, vermiculita, perlita, sepiolita, caolín, tierra de diatomeas, zeolita natural y otros es de uso habitual.

Las zeolitas son aluminios-silicatos, cuyas redes están formadas por tetraedros de AlO_4^- y SiO_4^- . Este enrejado posee carga negativa que se compensa con cationes intercambiables que ocupan sitios específicos en los canales y cavidades de la zeolita. Esta sal posee dos propiedades muy importantes; capacidad de adsorción e intercambio iónico, las cuales son muy ventajosas para su posible uso como soporte de inmovilización. Las propiedades de estos productos podrían resultar muy atractivas para la obtención de un producto seco para la biofertilización, más aún si se trata de microorganismos que no son capaces de formar estructuras de resistencia. Para este fin, sería imprescindible lograr que la mortalidad celular sea muy baja o nula durante el proceso de producción y particularmente en la etapa de secado del producto. Lograr este objetivo permitiría obtener productos muy efectivos siempre que se logre un proceso de producción.

ES 2 234 417 describe un fertilizante biológico consistente en una formulación granular que contiene la cepa C_3 de la especie *Pantoea dispersa* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número CECT-5801 y la cepa M_3 de la especie *Azospirillum brasilense* presentada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número CECT-5802, ambas inmovilizadas en un soporte sólido y un proceso para su preparación.

Dicho fertilizante biológico es capaz de fijar nitrógeno atmosférico, así como solubilizar fosfatos y otros nutrientes minerales, resultando así una buena actividad fertilizante. Esta actividad es debida al hecho de que, por ejemplo la cepa C_3 es capaz de producir grandes cantidades de ácidos orgánicos, principalmente ácido glucónico, útil para la solubilización del fosfato insoluble del suelo, mientras por ejemplo la cepa M_3 es capaz de fijar nitrógeno y producir ácido indol-3-acético, un factor muy importante implicado en el crecimiento de las plantas.

Estas cepas son inmovilizadas en un soporte sólido, por ejemplo zeolita, para obtener un producto final caracterizado por una buena estabilidad así como una viabilidad celular satisfactoria. El soporte sólido es suministrado adicionalmente con sales, para facilitar la colonización de las raíces de las plantas.

Sin embargo, el fertilizante de acuerdo con ES 2 234 417 cuando contacta con la planta a través del suelo, necesita algún tiempo para llevar a cabo su acción, ya que para que las cepas puedan empezar su actividad han de colonizar las raíces de las plantas y establecer con estas una relación que les permita realizar su acción de conversión en un producto útil. Así, la actividad fertilizante no puede ser llevada a cabo inmediatamente cuando el fertilizante contacta con la planta a través del suelo, pero puede ser observada después de un cierto tiempo, que depende de las características del suelo, de las condiciones climáticas y de otros muchos factores. Este aspecto, puede causar un retraso de la acción biofertilizante y cierto retraso del crecimiento, al menos inicialmente, en las plantas tratadas. De hecho, determinadas condiciones climáticas tales como lluvia, granizo, etc. pueden llegar a afectar en parte o por completo el fertilizante del suelo inhabilitando por tanto su actividad.

Además, de acuerdo con ES 2 234 417, el proceso para la preparación de un fertilizante biológico incluye la adsorción de las cepas así como de los nutrientes y sales en el soporte sólido, obteniendo así un producto húmedo, que necesita ser secado para obtener una alta estabilidad celular. De hecho, un alto nivel de humedad en el producto final puede causar una rápida degradación de las cepas y una viabilidad más baja.

La etapa de secado es llevada a cabo a una temperatura comprendida entre 60 - 80 °C, la cual es relativamente alta para preservar la viabilidad de las cepas. El nivel de humedad obtenido de esta forma está comprendido entre 3-6%.

Siempre de acuerdo con la ES 2 234 417, cada cepa así como los nutrientes son adsorbidos en un soporte sólido diferente, obteniendo así al menos dos series diferentes de soportes sólidos, los cuales son mezclados en cantidades predeterminadas, obteniendo el fertilizante biológico. De acuerdo con este proceso, es necesario por tanto llevar a cabo al menos dos etapas de secado diferentes, ya que los nutrientes y las cepas se secan por separado y las células nunca alcanzan temperaturas mayores de 80 °C.

Exposición de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un fertilizante biológico que ejerza una acción fertilizante y/o de estimulación del crecimiento de las plantas inmediata tan pronto como el fertilizante contacta con la planta a través del suelo.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un fertilizante biológico que ejerza una actividad fertilizante y/o estimulación del crecimiento mejorada.

Asimismo, otro objeto de la presente invención es proporcionar un fertilizante biológico cuya actividad se mantenga, es decir se conserve estable en condiciones de almacenamiento, por un período largo de tiempo, al menos dos años.

Por último, la presente invención tiene también por objeto proporcionar un proceso para la preparación de un fertilizante biológico que comprende un número reducido de etapas comparado con el proceso de acuerdo con el estado de la técnica y que presenta diversas ventajas industriales.

Descripción de la invención

Estas y otras ventajas que serán mejor explicadas a continuación son obtenidas con un fertilizante que comprende:
a.- un cultivo puro de la cepa C₃ de la especie *Pantoea dispersa* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número CECT 5801,

b.- un cultivo puro de la cepa M₃ de la especie *Azospirillum brasilense* depositada en la CECT con el número CECT 5802, ambas inmovilizadas en un soporte sólido,

c.- Ácido indol-3-acético (AIA), o un promotor del ácido indol-3-acético seleccionado como L-triptófano.

El nuevo fertilizante biológico de acuerdo con la presente invención contiene células de *Azospirillum brasilense*, cepa M₃ fijadora de nitrógeno atmosférico y que presenta una elevada capacidad para producir sustancias reguladoras del crecimiento vegetal del tipo ácido indol-3-acético (AIA), y *Pantoea dispersa*, cepa C₃ que posee una alta eficiencia en la producción de ácidos orgánicos, principalmente ácido glucónico, para la solubilización de fosfatos y otros nutrientes del suelo, así como la capacidad de producir por ejemplo sideróforos y sustancias reguladoras del crecimiento vegetal. Dichos microorganismos han sido depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) que les ha asignado los números de depósito CECT-5802 a *Azospirillum brasilense* M₃ y

CECT-5801 a *Pantoea dispersa* C₃. Dicho fertilizante biológico consiste en un producto constituido por un soporte sólido, en el cual han sido inmovilizadas las bacterias y que contiene además los nutrientes necesarios para garantizar su supervivencia, una vez inoculadas las plantas, actuando como sistema de liberación lenta.

- 5 El microorganismo *Azospirillum brasilense* M₃ CECT 5802 fue obtenido mediante un procedimiento que combina el aislamiento en medio NFb semi-sólido y la selección a través de su capacidad para estimular el crecimiento vegetal y producir ácido indol-3-acético y otras fitohormonas. La capacidad para estimular el crecimiento vegetal fue comprobada mediante bioensayos de laboratorio e invernadero, según los métodos descritos por Bashan y col 1986, Fernández 1995 y Bashan 1998. Se comprobó, mediante estos bioensayos que la cepa M₃ fue la que mayor efecto estimulador del crecimiento produjo de los más de 50 aislados de bacterias fijadoras de nitrógeno ensayados. La producción de ácido indol-3-acético (AIA) fue verificada por métodos colorimétricos (Pilet y Chollet 1970) y HPLC (Olivella y col 2001), así como se detectó la presencia de otras fitohormonas del tipo citoquininas. En la producción de AIA, en medio tomate con 200 mg x L⁻¹ de triptófano, se logran concentraciones de 100-180 mg x mL⁻¹ y un porcentaje de transformación de hasta el 95% de este aminoácido. El microorganismo *Pantoea dispersa* C₃ CECT 5801, fue obtenido utilizando un procedimiento que combina el aislamiento en medios agarizados con tampón Tris_HCl 1N pH 8, por zonas de aclaramiento del agar (Gyaneshwar y col 1999) y selección mediante determinación del PO₄³⁻ solubilizado en medios líquidos agitados (Nautiyal 1999), empleando en ambos casos Ca₃PO₄ insoluble como única fuente de fósforo. Se llevó a cabo la caracterización de los ácidos orgánicos producidos y se comprobó que produce ácido gluconico mayoritariamente. La selección se efectuó también a través de su capacidad para estimular el crecimiento vegetal y de producir auxinas.

De acuerdo con la invención, el nuevo fertilizante biológico comprende, además de las cepas C₃ y M₃, ácido indol-3-acético (AIA).

- 25 Este tercer componente representa un progreso significativo con respecto a los fertilizantes biológicos conocidos. De hecho, la presencia de AIA desde el principio junto con las dos cepas C₃ y M₃ da al producto resultante la posibilidad de ser activo inmediatamente cuando el fertilizante contacta con la planta a través del suelo, pues el AIA es capaz de ejercer su acción como estimulador del crecimiento de las plantas, mientras que las cepas C₃ y M₃ son capaces de comenzar la producción de AIA después de su inoculación en el suelo y tras la conversión de los substratos necesarios. Con el nuevo fertilizante de acuerdo con la presente invención, hay una ventaja inmediata debido a la presencia de AIA, que actúa como estimulador del crecimiento de las plantas tan pronto como el fertilizante contacta con la planta a través del suelo, permitiendo así a las cepas C₃ y M₃ colonizar las raíces de las plantas y establecer con estas la relación que les permita realizar su acción estimuladora del crecimiento.

- 35 Adicional y sorprendentemente, se ha comprobado que la misma cepa C₃ produce ácido indol-3-acético (AIA) en cantidad muy significativa.

Por ejemplo, en la producción de AIA, en medio tomate con 200 mg x L⁻¹ de triptófano, se logran concentraciones de 80-120 mg x mL⁻¹ y un por ciento de transformación de hasta el 60% de este aminoácido.

- 40 Este es un aspecto muy importante, pues la producción de ácido indol-3-acético (AIA) a partir de la cepa C₃ representa una mejora en la actividad total del fertilizante biológico resultante.

- 45 De hecho, en el nuevo producto fertilizante de acuerdo con la presente invención, ambas cepas C₃ y M₃ son capaces de producir ácido indol-3-acético (AIA), confiriendo así al producto una actividad sustancialmente mejorada como fertilizante y estimulador del crecimiento de plantas si se compara con los fertilizantes biológicos conocidos actuando en cantidades similares.

- 50 De este modo, el nuevo fertilizante biológico de acuerdo con la presente invención en comparación con la misma cantidad de un fertilizante de acuerdo con el estado de la técnica, es capaz de producir una cantidad mayor de AIA. Lo anteriormente expuesto representa por tanto una gran ventaja comercial y económica.

- 55 De acuerdo con la presente invención, en un primer ejemplo de realización el AIA puede ser ventajosamente producido durante la etapa de fermentación para la preparación de las cepas, o añadido directamente al final del proceso de fermentación de las mismas antes de su adsorción en el soporte sólido. Como alternativa, el AIA puede ser añadido a los nutrientes antes de su adsorción en el soporte sólido.

- 60 De acuerdo con un segundo ejemplo de realización de la presente invención, la formación de AIA puede ser inducida a través de la adición de triptófano al medio de cultivo durante la etapa de fermentación para la preparación de las cepas, permitiendo la producción de AIA por ellas mismas y obteniendo un producto completamente natural. De acuerdo con este ejemplo, el caldo de cultivo resultante incluye las cepas (C₃ o M₃) y AIA que ha sido producido directamente por las cepas. El caldo puede ser adsorbido en el soporte sólido directamente incluyendo el AIA producido durante la fermentación.

La presente invención proporciona un proceso para la producción de fertilizantes biológicos, dicho proceso comprende las siguientes etapas:

a) Cultivar, microorganismos C_3 y M_3 .

b) Inmovilización en matrices sólidas.

c) Secado.

De acuerdo con el proceso la etapa c) consiste en el secado de la matriz sólida. Esta etapa es la principal del método mejorado.

De acuerdo con el estado de la técnica, es bien conocido secar separadamente microorganismos y nutrientes en matrices sólidas; las temperaturas de secado son 80°C y 200°C respectivamente. De hecho, se requiere una temperatura alta para reducir el grado de humedad de la matriz sólida, por ejemplo, zeolita. El grado de humedad aceptable debería estar comprendido entre el 4 y el 8 %, aunque un grado de humedad más bajo sería deseable.

De hecho es conocido que cuando un microorganismo es unido a una matriz, cuanto menor es la temperatura de la corriente de aire de secado mayor es la supervivencia, siendo en el presente caso la temperatura de secado máxima permitida de 80 °C, ya que temperaturas de la corriente de secado más altas inducen la muerte del microorganismo.

Los límites y condiciones arriba mencionados de acuerdo con el estado de la técnica, son sorprendentemente superados por el método descrito de acuerdo con la presente invención. La mejora en el secado se basa fundamentalmente en el hecho de que en la presente invención el secado se lleva a cabo en un secador de lecho fluidizado que permite reducir notablemente la temperatura del aire de secado pues aumenta marcadamente el área de contacto.

La etapa de secado, de acuerdo con la presente invención, se caracteriza así porque comprende la deshidratación del soporte sólido, adsorbido con los microorganismos y/o nutrientes y sales, llevada a cabo en un secador de lecho fluidizado permitiendo reducir notablemente la humedad residual del producto operando a una temperatura de solo 35 °C.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra los resultados de tratamientos de fertilización en plantas, obtenidos con el fertilizante biológico de acuerdo con la presente invención.

Por otra parte, en las figuras 2, 3 y 4 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos realizados, en cuanto al peso medio de las lechugas y el contenido de nitratos en los suelos y las hojas.

Descripción detallada de un ejemplo de realización

Como ejemplo, una descripción del procedimiento de obtención de acuerdo con la presente invención se explica a continuación.

Se alimenta el secadero de lecho fluidizado con la masa necesaria para su operación y se trabaja a una temperatura máxima del aire de 35 °C. De esta forma se irá secando el producto hasta alcanzar una humedad final que estará entre un 2-5 %, preferiblemente 2-3%, más preferiblemente 2-2,5% que es el valor de humedad del producto terminado.

El proceso de inmovilización y adsorción de los nutrientes en una sola etapa y el secado a temperaturas máximas de 35 °C ha permitido aumentar la estabilidad y efectividad del producto, el cual conserva su actividad, sin pérdidas significativas en almacenamiento, por al menos dos años a temperaturas de hasta 35 °C. Su actividad estimuladora del crecimiento vegetal ha sido comprobada por más de dos años, conservando sus propiedades iniciales. En su aplicación en el campo ha demostrado una alta efectividad para la colonización de raíces de diferentes cultivos y en suelos de distinta naturaleza, así como el efecto estimulador del crecimiento y de la nutrición general de las plantas en los ensayos realizados.

También se ha comprobado mediante ensayos de campo, que este procedimiento permite eliminar la fertilización química y produce una mejora notable en la estructura del suelo.

La mejora arriba descrita, concerniente al procedimiento para la producción del fertilizante biológico, presenta varias ventajas con respecto al proceso de acuerdo con el estado de la técnica anterior. Temperaturas y grados de humedad más bajas dan al fertilizante mayor estabilidad y permiten que permanezca activo durante al menos dos o tres años.

El nuevo procedimiento de producción de fertilizante biológico, de acuerdo con la presente invención, proporciona una solución a los problemas técnicos e industriales arriba descritos. Además, dicho procedimiento de acuerdo con la etapa a) presenta otra ventaja en su uso como medio de cultivo de producción de las citadas cepas de pasta de tomate como fuente de carbono e hidrolizado de colágeno de piel de origen animal de uso fertilizante como fuente de nitrógeno orgánico con el que se alcanzan elevados conteos celulares en 24-36 horas de fermentación para ambas cepas. Por otra parte, la introducción del L-triptófano en el medio de cultivo, hace que se produzcan cantidades elevadas de auxinas durante la fermentación, que pasan luego al producto final, confiriéndole un efecto adicional de enraizamiento desde su aplicación. El medio de cultivo resulta muy económico y lo que es más importante, se alcanzan elevados conteos celulares del orden de 10^9 - 10^{10} células x mL⁻¹ en ambos casos. Este medio ha sido probado también con resultados similares en el cultivo de cepas de otros géneros de bacterias y hongos aislados por los autores.

La presencia de L-triptófano en el medio de crecimiento del paso de fermentación proporciona una fuente inmediata para la producción de AIA por parte de los microorganismos C₃ y M₃.

Además, de acuerdo con el presente procedimiento, la etapa b) presenta otra ventaja que consiste en la inmovilización en la misma matriz sólida de células, sales y nutrientes.

Este proceso se lleva a cabo simultáneamente y por atomización del sólido, con los caldos de fermentación y las soluciones de nutrientes, siguiendo un esquema secuencial. Para llevar a cabo este paso se emplea un mezclador de sólidos que tiene un accesorio que permite asperjar líquidos en la medida en que se mezcla y homogeniza. Se carga el mezclador con la zeolita y la roca fosfórica y se realiza el proceso de mezclado durante 5-10 minutos. A continuación, y manteniendo el mezclador en movimiento, se añaden los caldos de células en orden secuencial, primero M₃ y a continuación C₃. Al terminar y siempre con la mezcladora en movimiento con el objetivo de obtener un sólido húmedo homogéneo, se lleva a cabo el proceso de adsorción de los nutrientes utilizando las siguientes materias primas y proporciones:

Sal	Concentración	Volumen x 100 kg de sólidos
(NH ₄) ₂ SO ₄	550-650 g/L	3,5-4,0 L de disolución
K ₂ HPO ₄	500-600 g/L	0,8-1,2 L de disolución
Zn(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	100-150 g/L	0,1-0,2 L de disolución
MnSO ₄ ·H ₂ O	100-150 g/L	0,1-0,2 L de disolución
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	10-40 g/L	0,03-0,06 L de disolución
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10-40 g/L	0,03-0,06 L de disolución

Sin detener el mezclador, se asperjan cada una de las soluciones antes descritas, de forma secuencial y en el mismo orden en que están descritas. Se mezcla bien durante 15-30 minutos para obtener un sólido húmedo bien homogéneo.

Esta nueva etapa mejorada reduce el tiempo de proceso y permite obtener una matriz sólida que contiene los componentes de la invención. Esta ventaja es muy importante, ya que el soporte sólido puede ser sometido a una única etapa de secado, evitando así la necesidad de llevar a cabo al menos tres etapas de secado diferentes para los distintos soportes sólidos con diferentes componentes.

La principal ventaja del procedimiento de obtención, de acuerdo con la presente invención es la nueva etapa de secado. Dicha nueva etapa de secado podría ser llevada a cabo en soportes sólidos de acuerdo con el estado de la técnica anterior, así como también en soportes sólidos obtenidos de acuerdo con un nuevo aspecto, es decir, la posibilidad de inmovilizar ambas cepas C₃ y M₃ así como los nutrientes y cualquier otro componente en la matriz sólida al mismo tiempo y en una única etapa del proceso.

Por ello, de acuerdo con la presente invención, el fertilizante biológico puede ser producido de acuerdo con cualquier proceso aquí descrito, así como el nuevo proceso puede ser usado para la producción de cualquier producto de la clase arriba descrita.

Sección experimental

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar los principios y metodologías a través de los cuales se obtienen todos los fertilizantes biológicos. Estos ejemplos sirven para ilustrar los principios y metodologías de la presente invención, pero no limitan su alcance.

Ejemplo 1: Propagación de las cepas *Azospirillum brasilense* M₃ y *Pantoea dispersa* C₃

Se toma una ampolla del aislado de la cepa M₃ conservado, se siembra en placas de medio Rojo Congo (Rodríguez Cáceres, 1982) y se incuba a 30 °C durante 72 h, para comprobar su pureza. De esta placa se prepara un inóculo

para el fermentador tomándose una porción del cultivo con un asa, se inoculan 3 matraces Erlenmeyer de 2000 mL, con 750 mL de medio tomate sin L-triptófano cada uno y se incuban en agitación a 30 °C durante 14-16 h. Al cabo de este tiempo, el contenido del matraz, que se encuentra en fase exponencial, se inocula en un fermentador Braun Biotech BIOSTAT® C de 30 L con 18 L de medio tomate sin L-triptófano. Se cultiva durante 8-10 h y cuando ha alcanzado una elevada concentración celular y se encuentra aún en fase exponencial, se inocula en un fermentador Braun Biotech BIOSTAT® D de 300 L con 200 L de medio tomate. Se lleva a cabo la fermentación durante 24-36 horas a una velocidad de agitación de 200 r.p.m., y una aireación de 50 L x min⁻¹ (0,25 v.v.m.) y una temperatura de 30 °C. El pH se deja variar libremente y al final tuvo un valor de 6,5. Se alcanzó una concentración de 9,4 x 10⁹ cel x mL⁻¹ y la concentración final de AIA fue de 120 mg x L⁻¹. La velocidad específica de crecimiento en fase exponencial (μ) fue de 0,28 h⁻¹.

Como se ilustra arriba, la cepa C₃ siguió el mismo esquema de fermentación. La pureza del cultivo se comprobó en medio MacConkey (OXOID 1981) y el inóculo se incubó en agitador orbital durante 12 horas. El cultivo en el fermentador BIOSTAT® D se llevó a cabo durante 24-36 horas a una velocidad de agitación de 300 r.p.m., y una aireación de 100 L x min⁻¹ (0,5 v.v.m.) y una temperatura de 30 °C. El pH se deja variar libremente también y al final tuvo un valor de 6,7. Se alcanzó una concentración de 1,12 x 10¹⁰ cel x mL⁻¹ y una concentración final de AIA fue de 50 mg x L⁻¹. La velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial para esta cepa fue de $\mu = 0,52$ h⁻¹.

Medio Tomate:

Componente	g
Pasta de tomate	36,00
K ₂ HPO ₄	3,30
KH ₂ PO ₄	2,75
NH ₄ CL	0,84
Hidrolizado de colágeno	5,00
Extracto de levaduras	0,75
Triptófano	0,2
H ₂ O _(csp) pH = 7,0	1 L

Esterilización 121 °C por 30 minutos

Ejemplo 2: Inmovilización celular y carga de nutrientes

Para llevar a cabo este proceso se emplea una mezcladora de arado que tiene un aspersor y se utilizan las siguientes materias primas:

97,5 Kg de Zeolita

2,5 Kg de Roca Fosfórica

3,6 L de caldo de M₃

3,6 L de caldo de C₃

Se carga el mezclador con la zeolita y la roca fosfórica y se realiza el proceso de mezclado durante 5-10 minutos. A continuación, y manteniendo el mezclador en movimiento, se atomizan los caldos de células en orden secuencial, primero M₃ y a continuación C₃. Al terminar y siempre con la mezcladora en movimiento, con el objetivo de obtener un sólido húmedo homogéneo, se lleva a cabo el proceso de adsorción de los nutrientes utilizando las siguientes materias primas y proporciones:

(NH ₄) ₂ SO ₄	590 g/L	3,83 L de disolución
K ₂ HPO ₄	550 g/ L	1,05 L de disolución
Zn(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	122,5 g/L	0,15 L de disolución
MnSO ₄ ·H ₂ O	120 g/L	0,15 L de disolución
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	24 g/L	0,05 L de disolución
FeSO ₄ ·7H ₂ O	24 g/L	0,05 L de disolución

Sin detener el mezclador, se asperjan cada una de las soluciones antes descritas, de forma secuencial y en el mismo orden en que están descritas, pasando un poco de agua entre cada nutriente para limpiar los conductos. En

total se añadieron 7,2 L en esta fase. Se mezcla bien durante 15-30 minutos para obtener un sólido húmedo bien homogéneo.

La zeolita con la roca fosfórica fue humectada con 14,4 L de líquido total, que fue absorbido completamente sin quedar líquido en exceso.

Ejemplo 3: Secado

Se alimenta el secadero de lecho fluidizado con la masa necesaria para su operación y se trabaja a una temperatura máxima del aire de 35 °C. De esta forma se irá secando el producto hasta alcanzar una humedad final que estará entre un 2-3% que es el valor de humedad del producto terminado

A este producto se le comprobó periódicamente la viabilidad celular en medio Rojo Congo (Rodríguez Cáceres, 1982) para *Azospirillum brasilense* M₃ y medio MacConkey (OXOID 1981) para *Pantoea dispersa* C₃, comprobándose que conserva más del 90% de su actividad durante más de dos años de conservación a temperaturas no mayores de 35 °C. Es evidente que el proceso de inmovilización y adsorción de nutrientes combinado, permite una mayor saturación del soporte, así como la temperatura de secado de 35 °C, muy inferior con respecto a la temperatura de secado de acuerdo con el estado de la técnica anterior, y que actúa muy favorablemente sobre la supervivencia celular en el proceso de conservación del producto, han permitido incrementar notablemente la efectividad y vida útil del producto como se puede observar en la figura 1.

En particular, esta figura demuestra que la lechuga, tratada con el fertilizante biológico con más de dos años de conservación, mantiene un mayor estándar de crecimiento natural comparada con el control que no ha recibido ningún tratamiento. La barra gris del gráfico representa el peso fresco de la parte verde de plantas (PFV) y la barra negra indica el peso fresco de la raíz (PFR) de lechugas resultado de un bioensayo en invernadero en macetas y sobre turba como sustrato. El gráfico de barras demuestra que el fertilizante, obtenido por este procedimiento, mantiene mayor estabilidad y actividad durante más de dos años. Como se puede observar, al cabo de más de 2 años y medio, el producto aún conserva más del 90% de su efectividad.

Ejemplo 4: Evaluación de ventajas agrícolas.

Para demostrar que el producto es más activo comparado con fertilizantes químicos, se han investigado varias condiciones experimentales. Por ejemplo, fue ensayado en condiciones de campo en diferentes cultivos y los resultados obtenidos han sido muy satisfactorios. En particular en el cultivo de lechuga, fue ensayado en condiciones de campo buscando la variabilidad entre suelos, variedades y sistemas de riego.

En todos estos ensayos se logró la sustitución completa de la fertilización química obteniéndose resultados excelentes en cuanto a la cosecha, así como al contenido de nitratos, tanto en las hojas, como en los suelos. Los resultados de la distribución de calibres de las lechugas en uno de los ensayos realizados se muestran en la tabla 1. Como puede observarse, con el empleo del producto se logró una mejor distribución de los calibres (tamaños más adecuados) de interés comercial, a los efectos de la cosecha, puesto que con el fertilizante se logró una proporción de C-9 y C-10 mucho mayor que en el cultivo tradicional tratadas con fertilización química.

TABLA 1.- Distribución de calibres comerciales en el ensayo de Águilas.

% DE DISTRIBUCION DE CALIBRES		
CALIBRES	Fertilizante	CULTIVO AL USO
C-9	16%	28%
C-10	57%	68%
C-12	27%	4%

La Figura 2 muestra los efectos del tratamiento en el crecimiento de la planta, medidos como peso promedio en gramos. La barra gris del gráfico representa el fertilizante biológico de acuerdo con la presente invención, y la barra negra indica el testigo al uso. Se observa que en condiciones experimentales particulares el peso de la lechuga tratada con el fertilizante es superior o comparable al de la lechuga tratada con fertilizante químico. De hecho, se observa que a pesar de no utilizar fertilización química, los resultados obtenidos son similares e incluso superiores a los del cultivo al uso.

Las figuras 3 y 4 muestran un decrecimiento de concentración de nitratos y contaminantes medioambientales en el suelo (figura 3) y en las hojas (figura 4). Es evidente que el uso de fertilizante biológico reduce significativamente la presencia de nitratos y/o contaminantes tanto en el suelo como en las hojas, comparado con los fertilizantes químicos.

En la figura 3 se puede concluir además que mediante el empleo de este producto biofertilizante se logra una reducción drástica de la contaminación ambiental por nitratos, fosfatos y otros fertilizantes químicos. Al no añadir

ningún tipo de fertilización química, se elimina prácticamente el efecto de lavado de estas sales de los suelos. Se logró además una reducción notable del contenido de nitratos en hojas (figura 4), lo que hace que el producto sea mucho más saludable.

REVINDICACIONES

1.- Fertilizante biológico y estimulador del crecimiento vegetal que consiste en:

a.- un cultivo puro de la cepa C₃ de la especie *Pantoea dispersa* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número CECT 5801,

b.- un cultivo puro de la cepa M3 de la especie *Azospirillum brasilense* depositada en la CECT con el número CECT 5802, y

c.- Ácido indol-3-acético (AIA), o un promotor del ácido indol-3-acético seleccionado como L-triptófano.

2.- Fertilizante biológico según la reivindicación 1 caracterizado porque dicha cepa denominada C₃ es capaz de producir en medio tomate, ácido indol-3-acético en concentraciones del orden de 80-120 mg x L⁻¹.

3.- Fertilizante biológico según la reivindicación 1, caracterizado porque dichas cepas C₃, M₃ y dicho ácido indol-3-acético están inmovilizados en un soporte sólido seleccionado del grupo que comprende arcilla, vermiculita, perlita, sepiolita, caolín, tierra de diatomeas y zeolita natural.

4.- Fertilizante biológico según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende una concentración de ácido indol-3-acético del orden de 50-120 mg x kg⁻¹ de producto.

5.- Fertilizante biológico según la reivindicación 3, caracterizado porque dichas zeolitas naturales, han sido cargadas con sales y poseen la siguiente composición: Nitrógeno total (NH₄⁺): 0,3-0,5%, Potasio (K₂O): 0,10-0,25%, Fósforo (P₂O₅): 0,50-0,75%, Zinc (Zn²⁺): 85-110 ppm, Hierro (Fe²⁺): 600-800 ppm, Manganeso (Mn²⁺): 250-300 ppm y Cobre (Cu²⁺): 10-20 ppm.

6.- Fertilizante biológico según la reivindicación 1, caracterizado porque se comporta como un sistema de liberación lenta de células, nutrientes y otras sustancias.

7.- Fertilizante biológico según la reivindicación 1, caracterizado porque tiene un grado de humedad comprendido entre 2-5%.

8.- Fertilizante biológico según la reivindicación 7, caracterizado porque tiene un grado de humedad comprendido entre 2-2,5%.

9.- Procedimiento de obtención de un fertilizante biológico según las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque comprende la obtención de las cepas a través del cultivo de las cepas C₃ y M₃ mediante un proceso de fermentación sumergida en un medio de cultivo que comprende una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno orgánico y que contiene triptófano.

10.- Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque comprende la etapa de inmovilización celular y carga de nutrientes en un soporte sólido, que se lleva a cabo simultáneamente y por atomización del sólido, con los caldos de fermentación y las soluciones de nutrientes, siguiendo un esquema secuencial, mezclando continuamente para obtener un sólido húmedo homogéneo.

11.- Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque dicha fuente de carbono es pasta de tomate concentrada al 3-5% en volumen con respecto al volumen total del cultivo, dicha fuente de nitrógeno es hidrolizado de colágeno de piel animal al 0,2-1 % en volumen con respecto al volumen total del cultivo y en el cual se alcanzan concentraciones celulares de 10⁹-10¹⁰ células/mL y una concentración de ácido indol-3-acético no menor de 50 mg x L⁻¹ y porque dicho ácido indol-3-acético se añade durante y/o después de la etapa de fermentación.

12.- Procedimiento para la preparación y producción de un fertilizante biológico según la reivindicación 1 que comprende las etapas de cultivar dichas cepas, inmovilizarlas en matrices sólidas y secar dichas matrices, donde dicha etapa de secado se lleva a cabo en un secadero de lecho fluidizado a una temperatura menor de 35°C, con un secado y un flujo de aire continuos obteniendo dicho fertilizante biológico con un grado de humedad entre 2-5%.

13.- Procedimiento, según la reivindicación 12 caracterizado porque dicha etapa de cultivar dichas cepas comprende la fermentación de dichas cepas en un medio de crecimiento con L-triptófano añadido en el mismo.

Figura 1- Ensayo de estabilidad del producto a temperatura ambiente

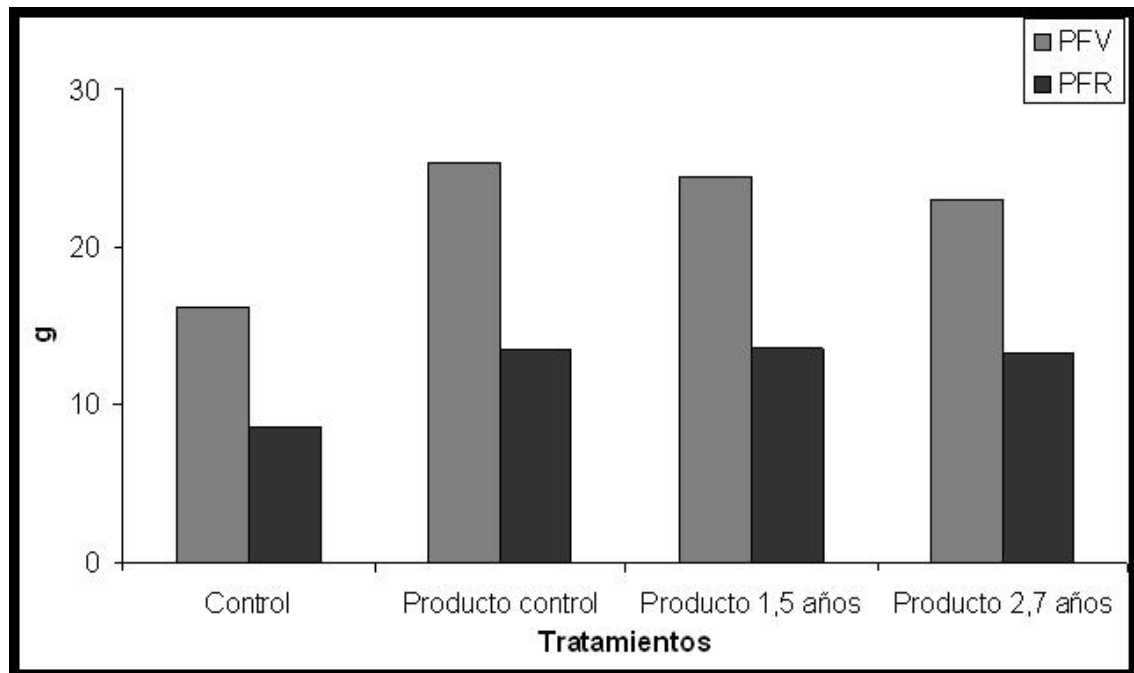


Figura 2.- Peso medio de la lechuga en cada uno de los ensayos realizados

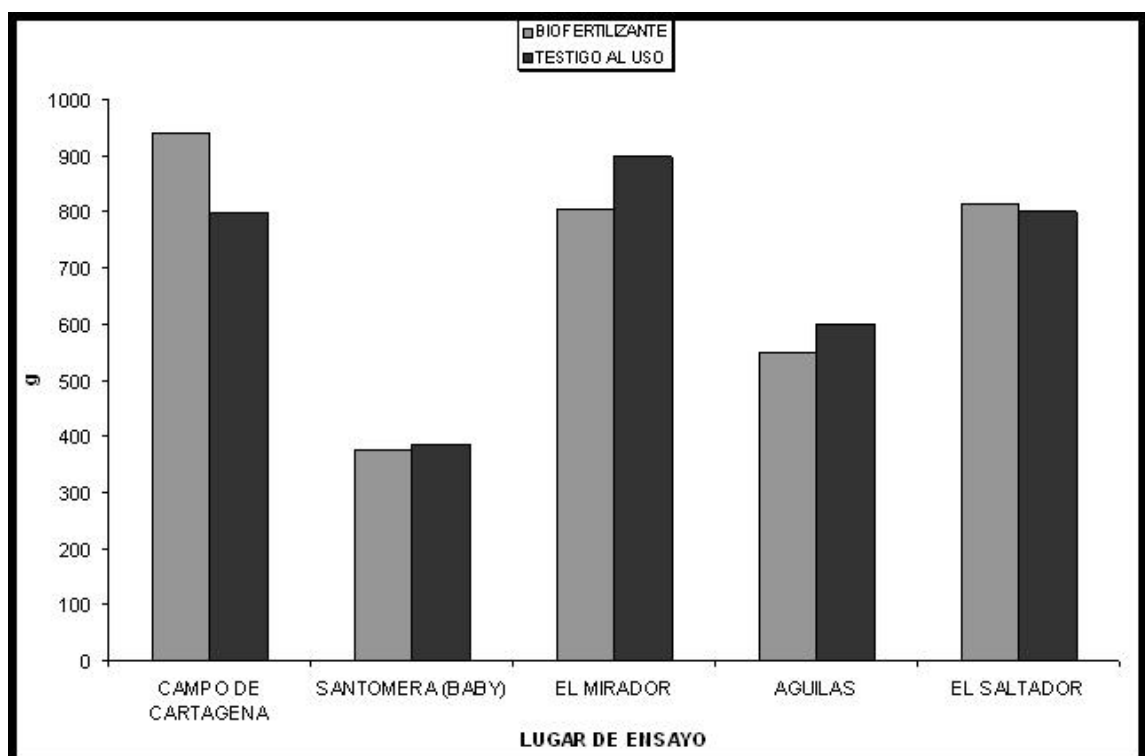


Figura 3- Cantidad de nitratos en el suelo una vez finalizada la cosecha

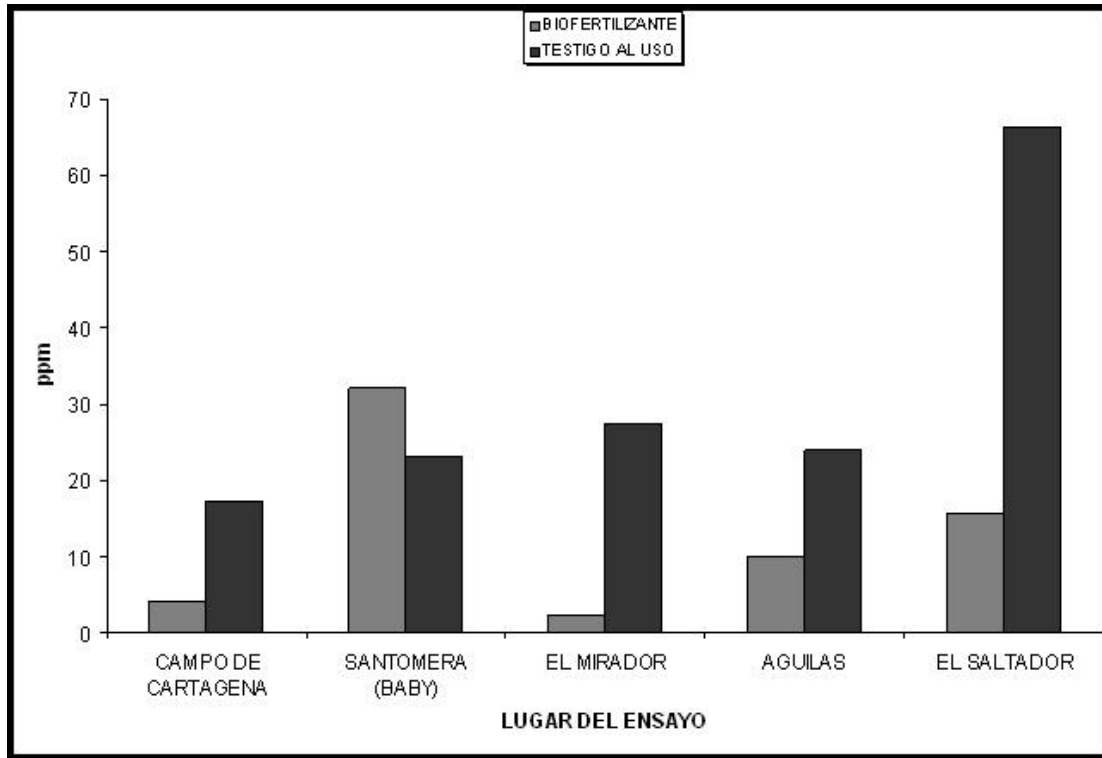


Figura 4- Contenido de nitratos en hoja en el momento de la recolección

