

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 058**

51 Int. Cl.:

A01C 1/06 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2014 PCT/EP2014/058759**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14177583**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2014 E 14721814 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2958415**

54 Título: **Recubrimiento de semillas que contiene partículas minerales y microorganismos secos**

30 Prioridad:

02.05.2013 EP 13166268

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

31.01.2017

73 Titular/es:

**GLOBACHEM NV (100.0%)
Brustem Industriepark Lichtenberglaan 2019
3800 sint-Truiden, BE**

72 Inventor/es:

CLAES, FRANCIS

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 599 058 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

Recubrimiento de semillas que contiene partículas minerales y microorganismos secos

5 Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a un método para recubrir una semilla, dicho método comprende aplicar una capa que contiene minerales que comprende partículas minerales y un aglutinante acuoso a dicha semilla, en donde la relación en peso de dicho aglutinante acuoso para dichas partículas minerales es menor que 0,4; y aplicar una capa microbiana que comprende microorganismos secos a dicha capa que contiene mineral, mientras que dicha capa que contiene mineral es todavía adherente. Además, la presente invención proporciona semillas recubiertas que contienen partículas minerales y microorganismos secos.

15 Antecedentes de la invención

Es bien conocido que ciertos microorganismos cuando están presentes en el suelo, en la proximidad de las semillas de plantas particulares, pueden funcionar en simbiosis con las semillas en una serie de formas para mejorar, por ejemplo, el crecimiento de las plantas, o el control de ciertas plagas. Entre los ejemplos más conocidos de tal relación simbiótica es la que existe entre las plantas leguminosas y las bacterias del género *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. La fijación de nitrógeno por estas plantas sólo es posible debido a la presencia de estas bacterias, que forman nódulos en las raíces de las leguminosas. No obstante, se conocen también varios otros microorganismos que son beneficiosos cuando se localizan cerca del entorno de la semilla o la planta.

25 Los microorganismos que se usan en el tratamiento de las semillas se pueden aplicar al entorno de la semilla en una variedad de formas. Generalmente, las bacterias se pueden aplicar directamente al suelo, las semillas se pueden inocular con los microorganismos inmediatamente antes de la siembra, o las semillas pueden recubrirse bien con microorganismos antes de la siembra. Una de las principales dificultades encontradas cuando se usa el último enfoque es que la mayoría de los microorganismos mueren durante el proceso de recubrimiento.

30 Para el recubrimiento de semillas con microorganismos, la mayoría de los procesos comprenden las etapas de elaborar una suspensión que contiene microorganismos secos o no secos, aplicar la suspensión a las semillas y secar las semillas recubiertas. Un método de este tipo, que genera semillas con microorganismos en el propio recubrimiento, se describe por ejemplo, en EP0818135. Otro ejemplo de este enfoque se describe en EP0097459, en donde los microorganismos se añaden de manera que están aproximadamente en el medio de un recubrimiento que comprende un aglutinante y relleno. Sin embargo, se encontró que la presencia de los microorganismos en la suspensión acuosa afecta negativamente su supervivencia. Además, se necesitan tiempos extensos de secado para este tipo de aplicación, por ejemplo, 1,5 horas como se describió en EP0097459, que es consumidor de energía e impacta negativamente en la viabilidad de la semilla, así como en los microorganismos.

40 Otra opción es aplicar, por ejemplo, microorganismos secos para secar la semilla recubierta o no recubierta. Por ejemplo, US6156699 describe las semillas de alfalfa que se pulverizan con una mezcla que contiene aglutinante, polvo de piedra caliza, tensioactivo, colorante, un agente de suspensión y 30,3 porcentaje de agua en peso. Después de la adición de sílice finamente molida, las semillas se secan por una corriente de aire caliente antes de la aplicación de un polvo que contiene bacterias de *Rhizobium*. Un estudio de Brockwell y otros. (Crop and Pasture Science, 1962, 13(4):638-649) comparó un enfoque de este tipo con el método de suspensión descrito anteriormente. Se encontró que la incorporación de los microorganismos en el recubrimiento condujo a una mayor viabilidad y estabilidad del inoculante que la aplicación externa.

50 Aún otra opción es recubrir las semillas con un aglutinante y aplicar composiciones que contienen organismos secos directamente a las mismas. Por ejemplo, EP0192342 describe un portador de salvado seco que se mezcla con los microorganismos secos que se aplica a las semillas recubiertas con goma. EP0192342 es silente sobre la presencia de minerales, sólo deja partículas minerales. EP0494802 se refiere a la aplicación de partículas que contienen polisacáridos polimerizados y los microorganismos secos a las semillas recubiertas con un adhesivo. US5041290 aplica polvo de ascosporas a las semillas recubiertas con adhesivo.

55 No obstante, permanece la necesidad de nuevos métodos para el recubrimiento de semillas, que resultan en una mayor viabilidad y estabilidad de los microorganismos y que requieren menos tiempo y energía (secado).

60 Resumen de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para el recubrimiento de semillas, dicho método comprende

65 - aplicar una capa que contiene minerales que comprende partículas minerales y un aglutinante acuoso a dicha semilla, en donde la relación en peso de dicho aglutinante acuoso para dichas partículas minerales es menor que 0,4, y

- aplicar una capa microbiana que comprende microorganismos secos a dicha capa que contiene minerales, mientras que dicha capa que contiene minerales es todavía adherente; para obtener una semilla recubierta en donde la capa microbiana es exterior a la capa que contiene minerales.

5 En una modalidad particular, dichas partículas minerales comprenden uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en loes, una caolinita, una heulandita, una pirofilita, una calcita, una perlita, basalto, lava, cristobalita, y esmectita. En otra modalidad particular, dichas partículas minerales tienen un tamaño granular promedio por debajo de 90 micras. En aún otra modalidad particular, el aglutinante acuoso es un aglutinante acuoso que contiene carbohidratos. En una modalidad adicional, la capa que contiene minerales tiene un pH de 6,5 a 8,5.

10 Además, se ha encontrado que la viabilidad y la estabilidad de los microorganismos en la capa microbiana se pueden aumentar aún más mediante la aplicación de una capa protectora sobre dicha capa microbiana, en donde dicha capa protectora comprende un aglutinante acuoso que contiene carbohidratos y un protector. Además, el proceso de recubrimiento puede comprender adicionalmente aplicar una capa superior que comprende una sustancia inerte. En otra modalidad, la semilla recubierta se puede secar.

15 Además, la presente invención proporciona una semilla recubierta obtenible mediante los métodos de recubrimiento de la invención. En una modalidad particular, la presente invención proporciona una semilla recubierta que comprende:

20 - Una capa que comprende partículas minerales y un aglutinante, en donde la relación en peso de dicho aglutinante a dichas partículas minerales es menor que 0,2, y donde dichas partículas minerales comprenden uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en loes, una caolinita, una heulandita, una pirofilita, una calcita, una perlita, basalto, lava, cristobalita, y esmectita.

25 - una capa microbiana exterior a dicha capa que contiene minerales; y
- una capa protectora exterior a dicha capa microbiana, en donde dicha capa protectora comprende un aglutinante que contiene carbohidratos y un protector.

30 La semilla recubierta puede comprender además una capa superior que comprende una sustancia inerte.

Descripción detallada de la invención

35 Como se describió anteriormente, la invención proporciona un método para recubrir semillas, dicho método comprende

- aplicar una capa que contiene minerales que comprende las partículas minerales y un aglutinante acuoso a dicha semilla, en donde la relación en peso de dicho aglutinante acuoso a dichas partículas minerales es menor que 0,4, y

40 - aplicar una capa microbiana que comprende microorganismos secos a dicha capa que contiene minerales, mientras que dicha capa que contiene minerales es todavía adherente.

45 La cantidad sorprendentemente baja de aglutinante conduce a una capa adherente que contiene minerales sobre la cual los microorganismos secos pueden adherirse. La relación en peso de dicho aglutinante acuoso para dichas partículas minerales es preferentemente por debajo de 0,4. Como se discutirá adicionalmente en la presente descripción, la aplicación de una cantidad baja de aglutinante de este tipo a las partículas minerales conlleva a varias ventajas. Es particularmente interesante, aplicar una cantidad de aglutinante tan baja como sea posible que conduce aún a una fuerte adherencia de las partículas minerales y mantiene las propiedades adherentes de la capa que contiene minerales. En una modalidad preferida, la relación en peso del aglutinante acuoso a las partículas minerales, que se conoce también como la relación de líquido en polvo en el campo de los recubrimientos de semillas, es inferior a 0,3, particularmente entre 0,1 y 0,3. En una modalidad adicional, la relación está por debajo de 0,25, más particularmente por debajo de 0,2.

50 La presente invención proporciona varias ventajas sobre la técnica anterior. Particularmente, dada la baja cantidad de aglutinante acuoso para las partículas minerales, la capa que contiene minerales es relativamente seca, pero todavía permanece adherente para unir los microorganismos. Por lo tanto, los microorganismos aplicados no se rehidratan significativamente al ponerse en contacto con la capa que contiene minerales. Además, sin querer estar limitado por la teoría, es la sensación de los inventores de que las partículas minerales secas en la capa que contiene minerales absorben más humedad del aglutinante y el medio ambiente durante un breve momento después de que se ha formado la capa que contiene minerales. Como tal, las partículas minerales en la capa que contiene mineral ayuda aún más en la prevención de la rehidratación de los microorganismos, lo que resulta en una mayor viabilidad y estabilidad de los microorganismos secos después de la aplicación a la semilla.

55 Además, parece que la superficie irregular de la capa que contiene minerales en un nivel microscópico proporciona un mejor entorno para los microorganismos en comparación con los que se unen directamente a la semilla. Los microorganismos secos pueden unirse a las partículas minerales porosas o entre las partículas, asegurando de ese

60

modo, que no se desprendan fácilmente durante el transporte y la manipulación de las semillas recubiertas, así como que estén en un ambiente óptimo para el crecimiento posterior cuando se plantan en el suelo.

5 Además de los efectos beneficiosos sobre los microorganismos, se ha encontrado que el método de la invención es ventajoso también, para las semillas. Debido a la baja cantidad de aglutinante acuoso en la capa que contiene minerales, las semillas además, no se ponen en contacto con altos niveles de humedad, tal como es, por ejemplo, el caso cuando el recubrimiento se aplica como una suspensión. La hidratación de la semilla tiene frecuentemente un impacto negativo sobre las características de las semillas, especialmente cuando las semillas se cebaron antes del recubrimiento. Las semillas cebadas se trataron de manera que germinaran más rápido. Sin embargo, incluso la hidratación muy baja de semillas cebadas puede iniciar los procesos de germinación de la semilla. Por lo tanto, la presente invención, que se aplica un recubrimiento que contiene minerales con una baja cantidad de aglutinante acuoso, es especialmente útil para recubrir las semillas cebadas con microorganismos secos.

15 Se ha encontrado además, que no hay necesidad de realizar una etapa de secado adicional antes de la unión de los microorganismos a la capa que contiene minerales, reduciendo de ese modo, el consumo de energía y tiempo. Evidentemente, uno puede elegir añadir un aglutinante más acuoso o agua (teniendo en cuenta la cantidad de agua que pueden absorber como máximo las partículas minerales) al recubrir la semilla con la capa que contiene mineral, y después aplicar una etapa de secado para reducir la cantidad de aglutinante acuoso en las partículas minerales por debajo de 0,4 antes de aplicar los microorganismos secos. Esto resultará en el mismo tipo de capa que contiene minerales y todavía se aplica una capa que contiene minerales como se describe en la presente invención. La aplicación de las partículas minerales y aglutinante para la producción de la capa que contiene minerales se puede realizar inmediatamente antes de la aplicación de los microorganismos secos, opcionalmente en el mismo tambor. Por lo tanto, todas las etapas del método de la invención se pueden realizar en etapas consecutivas inmediatas en el mismo tambor, en el mismo dispositivo de recubrimiento. Esto reduce el tiempo total para el recubrimiento de las semillas con el microorganismo seco a sólo unos pocos minutos. Incluso, es posible llevar a cabo el método descrito anteriormente dentro de un solo minuto (unos 45 segundos para aplicar la capa que contiene minerales y aproximadamente de 5-15 segundos para aplicar los microorganismos secos).

30 El experto en la técnica es muy consciente de cómo seleccionar partículas minerales que pueden usarse en la capa que contiene minerales de la presente invención, es decir, las partículas minerales que pueden unirse por una baja cantidad de aglutinante acuoso y que proporcionan una capa que es todavía adherente, pueden unir los microorganismos secos. Por lo tanto, las partículas minerales que deben usarse en la presente invención típicamente tienen propiedades de baja absorción de agua. De particular interés son las partículas minerales que comprenden uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en loes, una caolinita, una heulandita, una pirofillita, una calcita, una perlita, basalto, lava, cristobalita, y esmectita. "Mineral" o "partícula mineral" como se usa en la presente descripción se refiere a un elemento o compuesto químico sólido cristalino que resulta de los procesos inorgánicos de la naturaleza. Las partículas minerales son abiogénicas. No deben ser confundidas con los nutrientes minerales o minerales dietéticos, que son términos arcaicos para los elementos o nutrientes dietéticos. Los elementos dietéticos o nutrientes describen elementos químicos, pero no minerales reales. Además, los elementos dietéticos no están presentes como partículas, sino como formas salinas (no cristalinas). Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, el término "mineral" o "partículas minerales" no incluye los nutrientes minerales o minerales dietéticos, tales como por ejemplo los presentes como iones minerales en los materiales derivados de plantas. No obstante, los elementos o nutrientes dietéticos pueden añadirse a la composición de recubrimiento, además de las partículas minerales. Las propiedades de los minerales, incluyendo los minerales indicados en esta solicitud, se pueden encontrar, por ejemplo, en la Clasificación Dana (Dana's New Mineralogy, 8va Ed. por Gaines, Skinner, Foord, Mason and Rosenzweig; disponible también en el sitio de internet webmineral.com/danaclass.shtml). En una modalidad adicional, las partículas minerales comprenden partículas minerales de silicato, particularmente, partículas de filosilicato, más particularmente en partículas minerales de arcilla. El inventor identificó que puede ser beneficioso aplicar una mezcla de dos o más partículas minerales. Por lo tanto, la presente invención proporciona además, un método en donde dichas partículas minerales comprenden dos o más elementos seleccionados del grupo que consiste en loes, una caolinita, una heulandita, una pirofillita, una calcita, una perlita, basalto, lava, cristobalita, y esmectita. Se prefiere que las partículas minerales no afecten negativamente a la germinación. En otra modalidad preferida, las partículas minerales tienen un tamaño granular promedio por debajo de 150 micras, particularmente por debajo de 100 micras, más particularmente por debajo de 90 micras. En una modalidad adicional, las partículas minerales tienen un tamaño granular promedio por debajo de 60 micras. En otra modalidad particular, las partículas minerales tienen un tamaño granular promedio por encima de 1 micra, particularmente por encima de 5 micras, más particularmente por encima de 10 micras. Por lo tanto, en una modalidad, las partículas minerales tienen un tamaño granular promedio entre 1 y 150 micras, particularmente entre 1 y 100 micras; más particularmente entre 1 y 90 micras. Por lo tanto, en otra modalidad, las partículas minerales tienen un tamaño granular promedio entre 5 y 150 micras, particularmente entre 5 y 100 micras; más particularmente entre 5 y 90 micras. Por lo tanto, en una modalidad, las partículas minerales tienen un tamaño granular promedio entre 10 y 150 micras, particularmente entre 10 y 100 micras; preferentemente entre 10 y 60 micras.

65 En otra modalidad preferida, las partículas minerales tienen un pH neutro, tal como un pH entre 6,5 y 8,5, particularmente entre 7,0 y 8,0. Cuando se usa una mezcla de diferentes partículas minerales, el pH de la mezcla es preferentemente neutro. Por lo tanto, la mezcla de diferentes tipos de partículas de mineral ayuda en la obtención de una mezcla neutra cuando una de las partículas minerales no tiene un pH neutro. Como diferentes tipos de partículas

minerales necesitan también diferentes cantidades de aglutinante acuoso que se unan fuertemente y sean todavía adherentes, la mezcla de diferentes tipos de partículas minerales ayuda también a afinar la cantidad de aglutinante acuoso necesaria en la capa que contiene minerales.

5 A modo de ejemplo solamente, una mezcla adecuada de partículas minerales puede existir de (en porcentaje en peso):

- entre el 25-40 % de Loes,
- entre el 25-40 % de caolinita, y
- entre el 25-40 % de calcita.

10

Típicamente, una mezcla de este tipo tendrá un pH de aproximadamente 7,8 y se unirá óptimamente con una cantidad de aglutinante de aproximadamente 0,18 veces el peso de la mezcla de partículas minerales. Esta cantidad de aglutinante muy baja proporciona todavía una capa adherente que contiene minerales con una fuerte adhesión a la semilla.

15

En principio, se puede usar cualquier aglutinante acuoso en la capa que contiene minerales de la presente invención. En una modalidad preferida, el aglutinante acuoso en la capa que contiene minerales es un aglutinante que contiene carbohidrato. Un aglutinante que contiene carbohidratos de este tipo, tiene la ventaja añadida de que proporciona una fuente de carbono para el crecimiento de los microorganismos después de la hidratación cuando se plantan. En una modalidad preferida adicional, el aglutinante que contiene carbohidrato se selecciona del grupo que consiste en una goma natural y un producto derivado del almidón. Cualquier goma natural soluble en agua puede usarse, pero de particular interés son la goma arábiga, goma ghatti y goma xantana; más particularmente, la goma xantana. Varios aglutinantes acuosos se conocen, que consisten esencialmente de los productos derivados del almidón. En una modalidad particular, el producto derivado de almidón se selecciona del grupo que consiste en un almidón, una dextrina o una maltodextrina; más particularmente, un almidón (tal como, tapioca) o una maltodextrina. En aún otra modalidad, el aglutinante acuoso es un producto natural.

20

25

En una modalidad, el aglutinante está presente en 1-50% en peso de la solución acuosa. Particularmente de aproximadamente 5-30%, más particularmente de aproximadamente 5-20%. Evidentemente, una mezcla de aglutinantes puede usarse para obtener el aglutinante acuoso. Por ejemplo, si se usan dos aglutinantes, uno de ellos está preferentemente presente como 30-70% de la cantidad de aglutinante total.

30

En otra modalidad, el pH del aglutinante acuoso es neutro, tal como un pH entre 6,5 y 8,5, particularmente aproximadamente 7,0. En otra modalidad particular, el pH de la capa que contiene minerales es neutral, tal como un pH entre 6,5 y 8,5, particularmente entre 6,5 y 7,5, más particularmente aproximadamente 7,0. Por lo tanto, es posible corregir el pH de las partículas minerales a través de la selección del pH del aglutinante acuoso. Por ejemplo, si la mezcla de partículas minerales es básico, se puede seleccionar un aglutinante acuoso ácido, tal que la capa final que contiene minerales tiene un pH relativamente neutro.

35

Además de permitir la adherencia de los microorganismos secos a las semillas y mejorar su viabilidad y estabilidad, la capa que contiene minerales tiene el beneficio añadido de aumentar el peso y el tamaño de las semillas recubiertas. Esto permite el mejor manejo de las semillas recubiertas, por ejemplo, en dispositivos de distribución de semillas. En una modalidad preferida, la capa que contiene minerales está presente en una cantidad de al menos 10 % (p/p) de la semilla, más particularmente al menos 20 % (p/p). En una modalidad adicional, la capa que contiene minerales está presente en una cantidad de 10 % a 100 % del peso de la semilla (sin recubrir), más particularmente 20 % a 50 %. Cantidades superiores de la capa que contiene minerales no influyen negativamente en la viabilidad y estabilidad de los microorganismos. Por lo tanto, una ventaja adicional de la presente invención es que la cantidad de la capa que contiene minerales (y por lo tanto, también el volumen final y el peso de las semillas recubiertas acabadas) puede seleccionarse libremente, en función del peso final preferido y el volumen de las semillas. Por ejemplo, las semillas de alfalfa pueden recubrirse con una capa que contiene minerales que pesan aproximadamente 30% en peso de las semillas. Por otra parte, las pequeñas semillas de plantas de tabaco pueden recubrirse con una capa que contiene minerales de aproximadamente 8000 % del peso de las semillas.

40

45

50

Mientras que la mayoría de los métodos de recubrimiento de la técnica anterior necesitan que los microorganismos secos estén presentes en un portador, tal como el salvado o la turba, la presente invención puede usarse para recubrir semillas con cualquier tipo de microorganismos secos. Por lo tanto, los microorganismos secos pueden estar presentes en un material portador, tal como salvado, turba o ciertas matrices poliméricas, pero también pueden estar presentes por sí. Por ejemplo, microorganismos liofilizados o secados en horno o esporas secas pueden aplicarse directamente, sin enlazarlos a un primer portador. Cualquier microorganismo beneficioso puede recubrirse con los métodos de la presente invención. Los ejemplos incluyen microorganismos del género *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Xanthomas*, *Bradyrhizobium*, etcétera. Los métodos de la presente invención son especialmente ventajosos, ya que no requieren rehidratación de los microorganismos secos y/o su portador antes de su aplicación en el recubrimiento. Además, el recubrimiento de la invención puede comprender nutrientes, preferentemente nutrientes que pueden servir como una fuente de alimento de los microorganismos, una vez que se activan. Evidentemente, especialmente en el caso de aglutinantes orgánicos o que contienen carbohidratos, el aglutinante en sí puede funcionar también como una fuente de crecimiento para los microorganismos una vez que se activan mediante la rehidratación.

55

60

65

En otra modalidad particular, el recubrimiento comprende además, nutrientes de las plantas.

Inesperadamente, los inventores encontraron también que la viabilidad y la estabilidad de los microorganismos secos puede mejorarse además mediante la aplicación de una capa protectora sobre dicha capa microbiana, en donde dicha capa protectora comprende un aglutinante acuoso y un protector. El protector puede ser un poliol, tal como glicerol o propilenglicol. En una modalidad preferida, el aglutinante acuoso en la capa protectora es un aglutinante que contiene carbohidratos o una cera. En una modalidad particular, el aglutinante acuoso en la capa protectora es un aglutinante que contiene carbohidratos, como se describe en la presente descripción. En otra modalidad particular, el aglutinante acuoso en la capa protectora es una cera. Cualquier cera dispersable en agua puede usarse, particularmente, una cera natural, tal como la cera de Carnaúba. Se asume que las propiedades hidrófobas de las ceras ayudan en la prevención de la hidratación de los microorganismos secos. Sin embargo, sorprendentemente, la hidrofobicidad no tiene ningún efecto negativo sobre la hidratación en la siembra de las semillas recubiertas. Preferentemente, la capa de cera se pone sobre las semillas en una cantidad tal que la película todavía contiene poros que le permiten al agua y oxígeno llegar a las semillas y empezar el proceso de germinación. En una modalidad preferida, la cera se aplica como una dispersión acuosa que contiene menos de 20%, particularmente menos de 15%, de cera. En una modalidad adicional, dicha dispersión acuosa de cera se aplica en una cantidad de menos de 100 ml, particularmente menos de 50 ml, por kg de semillas. En otra modalidad, se aplica menos de 20 g de cera (peso seco) por kg de semillas, particularmente menos de 10 g, más particularmente menos de 5 g.

Por ejemplo, una dispersión acuosa de cera de Carnaúba de 40% de cera se diluye en agua en una relación de 1:10 a 1:20 tal que se logra una dispersión acuosa final de 4% a 8% de cera de carnaúba. A partir de esta dispersión 25 a 50 ml se pone sobre 1 kg de semillas, en función del peso de mil semillas (TSW) y por lo tanto, la superficie total disponible de las semillas.

El método de recubrimiento de la invención puede comprender además aplicar una capa superior que comprende una sustancia inerte. La adición de una capa superior de este tipo impide que las semillas recubiertas se adhieran entre sí, lo que aumenta así, la capacidad de flujo. Ejemplos de sustancias inertes incluyen sustancias orgánicas o minerales, tales como talco o mica. Sustancias inertes pueden seleccionarse, por ejemplo, en dependencia del aspecto deseado de las semillas recubiertas. En una modalidad particular, la sustancia inerte se aplica en aproximadamente 0,5 % p/p de las semillas recubiertas.

Opcionalmente, el método de la presente invención comprende además el secado de la semilla recubierta. En el caso, las semillas recubiertas se secan, el secado se realiza preferentemente a temperaturas relativamente bajas para evitar dañar los microorganismos en el recubrimiento. Las temperaturas de secado típicas están entre 15 °C y 40 °C, preferentemente aproximadamente 30°C. Una ventaja particular de la presente invención es que la baja cantidad de aglutinante acuoso en la capa que contiene minerales y la baja cantidad de humedad usada en todo el método de la invención, conduce a una etapa de secado que puede ser muy corta o incluso completamente ausente, a pesar de la baja temperatura de secado. Por lo tanto, todo el método para llegar a las semillas recubiertas que contienen microorganismos secos, puede acabarse bien dentro de los 15 minutos. Se asume que este marco de tiempo pequeño en donde los microorganismos pueden estar en contacto con la humedad es un contribuyente importante a la viabilidad y estabilidad alta observada del microorganismo.

Evidentemente, los métodos de recubrimiento de la presente invención son compatibles con varias otras técnicas de recubrimiento. Por lo tanto, las sustancias adicionales pueden mezclarse en las capas de recubrimiento de la invención, o aplicarse entre o en la parte superior de ellas. Por ejemplo, la coloración de las semillas se aplica regularmente para diferenciar los diferentes tipos de semillas entre sí, para ayudar al sembrador en ver las semillas y su distribución, y para disminuir el atractivo los animales que consumen la semilla, tal como las aves. Consecuentemente, los agentes colorantes pueden añadirse a, por ejemplo la capa que contiene minerales, la capa microbiana, o la capa superior. Evidentemente, los agentes colorantes preferidos no tienen un impacto negativo en la supervivencia, la estabilidad y el crecimiento posterior de los microorganismos. De manera similar, los fertilizantes pueden usarse en los recubrimientos de semillas para aumentar el crecimiento de la planta o los microorganismos. Además, las sustancias químicas conocidas que protegen la semilla o planta de las plagas pueden añadirse en los recubrimientos de semillas. Las sustancias químicas preferidas no tienen un impacto negativo en la supervivencia, la estabilidad y el crecimiento posterior de los microorganismos. Por lo tanto, los métodos de la presente invención pueden comprender además adicionar uno o más aditivos a la semilla recubierta. Particularmente, estos aditivos se seleccionan del grupo que consiste en un agente colorante, un fertilizante y un agente protector de plagas.

Visto desde un segundo aspecto, la presente invención proporciona una semilla recubierta obtenible mediante los métodos descritos en la presente descripción. Las semillas recubiertas de la invención comprenden al menos una capa que contiene minerales como se describe en la presente descripción y una capa microbiana que comprende microorganismos secos aplicados a la misma. Como típicamente se han secado las semillas recubiertas acabadas, el peso del aglutinante en la capa que contiene minerales típicamente será menor que en el momento de la aplicación. Por ejemplo, cuando se aplica un aglutinante acuoso en una relación en peso de 0,4 en comparación con las partículas minerales, la semilla acabada seca puede contener una cantidad de 0,2 o incluso menor en peso en comparación con las partículas minerales. En una modalidad adicional, la relación en peso del aglutinante a las partículas minerales es

menor que 0,15, más particularmente menor que 0,10. En otra modalidad, la relación en peso del aglutinante a las partículas minerales está entre 0,01 y 0,15, particularmente entre 0,03 y 0,10.

En una modalidad particular adicional, las semillas recubiertas de la invención comprenden

- una capa que contiene minerales que comprende partículas minerales y un aglutinante, en donde la relación en peso de dicho aglutinante a dichas partículas minerales es menor que 0,2, y en donde dichas partículas minerales comprenden uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en loes, una caolinita, una heulandita, una pirofilita, una calcita, una perlita, basalto, lava, cristobalita, y esmectita;
- una capa microbiana exterior a dicha capa que contiene minerales; y
- una capa protectora exterior a dicha capa microbiana, en donde dicha capa protectora comprende un aglutinante que contiene carbohidratos y un protector.

La semilla recubierta de la invención puede comprender adicionalmente una capa superior que comprende una sustancia inerte.

A modo de ejemplo solamente, un proceso de recubrimiento típico de conformidad con la invención puede consistir de las siguientes etapas:

- Preparación de un aglutinante acuoso, tal como 16,5% de goma xantana, 15% de maltodextrina, o una combinación de 6,5% de goma xantana y 10% de maltodextrina;
- Obtener partículas minerales, por ejemplo, partículas caolinita, partículas calcita, partículas loes, o sus combinaciones;
- Opcionalmente recubrir las semillas con una cantidad inicial, mínima de aglutinante acuoso;
- Aplicar una capa que contiene minerales a las semillas mediante la adición de manera simultánea de partículas minerales y aglutinante acuoso hasta que la capa que contiene minerales tiene el grosor deseado. La aplicación de la capa que contiene minerales toma en promedio entre 45 y 300 segundos.
- Inmediatamente con posterioridad, los microorganismos secos se añaden como un polvo. Los microorganismos secos se adhieren a la capa adherente que contiene minerales. A medida que el número de semillas y el número de unidades formadoras de colonias (CFU) de los microorganismos en el polvo típicamente se conoce, la cantidad de polvo puede adaptarse al conteo de CFU final deseado por semilla recubierta. Los tiempos típicos de dosificación están entre 5 y 15 segundos.
- Una capa protectora puede aplicarse, por ejemplo, que consiste en una mezcla que contiene 80% del aglutinante acuoso descrito anteriormente y 20% de glicerol o propilenglicol. Los tiempos típicos de dosificación están entre 3 y 5 segundos.
- Una capa superior puede aplicarse, que consiste en por ejemplo mica o talco en aproximadamente 0,5% en peso en comparación con la semilla. Los tiempos típicos de dosificación están entre 5 y 15 segundos.
- El recubrimiento de la semilla puede ser acabado con una etapa de secado final. Las temperaturas adecuadas están entre 15 y 40 °C. El tiempo de secado típico está entre 180 y 300 segundos.

A lo largo del método anterior, la relación en peso del aglutinante acuoso a las partículas minerales se mantiene por debajo de 0,4.

Como puede verse de lo anterior, el proceso completo, incluyendo la adición de una capa protectora, una capa superior y el secado, puede acabarse en menos de 5 minutos. Ventajosamente, la presente invención puede realizarse en dispositivos de recubrimiento o de granulación estándar que se usan actualmente en el campo.

EJEMPLOS

Se probaron diferentes recubrimientos de conformidad con la presente invención. El método de la técnica anterior de aplicación de un aglutinante acuoso a una semilla (es decir, sin partículas minerales) y aplicación directamente sobre el mismo de los microorganismos secos se usó como un estándar comparativo. Además, se usó un método de recubrimiento en donde las partículas minerales se aplican a las semillas con agua solamente (es decir, sin un aglutinante) antes de la adición de los microorganismos secos.

Mezclas de aglutinantes usadas para todas las muestras:

Mezcla de xantana: 16,5% de goma + 83,5% de agua

Mezcla de tapioca: 15% de almidón de tapioca + 85% de agua

Combinación de xantana + tapioca = 50 % mezcla Xantana + 50 % mezcla de Tapioca

Todas las muestras se prepararon en un tratador giratorio de semillas

Muestra Goma Xantana: 200 gramos de semillas se humedecieron con 6 gramos de mezcla de Xantana. Después se añadió 3 gramos de inoculante *Rhizobium* seco sobre la superficie adherente, seguido de 1 ml de mezcla de Xantana

para obtener una buena fijación. Después de esto, se añadió 2 gramos de talco para el flujo libre de las semillas. El tiempo total del lote fue 45 segundos.

5 Muestra Mineral* + agua: 200 gramos de semillas se humedecieron con 5 ml de agua. Después se añadió 60 gramos de bentonita y se fijó sobre las semillas con 11 ml de agua para obtener una superficie adherente. Después de esto, se añadió 3 gramos de inoculante *Rhizobium* seco sobre la superficie. El proceso se acabó con 2 gramos de talco. El tiempo total del lote fue 120 segundos.

10 Muestra Mineral** + aglutinante: 200 gramos de semillas se humedecieron con 5 gramos de la mezcla de aglutinante. Cuando las semillas fueron adherentes, comenzó la dosificación de mineral y 60 gramos de mineral se puso sobre las semillas con 11 gramos de la mezcla de aglutinante. Después, se añadió 3 gramos de inoculante *Rhizobium* seco sobre la superficie adherente, seguido de 1 gramo de mezcla de aglutinante. Después, se añadió 2 gramos de talco para acabar el proceso. La relación de caolinita/loes/calcita en el componente mineral fue 1/3 - 1/3 - 1/3. El tiempo total del lote fue 120 segundos.

15 Muestra Mineral** + aglutinante + capa protectora: mismo protocolo que el anterior, en donde 1 gramo de mezcla de aglutinante después de añadir el inoculante se reemplazó por la mezcla protectora. La mezcla protectora fue en ambos casos la mezcla aglutinante citada a la que se añadió 10% de glicerol. El tiempo total del lote fue 120 segundos.

20 Todas las muestras se secaron hasta un contenido de humedad de menos del 10%.

25 Determinación de CFU: CFU se determinó 4 días después del tratamiento, después de almacenar las muestras en condiciones de almacenamiento. CFU se determinó mediante la extracción de las bacterias en una solución tampón. Esta solución tampón se diluyó y la dilución se inoculó en un medio de agar compatible con *Rhizobium*. Después de 72 horas de incubación, se contaron las colonias.

Ejemplo 1

30 En este experimento, las semillas de alfalfa se recubrieron con *Rhizobium* seco. Para la comparación, las semillas se recubrieron de conformidad con la técnica anterior, es decir, usando solamente un aglutinante (en este caso goma xantana) para recubrir la semilla y aplicar a la misma los microorganismos secos. También con propósitos comparativos, las partículas minerales se unieron a las semillas con agua, después de lo cual se aplicaron microorganismos secos. La bentonita se eligió porque, cuando se aplica junto con el agua, se adhiere bien a las semillas y proporciona una capa adherente en donde pueden pegarse los microorganismos secos. Otros recubrimientos de semillas se produjeron usando los métodos de conformidad con la invención.

35 Las capas que contiene minerales (es decir, unido a agua así como unido a aglutinante) se aplicaron en 30% en peso de la semilla. 0,3 kg de partículas minerales y 0,085 kg de solución de aglutinante se aplicó a 1 kg de semilla. Por lo tanto, la relación en peso de aglutinante acuoso a las partículas de minerales fue 0,283.

40 La capa protectora, si está presente, se aplicó a 0,5 % del peso de la semilla sin recubrir.

45 CFU por semilla se determinó como se describió anteriormente. Los valores en la tabla son el promedio de dos repeticiones.

Recubrimiento de semillas	Prom. CFU/semilla
Goma xantana	880
Partículas minerales* + agua	300
Partículas minerales** + tapioca	6200
Partículas minerales** + goma xantana	6800
Partículas minerales** + mezcla de goma xantana y tapioca	6220
Partículas minerales** + goma xantana + capa protectora (goma xantana + glicerol)	6930

*: Bentonita

**.:Mezcla de caolinita, calcita y loes

50 Los resultados muestran que conteos de CFU mucho más altos se obtienen cuando las semillas se recubren con los métodos de la invención, en comparación con la técnica anterior en la que los microorganismos secos se unen directamente con sólo el aglutinante. Esto subraya el efecto protector de las partículas minerales. Los resultados muestran además la importancia de añadir un aglutinante junto con las partículas minerales. Además, cuando se aplica una capa protectora, los conteos de CFU por semilla aumentan aún más.

55 Ejemplo 2

Las semillas se recubrieron como se describió en el ejemplo 1. Los conteos de CFU se determinaron como se describió anteriormente.

Recubrimiento de semillas	CFU/semilla
Goma xantana	1405
Partículas minerales* + agua	935
Partículas minerales** + goma xantana	6110
Partículas minerales** + goma xantana + capa protectora (goma xantana + glicerol)	7465

*:Bentonita

**.:Mezcla de caolinita, calcita y loes

Los resultados del ejemplo 2 confirman los resultados del ejemplo 1. Semillas recubiertas de conformidad con la invención (aglutinante +partículas minerales) muestran conteos de CFU mucho más altos. Cuando se aplica una capa protectora en la parte superior de los microorganismos secos, aumentan aún más los conteos de CFU.

Ejemplo 3

Las semillas se recubrieron como se describió en el ejemplo 1. Los conteos de CFU se determinaron como se describió anteriormente y representan el promedio de dos repeticiones.

Recubrimiento de semillas	Prom. CFU/semilla
Goma xantana	990
Partículas minerales* + agua	585
Partículas minerales** + goma xantana	5095
Partículas minerales** + goma xantana + capa protectora (goma xantana + glicerol)	6385

*:Bentonita

**.:Mezcla de caolinita, calcita y loes

Los resultados del ejemplo 2 confirman los resultados de los ejemplos anteriores. Las semillas recubiertas de conformidad con la invención (aglutinante +partículas minerales) muestran conteos de CFU mucho más altos. Cuando se aplica una capa protectora en la parte superior de los microorganismos secos, aumentan aún más los conteos de CFU.

Ejemplo 4

Las semillas se recubrieron con diferentes tipos de aglutinantes y los conteos de CFU se determinaron como se describió anteriormente.

Recubrimiento de semillas	CFU/semilla
Goma xantana	2710
Partículas minerales** + polivinilpirrolidona	2990
Partículas minerales** + goma xantana	7465

**.: Mezcla de caolinita, calcita y loes

Ejemplo 5

Las semillas se recubrieron como se describió anteriormente, usando la mezcla de goma xantana o tapioca como aglutinante. Las partículas minerales usadas en el recubrimiento fueron ya sea CaCO₃ o la mezcla anteriormente descrita de caolinita, calcita y loes. Las partículas minerales se aplicaron a 0,3 kg por semilla sin recubrir. Para el CaCO₃, se usó 330 g de aglutinante por kg de partículas minerales (LPR = 0,33). 217 g de aglutinante se usó por kg de la mezcla de partículas minerales (LPR = 0,217).

Recubrimiento de semillas	CFU/semilla
CaCO ₃ + goma xantana	1470
CaCO ₃ + tapioca	1330
Mezcla caolinita/calcita/loes + goma xantana	2430
Mezcla de caolinita/calcita/loes + tapioca	2300

Los resultados muestran el efecto beneficioso de la presencia de partículas minerales con una relación LPR baja en los recubrimientos de la presente invención.

Ejemplo 6

Las semillas se recubrieron como se describió en el ejemplo 5, o usando un protocolo modificado en el que la única diferencia fue que los microorganismos se aplicaron al principio del método de recubrimiento.

5

Recubrimiento de semillas	CFU/semilla
CaCO ₃ + goma xantana, microorg. al principio	960
CaCO ₃ + goma xantana, microorg. appl. de conformidad con la invención	1470
Mezcla caolinita/calcita/loes + goma xantana, microorg. al principio	1600
Mezcla caolinita/calcita/loes + goma xantana, microorg. appl. de conformidad con la invención	2430

Los resultados muestran claramente el aumento inesperado en la viabilidad cuando los microorganismos se aplican de conformidad con la invención, es decir, sobre la capa que contiene minerales cuando dicha capa es todavía adherente, en comparación con la aplicación al comienzo del proceso de recubrimiento.

10

Reivindicaciones

1. Un método para recubrir una semilla, dicho método comprende
 - 1) aplicar una capa que contiene minerales que comprende partículas minerales y un aglutinante acuoso a dicha semilla, en donde la relación en peso de dicho aglutinante acuoso a dichas partículas minerales es menor que 0,4, y
 - 2) aplicar una capa microbiana que comprende microorganismos secos sobre dicha capa que contiene minerales, mientras que dicha capa que contiene minerales es todavía adherente;
2. El método de la reivindicación 1, en donde dichas partículas minerales comprenden uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en loes, una caolinita, una heulandita, una pirofilita, una calcita, una perlita, basalto, lava, cristobalita, y esmectita.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde dichas partículas minerales comprenden dos o más elementos seleccionados del grupo que consiste en loes, una caolinita, una heulandita, una pirofilita, una calcita, una perlita, basalto, lava, cristobalita, y esmectita.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dichas partículas minerales tienen un tamaño granular promedio por debajo de 90 micras.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además secar la semilla recubierta que comprende la capa microbiana entre 180 y 300 segundos a una temperatura entre 15°C y 40°C.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además secar la semilla recubierta que comprende la capa microbiana a una temperatura entre 15°C y 40°C; en donde el método se realiza en menos de 15 minutos.
7. El método de la reivindicación 5 o 6, en donde dichas partículas minerales comprenden uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en loes, una caolinita, una heulandita, una pirofilita, una calcita, una perlita, basalto, lava, cristobalita, y esmectita.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho aglutinante acuoso es un aglutinante acuoso que contiene carbohidratos.
9. El método de la reivindicación 8, en donde dicha capa que contiene minerales tiene un pH de 6,5 a 8,5.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además
 - 3) aplicar una capa protectora sobre dicha capa microbiana, en donde dicha capa protectora comprende un aglutinante acuoso y un protector, tal como glicerol o propilenglicol.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además
 - 4) aplicar una capa superior que comprende una sustancia inerte, tal como talco o mica.
12. Una semilla recubierta obtenible por el método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
13. Una semilla recubierta obtenible por el método de la reivindicación 10, la semilla recubierta que comprende
 - una capa que contiene minerales que comprende partículas minerales y un aglutinante, en donde la relación en peso de dicho aglutinante a dichas partículas minerales es menor que 0,4, preferentemente menor que 0,2, y en donde dichas partículas minerales comprenden uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en loes, una caolinita, una heulandita, una pirofilita, una calcita, una perlita, basalto, lava, cristobalita, y esmectita;
 - una capa microbiana exterior a dicha capa que contiene minerales; y
 - una capa protectora exterior a dicha capa microbiana, en donde dicha capa protectora comprende un aglutinante que contiene carbohidratos y un protector.
14. La semilla recubierta de la reivindicación 13, que comprende además una capa superior que comprende una sustancia inerte.
15. La semilla recubierta de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, que comprende además uno o más aditivos.
16. La semilla recubierta de la reivindicación 15, en donde uno o más aditivos se seleccionan del grupo que consiste en un agente colorante, un fertilizante y un agente protector de plagas.