

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 113**

51 Int. Cl.:

**C05F 11/08** (2006.01)

**A01N 63/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2006** **E 06705219 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016** **EP 1881948**

54 Título: **Fertilizante mejorado y método para producir el mismo**

30 Prioridad:

**22.02.2005 US 654474 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.06.2016**

73 Titular/es:

**EVL INC. (100.0%)  
SUITE 202 1686 DES LAURENTIDES  
BOULEVARD  
LAVAL, QUEBEC H7M 2P4, CA**

72 Inventor/es:

**BLAIS, ALEXANDRE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 575 113 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

Fertilizante mejorado y método para producir el mismo

## 5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a métodos para producir fertilizantes mejorados, y a métodos para aumentar el crecimiento, desarrollo o rendimiento de una planta. En particular, la presente invención se refiere a un método para producir un fertilizante mejorado que comprende una combinación de especies bacterianas, trabajando las especies bacterianas en cooperación, preferiblemente sinérgicamente, para la mejora del crecimiento, desarrollo y rendimiento de la planta.

## TÉCNICA ANTECEDENTE

15 El uso de fertilizantes en agricultura está bien establecido. La técnica y la ciencia de los fertilizantes están bien desarrolladas y en una agricultura moderna a gran escala, los fertilizantes se formulan para fines muy específicos.

Más recientemente, el papel de diversos microbios en la promoción del crecimiento de las plantas ha sido objeto de investigación. Se ha descubierto que el suministro de ciertos tipos de microbios en el suelo puede tener resultados muy beneficiosos para conseguir cultivos de mayor rendimiento, mayor absorción de fertilizantes minerales por las raíces de las plantas, aumento del catabolismo de la materia orgánica (y haciendo hincapié en otros factores beneficiosos para las plantas) y también ayuda a superar parte del agotamiento del suelo que se produce como resultado del uso de fertilizantes artificiales.

25 Se conocen ya en la técnica muchos tipos diferentes de microbios que son beneficiosos para el suelo. Estos microbios son, por ejemplo, bacterias que fijan el nitrógeno. Las bacterias que fijan el nitrógeno puede convertir (o fijar) el nitrógeno directamente del aire en un nitrógeno orgánico disponible en la planta para la síntesis de proteínas. Estas bacterias de fijación de nitrógeno también pueden enriquecer el suelo alrededor de las plantas dejando material orgánico de nitrógeno en el suelo para cultivos posteriores.

30 Hasta la fecha, la aplicación de fertilizantes y bacterias al suelo se ha considerado como operaciones separadas, ya que el fertilizante líquido y especialmente el nitrógeno mineral y otros minerales contenidos en el mismo son tóxicos para bacterias en gran concentración. La aplicación de fertilizantes puede hacerse de forma seca (más común) o por pulverización en forma líquida. De forma análoga, se ha sugerido la aplicación de bacterias en el suelo utilizando una bacteria latente seca o, como alternativa, mediante la mezcla de las bacterias con un vehículo inerte. La pulverización también se practica en diversas condiciones, tal como en campo abierto, dirigida a las plantas específicamente o por inyección en el suelo.

40 Uno de los problemas de la pulverización es que los rayos ultravioleta pueden tener un efecto perjudicial sobre las bacterias y, por lo tanto, es importante controlar las condiciones. Además, las bacterias rociadas aplicadas pueden ser arrastradas por la lluvia. Además, las bacterias se aplican a menudo en un estado latente después de someterse a una operación de secado en la que se producen muchos daños celulares y, por lo tanto, las bacterias no están en su estado más activo. De hecho, antes de reanudar su actividad, las bacterias tienen una fase de latencia necesaria reiniciar los sistemas enzimáticos o para reparar la función de los sistemas enzimáticos dañados por los tratamientos impuestos sobre los fermentos para deshidratarlos o durante un largo tiempo de conservación. Más a menudo, las condiciones de los tratamientos hacen que los fermentos sólo contengan esporas. El tiempo de latencia (o fase de latencia) necesario para que las bacterias reinicien su actividad completa puede ser más de dos horas.

50 El documento KR 2002 0008488 A desvela un fertilizante que contiene extracto de alubia, yema, ácido cítrico, bacteria de ácido láctico y bacillus.

El documento CN 1 350 057 A desvela una composición para fertilizante que contiene bacillus y lactobacillus. Después del cultivo y la mezcla, se absorben sobre un vehículo.

55 El documento KR 2004 0006046 A desvela un bio-fertilizante que contiene lactobacillus y bacillus mezclados con cáscara de arroz y secados.

El documento KR 2002 0008486 A desvela un fertilizante agrícola que comprende nutrientes y microbios, tales como bacillus y lactobacillus.

60 El documento KR 2005 0006523 A desvela un método de preparación de fertilizante orgánico que comprende huesos en polvo, aceite de pescado, caparazón de cangrejo, salvado de arroz desgrasado, sedimentos de sésamo, bacillus y lactobacillus, mezclar los componentes y pulverizar la mezcla.

El documento US 4 875 921 A desvela un método para preparar un inoculante agrícolamente útil de bacteria latente seca que está activa tras exponerse de nuevo a la humedad.

5 Será muy deseable proporcionar un fertilizante mejorado que permitirá la administración de bacterias y fertilizar en una única etapa.

Será muy deseable proporcionar un método para mejorar un suelo, así como un método para aumentar el crecimiento, desarrollo o rendimiento de una planta.

10 También será muy deseable proporcionar un método para producir un fertilizante mejorado.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

15 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para mejorar un suelo para aumentar el crecimiento, rendimiento o desarrollo de una planta cultivada en el mismo.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para producir un fertilizante mejorado.

20 De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un fertilizante mejorado para una planta, comprendiendo el fertilizante una bacteria de ácido láctico y una bacteria de la familia Bacillaceae, siendo dicha bacteria de ácido láctico y dicha bacteria de la familia Bacillaceae diferentes y activas tras la rehidratación, comprendiendo dicho método mezclar una partícula de fertilizante con un primer elemento que  
 25 comprende la bacteria de ácido láctico y un segundo fermento que comprende la bacteria de la familia Bacillaceae, por lo que el primer y segundo fermento, en los que la bacteria de ácido láctico y la bacteria de la familia Bacillaceae, respectivamente, están en su fase de crecimiento exponencial, se enfrían a entre aproximadamente 0 °C a  
 aproximadamente 12 °C antes de mezclarse con la partícula de fertilizante. En una realización, la bacteria de ácido láctico procede de una familia seleccionada entre el grupo que consiste en Lactobacillaceae, Streptococcaceae, Lactococcaceae, Leuconostocs y Bifidobacteriaceae. En otra realización, la bacteria de ácido láctico procede de una especie seleccionada entre el grupo que consiste en *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc diacetylactis*, *Bifidobacterium lactis* y *Bifidobacterium brevis*. En una realización adicionalmente, la bacteria de ácido láctico  
 30 procede de una especie *Lactobacillus acidophilus*. En otra realización, la bacteria de la familia Bacillaceae procede de una especie seleccionada entre el grupo que consiste en *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*. En una realización adicional, el fertilizante mejorado comprende adicionalmente una bacteria de la especie *Pseudomonas putida*. En otra realización, la relación (l/tonelada) entre el primer o el segundo fermento y la partícula de fertilizante es de aproximadamente 1. Aún en otra realización, la concentración bacteriana del primer o el segundo fermento está entre aproximadamente  $10^7$  a aproximadamente  $10^{11}$  células por ml, y aún en una realización adicional, entre aproximadamente  $10^8$  a aproximadamente  $10^9$  células por ml. En otra realización, el segundo fermento comprende  
 35 adicionalmente una bacteria de la especie *Pseudomonas putida*. En una realización adicional, la concentración bacteriana del segundo fermento está entre aproximadamente  $10^7$  a aproximadamente  $10^{11}$  células por ml, y en una realización adicional, entre aproximadamente  $10^8$  a aproximadamente  $10^9$  células por ml. En otra realización, el potenciador comprende nutrientes para la bacteria de ácido láctico y la bacteria de la familia Bacillaceae. En una realización, el fertilizante mejorado puede usarse en una planta seleccionada entre el grupo que consiste en heno, algodón, coliflor, maíz y soja. En una realización, la bacteria de ácido láctico y la bacteria de la familia Bacillaceae son capaces de adherirse a la partícula de fertilizante, y en una realización, se adhieren directamente por unirse a un  
 45 aglutinante.

50 La presente invención permite un potenciador para un fertilizante para una planta, el potenciador comprende la bacteria de ácido láctico como se describe en el presente documento y una bacteria de la familia Bacillaceae como se describe en el presente documento. En una realización, la bacteria de ácido láctico y la bacteria de la familia Bacillaceae son capaces de adherirse a la partícula del fertilizante.

55 La presente invención permite adicionalmente un aditivo para el suelo para mejorar el crecimiento, desarrollo o rendimiento de una planta. En una realización, el aditivo para suelo comprende la bacteria de ácido láctico descrita en el presente documento y la bacteria de la familia Bacillaceae que se describe en el presente documento. En otra realización, la bacteria de ácido láctico y la bacteria de la familia Bacillaceae son capaces de adherirse a la partícula de un fertilizante que se describe en el presente documento.

60 Aún en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para mejorar el crecimiento, desarrollo o rendimiento de una planta, comprendiendo dicho método aplicar el fertilizante mejorado descrito en el presente documento a un suelo en la proximidad de las raíces de la planta.

La presente invención permite adicionalmente un método para mejorar un suelo con el fin de aumentar el crecimiento, desarrollo o rendimiento de una planta que crece en el mismo. En una realización, el método

comprende la etapa de añadir al suelo el fertilizante mejorado descrito en el presente documento.

Para el fin de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

5 El término "fermento" pretende referirse al producto de una fermentación de un sustrato orgánico por una cepa bacteriana. Este producto puede adoptar cualquier forma, pero está preferiblemente en una forma líquida y puede pulverizarse o atomizarse fácilmente. La expresión "fermento mixto" pretende referirse al producto de una fermentación de un sustrato orgánico por más de una cepa bacteriana. Este producto puede adoptar cualquier forma, pero está preferiblemente en una forma líquida y puede pulverizarse o atomizarse fácilmente.

10 Como se usa en el presente documento, el término "fermentación" se refiere a una transformación controlada, normalmente enzimática, más preferiblemente por una bacteria, de un sustrato orgánico.

15 La expresión "cepa bacteriana activa" pretende referirse a una cepa bacteriana que puede reiniciar rápidamente la fermentación, con poca o ninguna fase de latencia (normalmente menos de dos horas para reiniciar la multiplicación activa y el crecimiento).

20 El término "fertilizante" pretende referirse a partículas sólidas aglomeradas de sustancias químicas. En una realización, las partículas del fertilizante pueden contener cualquier combinación de o todo de nitrógeno (N), fosfato (P) y potasio (K). La expresión "partícula de fertilizante" es la materia sólida que constituye el fertilizante. La partícula de fertilizante puede contener cualquier combinación de o todo de nitrógeno (N), fosfato (P) y potasio (K). Las partículas contenidas en un fertilizante pueden ser homogéneas, parcialmente homogéneas, parcialmente heterogéneas o heterogéneas con respecto a su contenido de nitrógeno (N), fosfato (P) y potasio (K).

25 La expresión "mejorar el crecimiento, el rendimiento o el desarrollo de una planta" pretende referirse a la capacidad de una sustancia para favorecer, acelerar o aumentar el crecimiento, el desarrollo o el rendimiento de una planta.

30 La expresión "mejorar un suelo" pretende referirse a la acción de enriquecer un suelo para favorecer, acelerar o aumentar el crecimiento, el desarrollo o el rendimiento de una planta.

35 El término "aglutinante" pretende referirse a un material inerte que se usa para unir la bacteria a la partícula de fertilizante. Por ejemplo, podría usarse talco como un aglutinante. El término "talco" es el nombre habitual de un polvo de silicato natural de magnesio. El término "talco" también pretende referirse a cualquier medio en polvo que tenga una buena y rápida potencia de absorción higroscópica. En la técnica de la agricultura, el talco se usa con frecuencia como aglutinante, especialmente en el campo de los pesticidas. El talco normalmente se fija rápidamente al agua.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

40 Diferentes microbios, por ejemplo diferentes bacterias, pueden producir diferentes enzimas. Estas diferencias son beneficiosas en casos de simbiosis. Agrícola e industrialmente, dichas diferencias enzimáticas pueden aplicarse de forma complementaria en procesos de biodegradación de material biológico o catabolismo incompleto por bloqueo de radicales secundarios acumulados en la biodegradación de proteínas, ácidos grasos, azúcares complejos de derivados aromáticos y cíclicos o sustancias tóxicas. Los diferentes microbios también pueden tener diferentes funciones en el transporte activo de ciertos elementos minerales. Estas diferencias pueden aprovecharse empleando cócteles microbianos o diversas mezclas que contienen combinaciones de dos o más especies bacterianas diferentes pero compatibles que trabajan juntas en cooperación, preferiblemente sinérgicamente, para acelerar, no sólo la degradación del material orgánico y las sustancias tóxicas, sino también la liberación de nutrientes y elementos minerales solubles y absorbibles presentes en el fertilizante y/o para aumentar la captación de nutrientes y elementos minerales absorbibles por una planta.

55 De acuerdo con la presente invención, las especies bacterianas deseadas, procedentes de cepas de origen de las mismas, se someten en primer lugar a un proceso de fermentación y después se combinan con el fertilizante. Las diversas especies bacterianas se cultivan (se incuban) por separado o juntas como un co-cultivo. Típicamente, el proceso de fermentación bacteriana tiene lugar en un medio de cultivo apropiado, donde los nutrientes deseados permiten el crecimiento de las bacterias. Este medio de cultivo debe contener una fuente de carbohidratos (tales como lactosa, sacarosa o glucosa) para soportar el crecimiento celular bacteriano, una fuente de proteínas que pueda metabolizarse fácilmente por las bacterias (soja, peptonas, proteínas de leche, proteínas de pescado o proteínas animales) y una fuente de minerales. El medio de cultivo seleccionado no debe inhibir el crecimiento de las bacterias. En una realización, el medio de cultivo es un suero enriquecido con proteínas (tal como un suero que contiene un 5 % de materia seca) o un medio de cultivo basado en leche en polvo.

60 Cuando las bacterias se ponen en primer lugar en un medio de cultivo, normalmente muestran un periodo de letargo de hasta dos (2) horas, donde se observa poca o ninguna multiplicación bacteriana. Esta primera fase de

crecimiento se denomina por los expertos en la técnica la fase de latencia. Después, las bacterias normalmente entran en un periodo de reproducción logarítmica o exponencial (fase de crecimiento exponencial) hasta que la población bacteriana alcanza una concentración de aproximadamente  $10^7$  a  $10^{11}$  células/ml (preferiblemente entre  $10^8$  a  $10^9$  células/ml). Después de que alcancen esta concentración, las bacterias normalmente entran en una fase de estabilización del crecimiento y normalmente muestran una desaceleración de la multiplicación. En la técnica, esta fase de estabilización del crecimiento se explica normalmente por la falta de nutrientes o una acumulación de subproductos de fermentación tóxicos.

Las bacterias que están presentes en el fertilizante mejorado se cultivaron hasta que alcanzaron la fase de crecimiento exponencial pero antes de que alcanzasen la fase de estabilización del crecimiento. En una realización, la concentración bacteriana del fermento añadido a las partículas de fertilizante está entre aproximadamente  $10^7$  a  $10^{11}$  células por ml, y preferiblemente de aproximadamente  $10^8$  a  $10^9$  células por ml. Como se muestra en el presente documento, el uso de bacterias que están en su fase de crecimiento exponencial para su combinación con el fertilizante garantiza que, después de la aplicación del fertilizante mejorado a un suelo (y, por lo tanto, las bacterias se rehidratan), reinician su crecimiento y/o actividad metabólica (menos de dos horas).

El fertilizante mejorado (y métodos relacionados) pueden comprender diversas especies bacterianas, pero más preferiblemente las que pueden tener un efecto beneficioso sobre plantas o el crecimiento, rendimiento o desarrollo de cultivos. El tipo particular de bacteria o microbio que puede usarse con la presente invención puede ser cualquier tipo deseable conocido de especie bacteriana que pueda someterse con éxito al tratamiento anterior. Dichas especies bacterianas conocidas incluyen bacterias fijadoras de nitrógeno, microbios usados en biorremediación de suelos, microbios usados en la industria láctea, etc.

Una ventaja de las composiciones y métodos que se describen en el presente documento es el hecho de que los microbios están en un estado saludable cuando se mezclan con el fertilizante habitual. Por lo tanto, las células bacterianas se dañan mínimamente por los métodos descritos en el presente documento y pueden reiniciar su crecimiento y/o actividad metabólica tras la rehidratación. Hay un tiempo de latencia mínimo para el crecimiento bacteriano en comparación con otros métodos y composiciones conocidas en la técnica.

En una realización, el fertilizante mejorado comprende una partícula de fertilizante, una bacteria de ácido láctico y una bacteria de la familia Baciliaceae. La bacteria de ácido láctico puede ser, por ejemplo, de la familia Lactobacillaceae, Streptococcaceae, Lactococcaceae, Leuconostocs y/o Bifidobacteriaceae. La especie de la bacteria de ácido láctico puede ser, por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc diacetylactis*, *Bifidobacterium lactis* y/o *Bifidobacterium brevis*. La especie de la bacteria de una familia Baciliaceae puede ser, por ejemplo, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y/o *Bacillus licheniformis* coagulasa negativa. La bacteria de la familia Baciliaceae puede producir muchas exoenzimas. Un experto en la técnica reconocerá que es necesario evitar el uso de cepas *Bacillus* capaces de producir hemolisina, así como las cepas que tienen propiedades septicémicas por motivos de salud. En otra realización, el fertilizante mejorado puede comprender adicionalmente una bacteria que tiene efectos beneficiosos sobre el crecimiento, el rendimiento y el desarrollo de una planta. En una realización, la bacteria puede proceder de la especie *Pseudomonas putida*. La bacteria de la especie *Pseudomonas putida* se usa con frecuencia en procesos de biorremediación. Puede constituir de hasta aproximadamente el 8 al 9 % del co-cultivo, y ejercer una acción positiva y beneficiosa en la absorción de minerales para las plantas. También puede facilitar la degradación de sustancias tóxicas, como hidrocarburos y otros contaminantes que pueden estar presentes en el suelo.

El fertilizante mejorado descrito en el presente documento comprende una bacteria de ácido láctico y una bacteria de la familia Baciliaceae. Antes de su combinación con las partículas de fertilizante, la bacteria de ácido láctico y la bacteria de la familia Baciliaceae pueden cultivarse por separado o en co-cultivo. En una realización, más de una especie de bacteria de ácido láctico puede combinarse con el fertilizante habitual y la bacteria de la familia Baciliaceae. Antes de su combinación con las partículas de fertilizante y la bacteria de la familia Baciliaceae, las diversas especies de bacterias de ácido láctico pueden cultivarse por separado o en co-cultivo. En una realización, más de una especie de bacteria de la familia Baciliaceae puede combinarse con las partículas de fertilizante y la bacteria de ácido láctico. Antes de su combinación con las partículas de fertilizante y la bacteria de ácido láctico, las diversas especies de bacterias de la familia Baciliaceae pueden cultivarse por separado o en co-cultivo. En otra realización, una bacteria de la especie *Pseudomonas putida* puede combinarse con las partículas de fertilizante, la bacteria de ácido láctico (o las diversas especies de bacterias de ácido láctico) y la bacteria de la familia Baciliaceae (o las diversas especies de bacterias de la familia Baciliaceae). Antes de su combinación con las partículas de fertilizante, la bacteria de ácido láctico y la bacteria de la familia Baciliaceae, la bacteria de la especie *Pseudomonas putida* pueden cultivarse por separado o en co-cultivo.

Las bacterias cultivadas en un proceso de fermentación de co-cultivo deben ser "compatibles". Como se usa en el presente documento, el término "compatible" se refiere a la capacidad de diversas especies bacterianas de crecer juntas sin afectar de forma adversa a sus respectivas propiedades de crecimiento o la su actividad biológica.

Las diversas especies bacterianas también pueden cultivarse en proceso de fermentación separados y combinarse posteriormente con las partículas de fertilizante.

- 5 Las bacterias combinadas con las partículas de fertilizante deben ser capaces de conservar sus respectivas propiedades de crecimiento o actividad biológica cuando se aplican al suelo.

10 En una realización, se seleccionan preferiblemente bacterias capaces de reiniciar su crecimiento y/o sus actividades metabólicas una vez aplicadas al suelo. Con el fin de conseguir este resultado, el crecimiento bacteriano en un proceso de fermentación puede bloquearse una vez que las bacterias alcanzan su fase de crecimiento exponencial. Este bloqueo puede conseguirse mediante frío o cualquier otro medio conocido en la técnica.

15 Después de que el proceso de fermentación ha avanzado hasta un punto en el que la población bacteriana está en el intervalo de  $10^7$  a  $10^{11}$  células por ml (preferiblemente entre  $10^8$  a  $10^9$  células por ml), a las células bacterianas se les enseña a alcanzar su desarrollo potencial máximo completo. Llegados a este punto, la fermentación se somete preferiblemente a una acción para detener la multiplicación bacteriana. Preferiblemente, la fermentación se detiene rápidamente (por ejemplo, en una hora, en 30 minutos o preferiblemente entre 10 y 25 minutos). Cuando un proceso de fermentación se detiene rápidamente, los daños causados a las bacterias del fermento son mínimos, y las bacterias no tienden a convertirse en un estado latente o esporas. Por lo tanto, cuando el proceso de fermentación se detiene rápidamente, las bacterias presentes en el fermento se reactivan más rápidamente tras la rehidratación después de haberse mezclado con las partículas de fertilizante. En una realización, el fermento se lleva preferiblemente a una temperatura de entre 0 °C a 12 °C, y más preferiblemente a una temperatura de entre 0 °C y 5 °C. Para reducir la temperatura del fermento, el proceso de fermentación puede enfriarse con cualquier medio de refrigeración conocido en la técnica. En una realización, el fermento puede colocarse en un baño de hielo. En una 25 realización, cuando la concentración bacteriana es apropiada, los fermentos pueden pulverizarse directamente sobre las partículas de fertilizante, enfriando así la temperatura de los fermentos. Los fermentos también pueden pulverizarse en gotas finas sobre un material absorbente para deshidratar las bacterias muy rápidamente de tal forma que la multiplicación ya no sea posible. Como alternativa, el enfriamiento puede conseguirse por diafiltración o centrifugación rápida en un medio tamponado. Además, un experto en la técnica podrá usar un método criogénico 30 rápido con crioprotectores, donde la sublimación tras la criogenización de una fase líquida imitará una pseudoliofilización. Las bacterias secadas mediante este procedimiento pueden volver a hidratarse después justo antes de pulverizarse sobre el fertilizante. Las técnicas de refrigeración descritas en el presente documento tienen el objetivo de impedir el estrés bacteriano (causando de este modo esporulación o entrada en una fase latente), y de asegurar que las bacterias permanecen completamente activas y funcionales tras la rehidratación, con un tiempo de 35 latencia mínimo.

40 Los fermentos en los que la multiplicación bacteriana se ha bloqueado pueden aplicarse sobre fertilizante granular seco. En una realización, los fermentos bacterianos se vaporizan sobre partículas de fertilizante secas. Dependiendo de sus propiedades físicas/químicas respectivas, las partículas de fertilizante pueden permitir una deshidratación muy rápida de las gotas bacterianas de los fermentos. En cambio, la rápida deshidratación de las gotas bacterianas favorece la viabilidad y la actividad de las bacterias, permitiendo de este modo que las bacterias reinicien su actividad rápidamente cuando se rehidratan de nuevo (por ejemplo, cuando el fertilizante mejorado se aplica al suelo).

45 Después de enfriar rápidamente el fermento, el fermento se combina preferiblemente en 72 horas, y más preferiblemente en 48 horas, sobre partículas de fertilizante. En una realización, el fermento se pulveriza sobre partículas de fertilizante. Los fermentos individuales de especies bacterianas separadas pueden aplicarse junto, mezclado los fermentos individuales antes de o durante la aplicación o aplicando los fermentos individuales al mismo tiempo (simultáneamente), por ejemplo, por pulverización desde pulverizadores separados. Como alternativa, los 50 fermentos individuales pueden aplicarse por separado o secuencialmente (independientemente).

55 Si ha de aplicarse una concentración mayor sobre las partículas de fertilizante (por ejemplo, mayor de  $10^8$  a  $10^9$  células por ml), el fermento puede someterse a una etapa de concentración, tal como dia-centrifugación, para aumentar su concentración a aproximadamente  $10^{10}$  células por ml.

60 Llegados a este punto, en una realización, un fermento de co-cultivo (o mezcla) o fermentos individuales separados de especies bacterianas separadas se pulverizan entonces sobre una partícula de fertilizante sólida de tal forma que las bacterias se adhieren a la partícula de fertilizante. Los fermentos de especies bacterianas separadas pueden aplicarse juntos, mezclando los fermentos separados antes de o durante la aplicación, o aplicando los fermentos separados al mismo tiempo, por ejemplo, por pulverización desde pulverizadores separados. Como alternativa, los fermentos separados pueden aplicarse independientemente entre sí. La partícula de fertilizante, que está relativamente seca, absorberá la partícula bacteriana y la humedad se dispersará por todas partes y las bacterias permanecerán en un estado estable latente. Los fermentos deben pulverizarse sobre las partículas de fertilizante a una tasa de entre 0,2 a 4,0 l/toneladas de partículas de fertilizante, o preferiblemente aproximadamente 2,0

5 l/toneladas de partículas de fertilizante. Una pulverización a una mayor tasa hará que el producto químico del fertilizante se solubilizce parcialmente, liberando nitrógeno concentrado en la superficie del fertilizante, en la proximidad de las bacterias, que es tóxico para las bacterias en tal micro-entorno concentrado. Preferiblemente, el fermento se pulveriza a una tasa de 0,5 a 2,0 l/tonelada, y mucho más preferiblemente a 2,0 l/tonelada sobre el fertilizante.

En un aspecto adicional y diferente de la presente invención, el fermento puede pulverizarse sobre una partícula de semilla.

10 En lugar de pulverizar, los fermentos también pueden aplicarse por medio de un agente de unión, tal como almidón o talco, o cualquier otro producto adecuado que funcionará para unir la bacteria al producto de semilla. La leche en polvo es particularmente adecuada para tal aplicación. De hecho, cualquier polvo seco, tal como talco, harina, azúcares, almidón o leche en polvo, pueden complementarse con un agente de unión, tal como aceite o grasa láctea, por ejemplo, para permitir que el polvo seco se una a las bacterias y el fertilizante. El polvo seco que puede usarse de acuerdo con la presente invención es aquel que puede absorber por contacto la humedad, que no es tóxico para las bacterias y que puede actuar como un aglutinante. Una vez que la bacteria se ha adherido al aglutinante, puede combinarse con el fertilizante antes de la aplicación al suelo.

20 En el proceso anterior, el fertilizante puede ser cualquiera deseado. Como se ha mencionado anteriormente, el producto fertilizante absorbe el exceso de humedad y, con este fin, el fertilizante puede formularse para tener esta capacidad. Naturalmente, el producto fertilizante normalmente tendrá un volumen al menos varias veces mayor que una partícula de fermento líquido. En otras palabras, el fermento líquido puede atomizarse y pulverizarse sobre el producto fertilizante siendo la humedad absorbida sobre todo el conjunto del producto fertilizante y, por lo tanto, deshidratando las bacterias para dejarlas en un estado latente estable mientras que están relativamente sanas con poco daño celular. Como tal, después, las bacterias permanecen estables y activas y listas para reiniciar su actividad en las condiciones apropiadas de rehidratación en el suelo.

30 En una realización particular, la concentración del elemento nutritivo en un fermento puede ajustarse de tal forma que permanece en el fermento, en el momento en el que el proceso de fermentación se detiene, una cierta cantidad de material nutritivo. Este material nutritivo, con los microbios, puede entonces pulverizarse sobre la partícula de fertilizante. Cuando la partícula de fertilizante se hidrata en el suelo, la bacteria o microbio reiniciará entonces su actividad y ésta en condiciones deseables en las que el material nutritivo está fácilmente disponible. Naturalmente, el material nutritivo también está disponible para su uso en el suelo.

35 El material nutritivo en el planteamiento de fermentación puede seleccionarse entre cualquier número de materiales conocidos, incluyendo leche diferente, cualquier ingrediente usado normalmente y reconocido en los medios fermentados para fines de fermentación de cualquier cultivo microbiano, incluyendo medios sintéticos, o subproductos animales o de pescado, así como azúcares y similares.

40 En un aspecto adicional y diferente de la presente invención, el fermento, como un fermento mixto o fermentos separados de varias especies bacterianas, puede aplicarse directamente al suelo, ya sea fertilizado o no, como un aditivo para el suelo para mejorar el crecimiento o el rendimiento de una planta que crece en dicho suelo. Cuando el fermento se rehidrata en el suelo, las bacterias o microbios reanudarán entonces su actividad, para acelerar la degradación del material orgánico o sustancias tóxicas, o para liberar nutrientes y elementos minerales solubles y absorbibles para su uso por una planta o para aumentar la captación de nutrientes y elementos minerales absorbibles por una planta. Naturalmente, el material nutritivo también está disponible para su uso en el suelo.

50 En un aspecto adicional de la presente invención, el fertilizante mejorado descrito en el presente documento puede aplicarse antes, después o simultáneamente con cualquier otro fertilizante convencional.

55 En otro aspecto, la presente invención proporciona un potenciador para un fertilizante para una planta. El potenciador puede comprender una bacteria de ácido láctico y una bacteria de la familia Baciliaceae. La bacteria de ácido láctico y la bacteria de la familia Baciliaceae deben adaptarse para adherirse a la partícula del fertilizante. Esta adaptación puede incluir, por ejemplo, que la bacteria de ácido láctico y la bacteria de la familia Baciliaceae puedan fijarse a una molécula aglutinante capaz de unir el fertilizante. El potenciador puede mezclarse con el fertilizante antes de la aplicación al suelo. El potenciador puede aplicarse al suelo antes de, al mismo tiempo o después de aplicar un fertilizante al suelo.

60 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un aditivo para el suelo para mejorar el crecimiento, desarrollo o rendimiento de una planta. El aditivo de suelo puede comprender una bacteria de ácido láctico y una bacteria de la familia Baciliaceae. La bacteria de ácido láctico y la bacteria de la familia Baciliaceae han de adaptarse para adherirse a la partícula del fertilizante. Esta adaptación puede incluir, por ejemplo, que la bacteria de ácido láctico y la bacteria de la familia Baciliaceae puedan fijarse a una molécula aglutinante capaz de unir el fertilizante, o puede encapsularse en un material capaz de ligar el fertilizante. El aditivo de suelo puede mezclarse

con el fertilizante antes de su aplicación al suelo. El aditivo de suelo puede aplicarse al suelo antes de, al mismo tiempo o después de aplicar un fertilizante al suelo.

5 Una ventaja adicional de la presente invención es proporcionar un método para la administración de bacterias al suelo, precisamente sobre o cerca de donde se encuentran las partículas de fertilizante en el suelo, evitando la dispersión de las bacterias en la masa de suelo total, y teniendo un aumento local de la concentración de las células bacterianas en proximidad cercana a las partículas de fertilizante.

10 En una realización, los métodos descritos en el presente documento proporcionan el uso de una pluralidad de etapas de pulverización para pulverizar un fertilizante, suelo o semilla con las bacterias. A este respecto, se usan dos o más tipos diferentes de bacterias, cada una seleccionada por sus propiedades enzimáticas o funcionales conocidas para producir resultados interesantes o beneficiosos en un fertilizante, suelo, semilla. Por lo tanto, esta posibilidad permite tener dos o más procesos de fermentación diferentes en diferentes condiciones de fermentación. Así, como se conoce en la técnica, existen diferentes parámetros para diferentes tipos de microbios y, por lo tanto, se pueden realizar múltiples procesos de fermentación separados en diferentes condiciones mientras que se pulverizan un fertilizante, suelo o partículas de semilla secuencialmente, o juntos. Cuando se usan múltiples fermentos, los múltiples fermentos pueden pulverizarse independiente o concurrentemente, en cuyo caso, preferiblemente se mezclan entre sí justo antes de la pulverización sobre el fertilizante, suelo o semilla.

20 Para la aplicación en el suelo, puede usarse un equipo convencional y, por lo tanto, se minimizan los gastos y el proceso se realiza en una única operación ahorrando además dinero.

Como se ha mencionado anteriormente, también es altamente ventajoso que los microbios se apliquen al suelo en buenas condiciones y listos para reanudar el crecimiento (tiempo de latencia mínimo) cuando se hidrata el suelo.

25 El fertilizante mejorado puede aplicarse a cualquier planta. Por ejemplo, el fertilizante mejorado puede aplicarse a plantas frondosas, frutas, verduras, plantas usadas en jardinería ornamental, gramíneas, cereales, flores, árboles y arbustos. El fertilizante mejorado puede aplicarse sobre una diversidad de productos que incluyen heno, col, planta del café, siringa, apio, col, patata, lechuga, pepino, arroz, maíz, soja, coliflor y algodón, por ejemplo. Todas las plantas anteriores mostraron un aumento o un mejor rendimiento.

30 Las partículas de fertilizante están en un entorno favorable para capturar la humedad de las gotas de fermento rápidamente. Sin embargo, existen otros productos granulares o en polvo disponibles que pueden hacer lo mismo. Los ejemplos son talco, azúcares, harinas y cualquier otro material absorbente, tal como productos absorbentes comerciales capaces de deshidratar gotas de fermento muy rápidamente y hacerlo de manera que la hidratación final de la mezcla sea de tal forma que la humedad residual no permita ningún crecimiento o ni siquiera ninguna actividad metabólica hasta que el producto resultante entre en contacto de nuevo con suficiente humedad como para iniciar el metabolismo de nuevo. Dichos talco, azúcares, harinas y otros materiales absorbentes pueden mezclarse con el fertilizante para adherirse al mismo.

40 Las aplicaciones son numerosas, dado que seleccionando productos granulares o en polvo que tienen propiedades adhesivas, los polvos o partículas pueden enriquecerse por fermentos concentrados obtenidos por procesos de neutralización o concentración, tales como ultrafiltración, o similares, y finalmente mezclarse, por ejemplo, en suelos, fertilizantes o semillas. Este proceso puede aplicarse a suelos, fertilizantes o semillas simplemente usando mezcladores mecánicos y el fermento enriquecido puede producirse en un punto central separado de las plantas de fertilizantes. Esto reduce las necesidades de inversión. Además, cada uno de los constituyentes de fermento de una mezcla puede reproducirse por separado y, después de haber controlado su concentración, pueden entonces mezclarse entre sí con precisión. Esta tecnología modificada puede aplicarse a compost y cualquier material utilizado en agricultura. Por ejemplo, el método de la presente invención puede usarse para revestir semillas, o tratar suelo con un microorganismo o mezcla de microorganismo, o un cóctel, si así se desea.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para mejorar un suelo para aumentar el crecimiento, el desarrollo o el rendimiento de una planta que crece en el mismo. El método comprende la etapa de añadir al suelo el fertilizante mejorado descrito en el presente documento.

55 Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un fertilizante mejorado. El método comprende mezclar una partícula de fertilizante con una bacteria de ácido láctico y una bacteria de la familia Bacillaceae. En una realización, la bacteria de ácido láctico está presente en un primer fermento. Este primer fermento se mezcla con las partículas de fertilizante a una relación de aproximadamente 1 l de fermento por tonelada de fertilizante. Preferiblemente, el primer fermento se enfría (de aproximadamente 0 °C a 12 °C o de aproximadamente 0 °C a 5 °C) antes de mezclarse con la partícula de fertilizantes, para asegurar que las bacterias reanudan su crecimiento y actividad metabólica tras la rehidratación. En otra realización, la bacteria de la familia Bacillaceae está presente en un segundo fermento. Este segundo fermento también puede contener bacterias de la especie *Pseudomonas putida*. Este segundo fermento se mezcla con las partículas de fertilizante a una relación de

aproximadamente 1 l de fermento por tonelada de fertilizante. Preferiblemente, el segundo fermento se enfría (de aproximadamente 0 °C a 12 °C o de aproximadamente 0 °C a 5 °C) antes de mezclarse con la partícula de fertilizantes, para asegurar que las bacterias reanudan su crecimiento y actividad metabólica tras la rehidratación. Antes de su combinación con las partículas de fertilizante, la bacteria de ácido láctico y la bacteria de la familia Baciliaceae están preferiblemente en su fase de crecimiento exponencial. La concentración bacteriana del primer fermento y el segundo está entre aproximadamente  $10^7$  a aproximadamente  $10^{11}$  células/ml. En una realización, los nutrientes para la bacteria de ácido láctico y la bacteria de la familia Baciliaceae pueden mezclarse con las partículas de fertilizante. En otra realización, la bacteria de ácido láctico y la bacteria de la familia Baciliaceae se pulverizan sobre las partículas de fertilizante y, preferiblemente, se pulverizan concurrentemente sobre las partículas de fertilizante.

La presente invención se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan para ilustrar la invención en lugar de limitar su alcance.

#### 15 EJEMPLO I *Preparación del fertilizante mejorado.*

El fermento I contenía únicamente *Lactobacillus acidophilus*. El *Lactobacillus acidophilus* se incubó a una temperatura de aproximadamente  $30 \pm 3$  °C en un medio de cultivo basado en suero. Esta bacteria puede incubarse a otras temperaturas de 5 °C hasta su temperatura letal máxima. Un experto en la técnica comprenderá que cuando se usan otras cepas, la temperatura óptima y los rangos de crecimiento diferentes variarán consecuentemente.

El fermento II contenía *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Pseudomonas putida*. *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Pseudomonas putida* se cultivaron conjuntamente a una temperatura de aproximadamente  $27 \pm 2$  °C en un medio de cultivo basado en suero. La forma no esporulante de los miembros de la familia *Bacillus* se escogen porque están en su estado más activo. Las bacterias pueden incubarse a otras temperaturas dentro de sus rangos de crecimiento. Un experto en la técnica comprenderá que cuando se usan otras cepas, la temperatura de crecimiento óptima y los intervalos de crecimiento variarán consecuentemente.

Una vez que los cultivos bacterianos alcanzaron  $10^8$ - $10^9$  bacterial células por ml, el fermento I y el fermento II se enfriaron (con un baño de hielo) y se pulverizaron concurrentemente sobre partículas de fertilizante. El fertilizante que se pulveriza puede ser cualquier fertilizante mineral recomendado por un especialista en fertilizantes del campo de acuerdo con los resultados del análisis del suelo para una planta específica. Cada fermento se atomizó por separado y se pulverizó concurrentemente sobre partículas de fertilizante móviles. La Tabla 1 indica las diversas combinaciones de los fermentos pulverizados sobre el fertilizante usado en los siguientes ejemplos.

Tabla 1 - Combinaciones de los fermentos pulverizados I y II por tonelada de fertilizante

Combinación	Litros de fermento I	Litros de fermento II
A	0	0
B	0	2
C	1	1
D	2	0
E	0,5	1,5

#### EJEMPLO II *Aplicación del fertilizante mejorado sobre heno y algodón*

Para los ensayos de campo de heno, un fertilizante que tenía un N-P-K de 20-13-19 se pulverizó con la combinación C que se ha descrito en el Ejemplo I. También se usó un fertilizante de control no pulverizado con la combinación. Después, ambos fertilizantes estaban a una tasa de 100 kg/acre en los ensayos de campo en un campo de heno donde se aplicó previamente un fertilizante mineral en 100 kg/acre. Los tratamientos se hicieron por duplicado.

En el momento del corte del heno, los resultados muestran que la combinación C de cada uno de los fermentos generó los mejores resultados. En el momento del corte, el heno tratado con la combinación C era más oscuro y casi alcanzó 6 pulgadas (15,24 cm) de altura. Una vez que se aplicó la combinación C, el heno era más verde y más saludable que el forraje no tratado (heno tratado con fertilizante no pulverizado). Estos resultados indican una interacción sinérgica entre las diferentes cepas bacterianas presentes en la combinación.

Para los ensayos de campo de algodón, un fertilizante que tenía un N-P-K de 20-13-19 que contenía 2 kg de azufre se pulverizó con la combinación que se ha descrito en el Ejemplo I. Después, el fertilizante se aplicó en campos de algodón. Los tratamientos se hicieron por duplicado. Las aplicaciones del fertilizante pulverizado con las combinaciones B, D y E dan como resultado algún beneficio para el algodón, pero inferior y menos regular que los resultados obtenidos con la combinación C. Estos resultados también muestran la sinergia entre los fermentos usados en el fertilizante.

## EJEMPLO III Prueba de viabilidad bacteriana

Con el fin de verificar que las bacterias pulverizadas en el fertilizante eran viables, el fertilizante revestido (50 g) se solubilizó en 40 litros de tampón fosfato estéril. Después, el fertilizante solubilizado se sometió a ultrafiltración usando un segundo tampón fosfato de 40 litros. Después, el filtrado se incubó en LBS y MRS. De hecho, los resultados indicaron que las bacterias eran capaces de reanudar su crecimiento.

## EJEMPLO IV Efecto del fertilizante mejorado en el crecimiento y desarrollo de la coliflor

Los ensayos de campo han tenido lugar en la comunidad de Boson (ciudad de BacNinh, provincia de Bac ninh, Vietnam). Las coliflores estudiadas eran de la variedad china. Las coliflores crecieron entre 85 a 90 días (incluyendo el tiempo de vivero). Las coliflores se trasplantaron el 3 de noviembre de 2005 y se cosecharon el 23 de enero de 2006. El espaciamiento de las plantas era de 70 cm por 40 cm. La densidad era de 36.000 plantas por hectárea. Las plantas se trataron cinco veces, el diseño se repitió 4 veces. El tamaño del terreno era de 24 m<sup>2</sup>. La Tabla 2 indica el fertilizante total usado en los diversos tratamientos.

Tabla 2 Fertilizante total (kg/ha) usado en los tratamientos experimentales

Tratamiento	Combinación pulverizada en el fertilizante (como se ha descrito en el Ejemplo I)	Fertilizante FYM	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O
1	C	0	180	180	180
2	B	0	180	180	180
3	D	0	180	180	180
4	A	0	180	180	180
5	Ninguna	5000	150	120	150

Las combinaciones se pulverizaron en el fertilizante descrito en la Tabla 2 únicamente para la aplicación basal. Para los tratamientos 1 a 4, una primera aplicación basal (20 % del fertilizante total) del fertilizante pulverizado con las diversas combinaciones se aplicó justo debajo de las semillas plantadas. Una primera capa de abono de 15 kg/ha de fosfato de diamonio (DAP) y el 40 % del fertilizante total (no pulverizado) se aplicaron por el albardón lateral 15 días después de la siembra. Una segunda capa de abono de 35 kg/ha de fosfato de diamonio (DAP) y el 20 % del fertilizante total (no pulverizado) se aplicaron por el albardón lateral 35 días después de la siembra. Una tercera capa de abono de 5 kg/ha de fosfato de diamonio (DAP) y el 20 % del fertilizante total (no pulverizado) se aplicaron por el albardón lateral 50 días después de la siembra.

Para el tratamiento 5 (control), una primera aplicación basal del fertilizante FYM (una combinación de estiércol de compostaje y residuos vegetales), 50 kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 20 kg/ha de N y 20 kg/ha de K<sub>2</sub>O se aplicaron justo bajo las semillas plantadas. Una primera capa de abono de 15 kg/ha de fosfato de diamonio (DAP) 40 kg/ha y 40 kg/ha de K<sub>2</sub>O se aplicaron por el albardón lateral 15 días después de la siembra. Una segunda capa de abono de 35 kg/ha de fosfato de diamonio (DAP), 50 kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 20 kg/ha de N y 20 kg/ha de K<sub>2</sub>O se aplicaron por el albardón lateral 35 días después de la siembra. Una tercera capa de abono de 50 kg/ha de fosfato de diamonio (DAP), 20 kg/ha de N y 20 kg/ha de K<sub>2</sub>O se aplicaron por el albardón lateral 50 días después de la siembra.

Después del tratamiento, las coliflores se cosecharon y se midieron varios parámetros. La Tabla 3 muestra los datos de cosecha para la biomasa total (tallo, hoja y flor) y la masa de la flor de las coliflores cosechadas. La Tabla 4 muestra los efectos de los tratamientos en la biomasa de coliflor (% de CV es 4,43, LSD 0,05 es 0,61) y en la masa de la flor de las coliflores (el producto comercializable, % CV 4,78, LSD 0,05, 0,25).

Las plantas tratadas con la combinación C (tratamiento 1) no sólo tenían la mayor biomasa total sino también la mayor masa de flor, por lo tanto, el mayor índice comercializable. El índice de producto comercializable de plantas tratadas con la combinación C aumenta en más del 14 % con respecto al tratamiento de control (tratamiento 5). El índice de producto comercializable de plantas tratadas con la combinación (tratamiento 2) aumenta en más del 12 % con respecto al tratamiento de control (tratamiento 5).

Tabla 3 Datos de cultivo

Tratamiento	Rep I	Rep II	Rep III	Rep IV
Biomasa total (tonelada/ha)				
1	92,35	87,12	91,25	88,06
2	84,29	91,20	87,26	90,43
3	81,06	83,70	83,38	85,46
4	85,11	87,90	86,26	88,42
5	81,40	81,50	77,76	68,22
Biomasa de flor (tonelada/ha)				
1	40,24	39,85	36,66	36,99
2	37,85	37,39	36,65	38,88

3	32,83	31,81	33,02	34,18
4	31,49	35,14	33,19	34,48
5	31,75	27,71	28,77	27,29

Tabla 4 Biomasa de coliflor y masa de flor e índice comercializable medio

Tratamiento	Biomasa total (tonelada/ha)	Masa de flor total (tonelada/ha)	Índice comercializable*
1	89,70	38,44	0,429
2	88,30	37,69	0,427
3	83,40	32,96	0,395
4	86,92	33,58	0,386
5	77,22	28,88	0,375

\*(Masa de flor total/biomasa total)

EJEMPLO V Aplicación del fertilizante mejorado en cultivos de maíz y soja

5 Para el ensayo de campo de maíz, la combinación C que se ha descrito en el Ejemplo I se pulverizó en el fertilizador (adquirido en Synagri) que tenía un N-P-K de 20-10-20 (en el presente documento denominado como "TOTAL") o una fracción del fertilizante que contenía calcio, magnesio y diversas cargas (denominada en el presente documento como "FRACCIÓN"). Después, el fertilizante se aplicó, en un campo adyacente al procedimiento de siembra normal, 10 en un campo de maíz a una concentración de 325 kg/acre.

Para el ensayo del campo de soja, la combinación C que se ha descrito en el Ejemplo I se pulverizó en el fertilizante (adquirido en Synagri) que tenía un N-P-K de 15-20-20 (denominado en el presente documento como "TOTAL") o una fracción del fertilizante que contenía calcio, magnesio y diversas cargas (denominada en el presente documento como "FRACCIÓN"). Después, el fertilizante se aplicó en un campo de soja a una concentración de 140 kg/acre. 15

Los cultivos de maíz y de soja se cosecharon y se midió su biomasa total. Las Tablas 5 y 6 muestran los datos cosechados en bruto obtenidos.

20

Tabla 5 Datos de maíz cultivado

Tratamiento	Rep I (tonelada/ha)	Rep II (tonelada/ha)	Total (tonelada/ha)
Sitio I			
No pulverizado	10,2	11,9	11,1
TOTAL	9,2	11,8	10,5
FRACCIÓN	10,5	12,2	11,3
Sitio II			
No pulverizado	10,1	9,0	9,5
TOTAL	9,3	8,5	8,9
FRACCIÓN	10,2	10,2	10,2

Tabla 6 Datos de soja cultivada

Tratamiento	Rep I (tonelada/ha)	Rep II (tonelada/ha)	Total (tonelada/ha)
Sitio I			
No pulverizado	4,9	4,9	4,9
TOTAL	5,4	5,6	5,5
FRACCIÓN	5,4	5,4	5,5
Sitio II			
No pulverizado	3,7	3,2	3,7
TOTAL	3,7	3,0	4,1
FRACCIÓN	N.A.	N.A.	N.A.

25 La biomasa total de los cultivos de maíz tratados con un fertilizante (total o fracción) pulverizado con la combinación C aumentó entre el 1,8 y el 7 % con respecto a la biomasa total del maíz de control (tratado con fertilizante no pulverizado). La biomasa total de las cosechas de soja tratadas con un fertilizante (total o fracción) pulverizada con la combinación C aumento en aproximadamente el 10 % con respecto a la biomasa total de la soja de control (tratada con fertilizante no pulverizado).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.Un método para producir un fertilizante mejorado para una planta, comprendiendo el fertilizante una bacteria de ácido láctico y una bacteria de la familia Bacillaceae, siendo dicha bacteria de ácido láctico y dicha bacteria de la familia Bacillaceae diferentes y activas tras la rehidratación,
- comprendiendo dicho método mezclar una partícula de fertilizante con un primer elemento que comprende la bacteria de ácido láctico y un segundo fermento que comprende la bacteria de la familia Bacillaceae, por lo que el primer y segundo fermento, en los que la bacteria de ácido láctico y la bacteria de la familia Bacillaceae, respectivamente, están en su fase de crecimiento exponencial, se enfrían a entre aproximadamente 0 °C a 10 aproximadamente 12 °C antes de mezclarse con la partícula de fertilizante.
- 2.El método de la reivindicación 1, en el que la mezcla de los fermentos bacterianos con la partícula de fertilizante se realiza pulverizando los fermentos bacterianos simultáneamente sobre la partícula de fertilizante.
- 3.El método de la reivindicación 1, en el que los nutrientes para la bacteria de ácido láctico y la bacteria de una familia de las Bacillaceae se mezclan con las partículas de fertilizante.
- 15 4.El método de la reivindicación 1, en el que la planta se selecciona entre el grupo que consiste en heno, algodón, coliflor, maíz y soja.
5. El método de la reivindicación 2, en el que la relación (l/tonelada) entre el primer o el segundo fermento y la partícula de fertilizante es de aproximadamente 1.
- 20 6.El método de la reivindicación 2, en el que la concentración bacteriana del primer o el segundo fermento está entre aproximadamente  $10^7$  a aproximadamente  $10^{11}$  células por ml, preferiblemente entre aproximadamente  $10^8$  a aproximadamente  $10^9$  células por ml.
- 7.El método de la reivindicación 2, en el que el segundo fermento comprende adicionalmente una bacteria de la especie *Pseudomonas putida*.
- 25 8.El método de la reivindicación 1, en el que la bacteria de ácido láctico procede de una familia seleccionada entre el grupo que consiste en Lactobacillaceae, Streptococcaceae, Lactococcaceae, Leuconostocs y Bifidobacteriaceae.
- 9.El método de la reivindicación 1, en el que la bacteria de ácido láctico procede de una especie seleccionada entre el grupo que consiste en *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetyllactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc diacetyllactis*, *Bifidobacterium lactis* y *Bifidobacterium brevis*.
- 30 10.El método de la reivindicación 1, en el que la bacteria de ácido láctico procede de una especie *Lactobacillus acidophilus*.
- 11.El método de la reivindicación 1, en el que la bacteria de la familia Bacillaceae procede de una especie seleccionada entre el grupo que consiste en *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*.
- 35 12.Un método para mejorar el crecimiento, desarrollo o rendimiento de una planta, comprendiendo dicho método aplicar el fertilizante mejorado preparado de acuerdo con la reivindicación 1 a un suelo en la proximidad de las raíces de la planta o bajo la semilla de la planta.