

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 810**

51 Int. Cl.:

C05F 11/08 (2006.01)

C05G 3/00 (2006.01)

C05F 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2015** **E 15382201 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018** **EP 3085679**

54 Título: **Un fertilizante mineral complejo que comprende el microorganismo Rhizobium leguminosarum, procedimiento de producción y usos del mismo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2018

73 Titular/es:

FERTIBERIA, S.A. (100.0%)
Torre Espacio, Planta 48,
Paseo de la Castellana, 259 D
28046 Madrid, ES

72 Inventor/es:

MULAS GARCÍA, REBECA;
GONZÁLEZ ANDRÉS, FERNANDO;
BRAÑAS LASALA, JAVIER y
MULAS GARCÍA, DANIEL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 687 810 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

Un fertilizante mineral complejo que comprende el microorganismo *Rhizobium leguminosarum*, procedimiento de producción y usos del mismo

Campo técnico de la invención

- 5 La presente invención se refiere al campo de los fertilizantes compuestos o complejos minerales, orgánicos u organo-minerales, nitrogenados, fosfatados o potásicos, ya sean NP, PK, NK o NPK, que están revestidos con cepas de la especie *Rhizobium leguminosarum*, que actúan como PGPRs.

Antecedentes de la invención

- 10 Los fertilizantes minerales son bien conocidos en la técnica actual como potenciadores del crecimiento de las plantas, y su uso está ampliamente extendido entre los granjeros para aumentar el rendimiento de un gran número de cultivos. Sin embargo, hay una demanda en el mercado de fertilizantes cada vez más eficaces que reduzcan el riesgo de contaminación del medio ambiente y al mismo tiempo consigan resultados óptimos en los cultivos donde se usen. Por esta razón, la innovación en este campo es constante, buscando continuamente mejoras en su composición o uso, para aumentar la eficacia de este tipo de compuestos.

- 15 El género de bacterias *Rhizobium* y otros géneros similares (llamados generalmente *Rhizobia*) son conocidos habitualmente por su capacidad natural de fijar el nitrógeno a las raíces de plantas leguminosas por simbiosis nodular. El proceso ha sido estudiado ampliamente por muchos expertos, y cada una de sus fases se describe en detalle en muchos libros y publicaciones científicas (José Olivares Pascual, 2008). Debido a los beneficios de esta simbiosis, la inoculación de este tipo de microorganismo en las semillas de plantas leguminosas está ampliamente
20 extendida entre los granjeros que cultivan especies leguminosas tales como judías, lentejas, garbanzos, etc. Sin embargo, se ha demostrado también que en ciertas condiciones, *Rhizobia* puede actuar como promotores (llamados PGPR o Rhizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal) del desarrollo de cereales y otros cultivos, aumentando su rendimiento. Las PGPRs son bacterias que, en asociación rizosférica o endofítica con las plantas, benefician a los cultivos en términos de crecimiento y salud de la planta. Se ha afirmado recientemente que dicho
25 efecto beneficioso causado por las PGPRs puede ser combinado con la dosificación habitual de fertilizantes a fin de causar un aumento incluso mayor en el rendimiento de los cultivos (Adnan et al, 2014).

- Sin embargo, la aplicación conjunta del *Rhizobium* con el fertilizante en una única composición conlleva una serie de problemas y dificultades que hasta la fecha representan aún un desafío que las técnicas actuales han sido
30 incapaces de vencer. Hasta ahora, nunca se ha aplicado *Rhizobium* directamente sobre el gránulo de fertilizante mineral, sino que habitualmente se aplica directamente a la semilla del cereal (Marks et al, 2013), ya que las condiciones causadas por el fertilizante son en muchos casos letales para las bacterias cuando están en contacto directo con el fertilizante. El gránulo de fertilizante causa condiciones de desecación dentro del gránulo en sí, y una vez aplicado al suelo, causa una alta salinidad en sus inmediaciones, condiciones que son generalmente
35 incompatibles con la supervivencia de las bacterias. En el fertilizante en sí, los compuestos se encuentran en concentraciones particularmente altas, con el intento de expandirse en los alrededores del gránulo. Debido al hecho de que las condiciones físico-químicas creadas en los alrededores del gránulo de fertilizante son dañinas para los microorganismos, las formulaciones desarrolladas hasta la fecha han usado solo microorganismos esporulados (documento US 8.097.280 B2).

- 40 El documento FR2611698 A1 describe un fertilizante sólido revestido con un polvo de inóculo microencapsulado, donde el fertilizante granular se mezcla con un polvo del inóculo microencapsulado en un tambor hasta que la mezcla es homogénea. Puede pulverizarse un producto de revestimiento tal como una amina, una cera natural o una cera sintética sobre los gránulos del fertilizante.

El documento EP 0 083 267 A1 describe un método para preparar un inóculo preparando un medio de cultivo que contiene microorganismos del género *Rhizobium* y goma xantana y harina de algarrobo y secar el gel.

- 45 La solicitud de patente internacional WO 2016/0074007460 A1 describe un fertilizante seco cargado biológicamente que incluye un gránulo de fertilizante seco y un revestimiento inoculado con un agente biológico y aplicado al gránulo de fertilizante seco. El revestimiento biológico es una disolución o suspensión que comprende agua o aceite y al menos un agente biológico, que es un producto químico biológico, extracto vegetal, agente microbiano y/o un organismo vivo.

- 50 Con respecto a la concentración de *Rhizobia* necesaria para obtener resultados positivos en los cultivos, no hay estudios que puedan ser extrapolados al desarrollo de la invención de esta solicitud. Entre los datos aproximados disponibles, Hirsch, P.R. 1996 menciona que la dosis de *Rhizobia* necesaria para garantizar la nodulación en plantas leguminosas es 10^4 *Rhizobia*/g de suelo; Albareda et al. 2009 afirman que en estudios en soja, se ha conseguido la producción máxima con un intervalo de dosis de $10^5 - 10^6$ *Rhizobia*/semilla; a su vez, Penna et al argumentan que hay ciertas discrepancias entre autores al establecer la dosis de *Bradyrhizobia* correspondiente al número máximo
55 de nódulos, siendo en algunos casos 10^5 bacterias/semilla y en otros 10^6 bacterias/semilla. Finalmente, Hermann et al revelan cómo varían los estándares de calidad de los inoculantes de país a país, pero generalmente están entre

10³ y 10⁶ CFU/semilla.

Es por esta razón que dicha técnica tiene una serie de limitaciones significativas cuyas consecuencias son en algunos casos bastante serias, como por ejemplo que la aplicación no puede hacerse en una única etapa, bien para un cultivo que ya ha brotado y que está en su fase de crecimiento, o bien para fertilizar un suelo donde se pretende sembrar posteriormente un cultivo. Otro factor limitante es el método de aplicación del fertilizante, siendo su forma sólida muy adecuada para el resultado deseado de estimular el crecimiento de la planta, ya que ello facilita el transporte y su aplicación posterior a los cultivos. Sería preferible por lo tanto tener un potenciador del crecimiento de cultivos en formato sólido, distinto que para plantas leguminosas, que pudiera aplicarse solo una vez y que fuera económicamente viable, así como que fuera seguro y beneficioso para las plantas.

10 La invención proporciona una solución eficaz para estos problemas.

Compendio

En general, la invención se refiere a una composición que comprende un fertilizante, preferiblemente un fertilizante mineral, y más preferiblemente un fertilizante mineral complejo, que comprende un microorganismo rizosférico o endofítico con propiedades PGPR y un protector para asegurar la viabilidad del microorganismo.

15 Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a una composición fertilizante sólida que comprende un fertilizante mineral, revestido al menos parcialmente con un microorganismo rizosférico con la capacidad de actuar como PGPR que está protegido por al menos un compuesto protector de microorganismos para permitir su supervivencia en las condiciones fisicoquímicas del fertilizante cuando la supervivencia del microorganismo se ensaya según el método del Número Más Probable, en donde el microorganismo es una especie del género
20 *Rhizobium*. Por tanto, se entiende que un "compuesto protector" es un compuesto que permite la supervivencia sustancial y/o funcional del microorganismo en las condiciones fisicoquímicas causadas por el fertilizante disuelto.

Más específicamente, la presente invención se refiere a una composición que comprende un fertilizante mineral complejo, un microorganismo rizosférico o endofítico con capacidades PGPR seleccionado de al menos uno de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* CECT 7685, CECT 8873, CECT 8874 o CECT 8875 depositadas en la
25 Colección Española de Cultivos Tipo, en cualquier combinación, y un protector para asegurar la viabilidad del microorganismo en términos tanto de supervivencia como de función, siendo este protector goma de algarrobo.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de una composición de fertilizante que comprende las etapas de:

- a) cultivar la cepa en medio sólido YMA;
- 30 b) inocular el cultivo resultante de la etapa (a) en medio líquido YMB;
- c) añadir goma de algarrobo al cultivo de la etapa (b); y
- d) revestir los gránulos de fertilizante mineral al menos parcialmente con el cultivo de la etapa (c).

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la potenciación del crecimiento de cultivos, que comprende la etapa de transferir la composición descrita en la presente memoria a las plantas del cultivo.

35 Y en un cuarto aspecto, la invención se refiere al uso de la composición en cultivos no leguminosos o en cereales, en particular cebada y trigo.

Descripción de las figuras

- Figura 1: Ejemplo 1: Parámetros vegetativos de los tratamientos evaluados en plantas de trigo.
- Figura 2: Ejemplo 2: Contenido de nitrógeno de la biomasa aérea de las plantas de trigo, 70 días posteriores a la siembra.
- Figura 3: Ejemplo 2: Producción de biomasa de las plantas de trigo, 95 días posteriores a la siembra.
- Figura 4: Ejemplo 3: Parámetros vegetativos evaluados en plantas de cebada.
- Figura 5: Ejemplo 3: Contenido de nitrógeno de las plantas de cebada.
- Figura 6: Ejemplo 4: Rendimiento de trigo *Core*; datos de porcentaje del aumento en rendimiento debido al tratamiento con Rhizobia en comparación con el control, fertilizado a 80%.
- Figura 7: Ejemplo 4: Rendimiento de trigo *Arthur Nick*; datos de porcentaje del aumento en rendimiento debido al tratamiento con Rhizobia en comparación con el control, fertilizado a 80%.

Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención se refiere a una composición que comprende un fertilizante, un microorganismo rizosférico o endofítico con capacidades PGPR, y un protector para asegurar la viabilidad del microorganismo en términos tanto de supervivencia como de función.

- 5 Dichos fertilizantes pueden incluir fertilizantes compuestos o complejos minerales, orgánicos u organo-minerales, nitrogenados, fosfatados o potásicos, ya sean NP, PK, NK o NPK.

Los fertilizantes organo-minerales complejos se obtienen mediante la combinación de fertilizantes inorgánicos o minerales con fertilizantes orgánicos. Se caracterizan por lo tanto por que su composición incluye no solo nutrientes minerales sino también nutrientes orgánicos. El material orgánico contenido en el producto, exclusivamente de
10 origen vegetal, actúa mejorando las condiciones físicas del suelo, mejorando su textura, facilitando su permeabilidad, permitiendo la aireación, favoreciendo la actividad microbiana (en ciertas condiciones) y aumentando la capacidad de retención de agua y nutrientes en el complejo arcilloso-húmico. Su efecto más significativo es que actúa complejando los nutrientes del fertilizante, impidiendo su bloqueo en el suelo, haciendo así a su asimilación por la planta más eficaz.

15 Los fertilizantes son productos que contienen uno, dos o tres nutrientes primarios; nitrógeno, fósforo y potasio, y también pueden contener nutrientes secundarios y micronutrientes. Se usan para equilibrar el contenido de nutrientes del suelo según el contenido de los mismos, teniendo en cuenta las necesidades del cultivo a ser plantado y dependiendo del rendimiento que se espera alcanzar. De acuerdo con las necesidades de los cultivos y las características del suelo, puede seleccionarse el fertilizante más apropiado, con la posibilidad de que no debería ser
20 necesario incluir uno o más de los tres elementos esenciales.

Los fertilizantes, y particularmente aquellos en forma sólida, se aplican en concentraciones suficientemente altas a fin de que, cuando se disuelvan, alcancen una dosis óptima para los cultivos. Esto es porque, antes de alcanzar la dosis óptima, surgen condiciones que en algunos casos pueden ser tóxicas para los microorganismos debido a las
25 altas concentraciones de compuestos y/o la alta salinidad que pueden causar. Las condiciones que surgen en ubicaciones cercanas a fertilizantes recién esparcidos son particularmente extremas, alcanzando niveles que impiden inicialmente la supervivencia de algunos microorganismos.

Los fertilizantes sólidos están establecidos firmemente en la mayoría de los cultivos, ya que su transporte es sencillo y su distribución uniforme es rápida y eficaz. Es por esta razón que la mayoría de los granjeros poseen maquinaria para la distribución de fertilizantes sólidos. Por el contrario, los fertilizantes líquidos solo se usan dentro de un radio
30 de 200 a 300 km de la fábrica del fertilizante, ya que requieren camiones cisterna para el transporte y maquinaria especializada, y como requieren la adición de agua, los costes aumentan significativamente.

El fertilizante sólido está establecido totalmente en todo el mundo, mientras que en forma líquida se usa solo en ciertas áreas más localizadas. La forma sólida es generalmente más rica que la forma líquida. Los fertilizantes mencionados en esta solicitud pueden adquirirse libremente en compañías especializadas en este tipo de
35 compuestos, siendo su adquisición por el público general relativamente sencilla.

Las Rhizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) son un grupo de bacterias que incluye rhizobia en general y el género *Rhizobium* en particular, que en asociación rizosférica o endofítica con las plantas, tienen un efecto beneficioso relacionado con el crecimiento y la salud sobre los cultivos de plantas no leguminosas. Esto se consigue por medio de un amplio intervalo de mecanismos: mejorar la nutrición de la planta
40 solubilizando nutrientes que no pueden ser absorbidos del suelo, aumentar el área superficial de la radícula, estimular el crecimiento por medio de la producción de fitohormonas, vencer situaciones de estrés debido a sequía, salinidad o metales pesados, y muchas otras situaciones desfavorables.

El género *Rhizobium*, como otros microorganismos similares, no se conoce por su resistencia a condiciones adversas, siendo relativamente sensible a las condiciones circundantes. Como se describe en los antecedentes de la solicitud, debido al hecho de que las condiciones fisicoquímicas creadas en los alrededores inmediatos del
45 gránulo de fertilizante son dañinas para los microorganismos, las formulaciones desarrolladas hasta la fecha han usado solo microorganismos esporulados (documento US 8.097.280 B2). Esto es porque, debido a su falta de mecanismos de defensa específicos (tales como las esporas que son características de otros géneros de bacterias) es sorprendente y totalmente inesperado a priori que, como resultado de los datos obtenidos en los ensayos, las
50 bacterias de este género sobrevivieron bajo condiciones tan extremas como las inducidas por los fertilizantes. Existe la posibilidad de usar otras especies bacterianas con propiedades PGPR, a condición de que sean beneficiosas para los cultivos y que resistan las condiciones causadas por el fertilizante. Para la composición, se seleccionaron una serie de cepas de *Rhizobium leguminosarum* con las mejores características que dieron los mejores resultados en los ensayos:

Cepa	Rasgos distintivos
CECT 8873 - LET 4910	La cepa con la producción más alta de ácido indolacético (IAA) y que produce también sideróforos.
CECR 8874 - LCS 2403	Una cepa con una alta producción de IAA; con un origen geográfico diferente.
CECT 8875 - LPZ 2704	Alta actividad AAC desaminasa.
CECT 7685 - LBM 1210	Solubilizadora de precipitados de fosfato mineral.

Debido a las extremas condiciones de concentración de compuestos y alta salinidad, es aconsejable la aplicación de algún tipo de compuesto protector, asegurando su función protectora la supervivencia del *Rhizobium*. Dicho compuesto no debe alterar las funciones bacterianas, sino solo preservar sus capacidades funcionales y de replicación, ya sea en la especie *Rhizobium leguminosarum* o cualquier otra usada para el mismo fin.

Las bacterias del género *Rhizobium* son inocuas para los seres humanos (García-Fraile et al. 2012) y son capaces de producir diferentes tipos de polisacáridos. Entre los polisacáridos rizobiales, los exopolisacáridos (EPS) caracterizan este género, siendo compuestos formados por carbohidratos secretados en el medio a través de las paredes celulares; estos a su vez pueden ser ácidos o neutros. Los EPS exhiben una función protectora en la célula bacteriana en las condiciones osmóticas y desecadas descritas en la presente memoria. Entre los compuestos que son exógenos a las bacterias y que cumplen esta misma actividad están varios polisacáridos vegetales, a partir de los cuales se seleccionó la goma de algarrobo para este fin. La goma de algarrobo está formada por polisacáridos de galactomanano, y es el extracto obtenido a partir del endospermo de las semillas del árbol algarrobo (*Ceratonia siliqua*, L.) por abrasión mecánica o un procedimiento químico. Los polisacáridos de galactomanano son los que consisten en una cadena de manosa enlazada con grupos laterales de galactosa en proporciones variantes; la proporción de la goma de algarrobo es manosa:galactosa 4:1. En este tipo de compuestos la solubilidad depende del contenido de galactosa y su distribución.

La aplicación de la goma de algarrobo, como se revela en los ensayos mencionados en la sección Ejemplos de esta solicitud, es capaz de jugar un papel protector contra las condiciones extremas de concentración de compuestos, desecación y alta salinidad, y también es capaz de estimular la producción de polisacáridos por las mismas bacterias, lo que a su vez ayuda al mantenimiento de las condiciones adecuadas para la vida bacteriana. Entre los polisacáridos rizobiales, los exopolisacáridos (EPS) caracterizan al género *Rhizobium*, siendo compuestos formados por carbohidratos secretados en el medio a través de las paredes celulares; estos a su vez pueden ser ácidos o neutros. Los EPS exhiben una función protectora en la célula bacteriana en condiciones osmóticas y desecadas, y por lo tanto ayudan al mantenimiento de la supervivencia y viabilidad de las bacterias, junto con la goma de algarrobo. Por lo tanto, la goma de algarrobo no solo ayuda a la protección de las bacterias per se, sino que también potencia los mecanismos de producción de EPS bacterianos, que a su vez juegan un papel protector contra las condiciones del fertilizante.

El procedimiento para la fabricación de la composición consiste en las siguientes etapas:

- a) cultivar la cepa del microorganismo en medio sólido YMA;
- b) inocular el cultivo resultante de la etapa (a) en medio líquido YMB;
- c) añadir goma de algarrobo al cultivo de la etapa (b); y
- d) revestir los gránulos de fertilizante mineral al menos parcialmente con el cultivo de la etapa (c).

El cultivo puro de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* se produce inicialmente en medio sólido YMA (Agar Levadura Manitol, por sus siglas en inglés) (Vincent. 1970) y se inocula posteriormente en medio líquido YMB (Caldo Levadura Manitol) para obtener el cultivo puro. La temperatura de incubación en todos los casos es 28°C y el tiempo de incubación entre 3 y 7 días, preferiblemente 5 días. El rasgo distintivo en comparación con otros medios de cultivo de tipo YM estándar es que se añade entre 0,25% y 0,5% de goma de algarrobo al medio de cultivo en el que están creciendo los rizobia; la adición de este protector se produce dos días después de la inoculación de *Rhizobium leguminosarum*, a fin de potenciar la producción de exopolisacáridos por las bacterias. En una realización preferida la concentración de goma de algarrobo es 0,25%, en una realización más preferida la concentración será 0,5%, y en una concentración aún más preferida la concentración será 1,0%. Después de 5 días de incubación se alcanza el crecimiento máximo (6×10^8 CFU/ml), coincidiendo con la producción máxima de exopolisacáridos. Después comienza el revestimiento del fertilizante por pulverización directa, para ser secado al aire posteriormente.

Se han diseñado concentraciones óptimas de rizobia para el uso como revestimientos para fertilizantes, probando experimentalmente que las concentraciones alcanzadas son eficaces. Las concentraciones reales aplicadas a los

fertilizantes pueden variar entre 1×10^8 CFU/ml y 6×10^8 CFU/ml, estando posiblemente entre 6×10^7 CFU/ml y 6×10^9 CFU/ml. Esta concentración conlleva una dosis final por semilla o planta de cultivo de entre 1×10^2 CFU y 9×10^2 CFU. La concentración funcional efectiva alcanzada por semilla o planta es al menos 1×10^2 CFU. Se considera que la concentración funcional mínima es la concentración de rizobia por planta que es suficiente para su supervivencia y para la producción de un efecto significativamente positivo sobre los cultivos, ya sea en cereales o cualquier otro cultivo no leguminoso.

La composición usada asegura que la producción de exopolisacáridos es suficientemente abundante para que sobreviva el rizobium cuando sea expuesto a las condiciones extremas del fertilizante.

Tabla 1. Composición del medio YMA:

Compuesto	Cantidad
K₂HO₄	0,5 g
MgSO₄	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	10,0 g
Extracto de levadura	0,2 g
Agar	20,0 g
Agua destilada	1,0 l
Goma de algarrobo	0,5%

10

La eficacia del producto se ha demostrado en plantas de trigo y cebada en ensayos microcósmicos y en el campo, comparado con controles exentos de rizobium, como se presenta en la sección "Ejemplos".

Una de las peculiaridades de la invención es que la concentración efectiva de rizobia necesaria para asegurar la viabilidad del microorganismo es considerablemente menor que la recomendada en la bibliografía más reciente en la técnica para el caso de plantas leguminosas (no hay bibliografía respecto a concentraciones mínimas para un efecto PGPR). La reducción de la concentración funcional mínima es, a priori, una ventaja inesperada, ya que no era previsible que en los casos donde la composición aplicada a cada semilla o planta alcanzaba una concentración final de entre 1×10^2 y 9×10^2 CFU, los rizobia pudieran sobrevivir y realizar su efecto beneficioso sobre los cultivos. Por primera vez, se ha conseguido un efecto positivo en el campo para aplicaciones microbianas de rizobia en concentraciones tan bajas. La comunidad científica ha afirmado que tales concentraciones de microorganismos son ineficaces en este tipo de situación, en contraste con lo que podría preverse o aceptarse habitualmente. Las principales dificultades y razones presentadas, que han sido vencidas en las composiciones desarrolladas, han sido la imposibilidad de supervivencia de los rizobia en estas condiciones, y que no alcanzarían la rizosfera de la planta con una concentración suficiente para realizar su actividad PGPR.

Las composiciones descritas en la presente invención se aplican de la misma manera con la que los granjeros han aplicado los fertilizantes a sus cultivos hasta la fecha, con una máquina esparcidora de fertilizante mineral sólido estándar. Esta facilidad de aplicación es también una ventaja a tener presente con respecto a los usuarios finales, ya que muchos granjeros ya poseen este tipo de maquinaria que distribuye uniformemente los gránulos de fertilizante directamente sobre el terreno. El fertilizante mineral incorpora los microorganismos, pero el trabajo agrícola permanece totalmente sin cambios, aunque es esencial atenerse a la fecha de caducidad y las condiciones de almacenamiento recomendadas. Por tanto, la aplicación de las composiciones descritas en la presente memoria puede aplicarse en una única etapa, facilitando el trabajo realizado por los granjeros a la vez que reduciendo costes debido a la disminución en el tiempo y recursos necesarios. Otra ventaja significativa es que no se requiere la semilla del cultivo para la aplicación directa de la composición, como es el caso con alguna de la técnica anterior. En este caso, la composición puede aplicarse siempre que se desee, ya sea a la semilla, en el momento de la siembra, o más tarde en el ciclo de crecimiento del cultivo. También existe la posibilidad de aplicarla directamente al suelo, sin ninguna necesidad de la presencia de un cultivo, ya que ello también contribuye a la mejora de las propiedades del mismo.

La aplicación de las composiciones no está limitada necesariamente a una especie particular, sino que puede aplicarse a muchos cultivos de interés, siendo ello en cereales donde se ha demostrado una mejora significativa cuando se usa la composición desarrollada por el solicitante. Sin embargo, al dotar al suelo de mejores propiedades y nutrientes para la actividad agrícola, puede usarse la presente invención para cualquier tipo de cultivo, ya sea para el consumo humano o no, y su crecimiento será mejorado claramente.

Las composiciones descritas en la presente memoria representan una solución eficaz y eficiente a las limitaciones y problemas que hasta la fecha han permanecido sin resolver por la técnica anterior. Hasta ahora, la combinación directa de cepas de rhizobia con fertilizante mineral no se había descrito como método para la aplicación de los rhizobia a las plantas, por las razones descritas anteriormente. Hasta ahora, la práctica más similar conllevaba la aplicación de los rhizobia a la semilla del cereal. La razón por la que este ha sido siempre el procedimiento es de dos tipos. En primer lugar, la comunidad científica había afirmado que las condiciones fisicoquímicas creadas en las inmediaciones del gránulo de fertilizante eran letales para microorganismos no esporulados tales como rhizobia. En tales condiciones, los rhizobia no sobreviven, y por lo tanto no pueden tener un efecto PGPR. En segundo lugar, la concentración alcanzada en los alrededores de las semillas del cultivo, cuando la aplicación se realiza revistiendo el gránulo de fertilizante, es considerada por la comunidad científica como ineficaz para los cultivos. Existen datos sobre la eficacia de los inoculantes para plantas leguminosas que sitúan la concentración eficaz mínima en 10^5 CFU/ml (Hermann y Lesueur, 2013), no habiendo estudios de eficacia sobre concentraciones diferentes cuando se aplican como PGPR (junto con un fertilizante y en ausencia de simbiosis nodular). La falta de estudios hasta la fecha revela que la invención desarrollada representa un claro avance inventivo que mejora las técnicas de cultivo mediante el uso exitoso de microorganismos rizosféricos en una única composición con fertilizantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Ensayo de supervivencia en cámara de crecimiento de *Rhizobium leguminosarum* en fertilizante, e interacción positiva con plantas de cereal posteriormente a su aplicación al suelo.

Los objetivos específicos de este ensayo fueron:

- Verificar la supervivencia de las bacterias en el gránulo de fertilizante y durante el proceso de disolución del mismo, para que alcancen el suelo y puedan ser reaisladas del mismo.
- Verificar el efecto del fertilizante revestido sobre el desarrollo de plantas de trigo.

El experimento se realizó en una cámara de crecimiento a 25°C día/14°C noche y con 10 horas de luz y 14 horas de oscuridad. Las unidades experimentales fueron bandejas de 32 x 21 x 7 cm con 2 filas de 15 plantas con una separación entre filas de 19 cm y entre plantas de 0,9 cm.

La textura del suelo usado fue marga de arcilla con pH 8,5 y un contenido de materia orgánica de 1,66%. La dosis de semilla de trigo (de la variedad *Rudo*) fue 200 kg/hectárea, y la dosis de fertilizante fue 50 kg/hectárea. Se realizó una irrigación cada 4 días, a fin de someter al suelo a una dinámica de humedecimiento y secado.

Los tratamientos ensayados fueron: control fertilizado con fertilizante mineral complejo 15-35-0 + Zn y composiciones según la invención basadas en el fertilizante 15-35-0 + Zn revestido con la cepa LBM1210 de *Rhizobium leguminosarum*.

La supervivencia en el suelo se analizó 35 días después de fertilizar, contando los rhizobia en el suelo usando el método del Número Más Probable (MPN) (Beck et al. 1993) usando plantas de judía (*Phaseolus vulgaris* L.). Se usó esta técnica porque la cepa de *Rhizobium leguminosarum* ha sido aislada de nódulos de judía, y es por lo tanto infecciosa para la planta. Se había verificado de antemano que no había rhizobia nativa en el suelo para nodular la judía.

Los resultados (Tabla 2) muestran cómo el tratamiento fertilizado con composiciones de acuerdo con la invención presentó 100 rhizobia/g de suelo en el momento del muestreo. Dichos rhizobia mantienen su actividad, ya que conservan su capacidad para infectar las plantas de judía, formando estructuras nodulares en sus raíces.

Tabla 2. Recuento de rhizobia por MPN.

Tratamientos	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	Plantas noduladas	MPN (Rhizobia/g de suelo)
Control ⁽¹⁾	0	0	0	0	0	0
Control fertilizado	0	0	0	0	0	0
Fertilizado con composiciones de acuerdo con la invención ⁽²⁾	4	3	0	0	7	100

(1) El objeto de este control es verificar la ausencia de rhizobia nativa en el suelo que pudiera nodular la judía.

(2) Este tratamiento está comprendido de fertilizante mineral revestido con la cepa LBM1210 de *Rhizobium leguminosarum*, usando una mezcla de los exopolisacáridos producidos por el rhizobium en sí y goma de algarrobo como protector.

El efecto sobre plantas de trigo se verificó analizando parámetros de crecimiento 35 días después de la siembra.

La Figura 1 retrata cómo el fertilizante revestido con *Rhizobium* superó al control fertilizado con fertilizante no revestido en peso seco y en altura.

5 El fertilizante revestido con rhizobia mejoró los resultados de biomasa fresca y seca del control fertilizado. La cepa LBM1210 de *Rhizobium leguminosarum* presenta una clara tendencia a mejorar la eficacia de fertilización en un nivel microcósmico en una cámara de crecimiento, cuando se aplica como revestimiento del fertilizante mineral, dando lugar a una producción de biomasa más alta que el control tratado con fertilizante sin el revestimiento de rhizobia.

10 Ejemplo 2: Estudio de las composiciones de la presente invención aplicadas a cereal en un nivel microcósmico. Microcosmos de plantas de trigo.

El objetivo específico era:

- Conocer el efecto de la composición sobre el desarrollo vegetativo del trigo.

15 Cada unidad experimental consistió en 5 macetas de plantas y se repitió 3 veces. En cada maceta (19 x 14 x 14) se sembraron 5 semillas de trigo separadas 0,9 cm y a una profundidad de 1,5 cm. El experimento se realizó en un invernadero, y el sustrato consistió en una mezcla de suelo margoso a pH 9,36 y 1,74% de materia orgánica con vermiculita exfoliada a 50% en volumen. La irrigación se realizó cada 4 días con 0,5 l de agua.

La dosis de semilla de trigo (de la variedad *Rudo*) fue 200 kg/hectárea y la dosis de fertilizante 15-35-0 + Zn fue 50 kg/hectárea. La irrigación se realizó cada 4 días, a fin de someter al suelo a una dinámica de humedecimiento y secado.

20 Los tratamientos ensayados fueron: control fertilizado con 15-35-0 + Zn y composiciones según la invención basadas en el fertilizante 15-35-0 + Zn y la cepa LBM1210 de *Rhizobium leguminosarum*.

La concentración final de rhizobia por semilla fue 1×10^2 CFU/semilla.

Se tomaron dos muestras: 70 días después de la siembra (DAS, por sus siglas en inglés) para analizar el contenido de nutrientes y 95 DAS para analizar parámetros vegetativos.

25 Tabla 3. Resultados del microcosmos de la planta de trigo

Tratamiento	70 DAS		95 DAS	
	% de N	N (mg/planta)	Biomasa fresca (mg/planta)	Biomasa seca (mg/planta)
Control	1,133	4,738	1.586,7	450,0
Control fertilizado no revestido	1,183	6,111	2.106,7	596,7
Fertilizado con composiciones de acuerdo con la invención	1,433	6,980	2.130,0	766,7

El tratamiento con composiciones de acuerdo con la invención (Tabla 3, Figura 2) presentó una concentración de nitrógeno más alta en la biomasa y un contenido de N total más alto que el control con fertilizante no inoculado.

30 El tratamiento revestido con la invención (Tabla 3, Figura 3) superó al control con fertilizante no inoculado tanto en biomasa fresca como seca. Por lo tanto, las composiciones de la invención mejoran la eficacia de fertilización en un nivel microcósmico en un invernadero, incluso en competición directa con los microorganismos nativos del suelo.

Ejemplo 3: Estudio de las composiciones de la presente invención aplicadas a cereal en un nivel microcósmico. Microcosmos de plantas de cebada.

El objetivo específico era:

- 35
- Conocer el efecto de la composición sobre el desarrollo vegetativo de la cebada.

Como en el ensayo anterior, cada unidad experimental consistió en 5 macetas de plantas y se repitió 3 veces. En cada maceta (19 x 14 x 14) se sembraron 5 semillas de cebada separadas 0,9 cm y a una profundidad de 1,5 cm. El experimento también se realizó en un invernadero, pero el sustrato usado fue un suelo de marga arcillosa con un pH de 8,69 y un contenido de materia orgánica de 1,54%. La dosis de semilla de cebada (de la variedad *Quinta*) fue 200

kg/hectárea y la dosis de fertilizante 15-35-0 + Zn fue 50 kg/hectárea. La irrigación se realizó cada 4 días, a fin de someter al suelo a una dinámica de humedecimiento y secado.

Los tratamientos estudiados fueron: control fertilizado con fertilizante mineral complejo 15-35-0 + Zn y La Invención basada en dicho fertilizante y las cepas LET4910, LBM1210, LCS2403 y LPZ2704 de *Rhizobium leguminosarum*.

- 5 La concentración de rizobia aplicada con el fertilizante fue 6×10^8 CFU/ml, conllevando que la concentración de bacterias que alcanzaron la semilla o planta fue $1,2 \times 10^2$ CFU.

Tabla 4. Resultados del microcosmos de planta de cebada.

Cepa inoculada	Peso seco/planta (g)	Altura máxima (cm)
Control fertilizado	1,44	46,1
Composición con LET4910	1,70	48,7
Composición con LBM1210	1,94	50,7
Composición con LCS2403	2,01	50,8
Composición con LPZ2704	2,20	52,9

- 10 Todos los tratamientos con composiciones de acuerdo con la invención y para cualquiera de las cepas usadas mejoraron los parámetros de peso seco y altura máxima (Tabla 4, Figura 4) y el contenido de nitrógeno de la planta (Tabla 5, Figura 5).

Tabla 5. Resultados del contenido de nitrógeno en biomasa aérea

Cepa inoculada	N (%)	N / planta (mg)
Control	1,79	25,01
LBM1210	1,98	38,63
LPZ2704	1,96	43,86
LCS2403	2,05	41,47
LET4910	2,14	42,11

Ejemplo 4: Estudio del efecto de composiciones de la presente invención aplicadas a cereal en el campo.

- 15 El objetivo específico fue:

- Analizar el efecto de la composición sobre el rendimiento de cultivos de cereal en el campo.

El diseño experimental de cada parcela incluyó dos variables: el genotipo y el tratamiento, y consistió en bloques completos elegidos al azar, repetidos cuatro veces. Las dimensiones de cada parcela fueron 3 m de ancho por 10 m de largo; por lo tanto cada parcela medía 30 m², de los que se recolectaron los 15 m² centrales.

- 20 La producción del cultivo se analizó en términos de rendimiento.

El ensayo con trigo *Core* se realizó en un suelo de marga arcillosa con pH 7,6 y 1,41% de materia orgánica, mientras que el ensayo en trigo *Arthur Nick* se realizó en un suelo de marga arenosa-arcillosa con pH 8,2 y 1,08% de materia orgánica.

Tabla 6. Ubicación de ensayos en el campo.

Ensayo	Parcela	Ubicación	Coordenadas
Trigo <i>Core</i>	Berengenilla	Carmona, Sevilla	37° 17' 50,6" N - 05° 40' 20,7" O Altitud 60 m
Trigo <i>Arthur Nick</i>	Algarabejo	Alcalá de Guadaira, Sevilla	37° 20' 0" N - 5° 51' 0" Altitud 46 m

5 Los tratamientos ensayados se presentan en la Tabla 7. La composición de acuerdo con la invención se aplicó en el abonado de fondo. En el caso del trigo *Core*, se usó un fertilizante 18-46-0, y un 8-15-15 para el trigo *Arthur Nick*. Se usaron tres controles, uno sin fertilizante, uno con una dosis de 100% de fertilizante y uno con una dosis de 80% de fertilizante. Los tratamientos con las composiciones de acuerdo con la invención se basaron en el fertilizante mineral correspondiente a 80% y las cepas de rhizobia presentadas en la Tabla 7.

Tabla 7. Tratamientos y abonado de fondo.

Tratamientos	Trigo <i>Core</i> DAP 18-46 ⁽¹⁾				Trigo <i>Arthur Nick</i> NPK 8-15-15 ⁽³⁾			
	Dosis de fertilizante	N (kg/ha)	P ₂ O ₅	K ₂ O	Dosis de fertilizante	N (kg/ha)	P ₂ O ₅	K ₂ O
1 Control no fertilizado	0	0	0	0	0	0	0	0
2 Control fertilizado a 100%	200	36	92	0	500	40	75	75
3 Control fertilizado a 80%	160	29	74	0	400	32	60	60
4 Composición con LET4910	160	29	74	0	400	32	60	60
5 Composición con LBM1210	160	29	74	0	400	32	60	60
6 Composición con LCS2403	160	29	74	0	400	32	60	60
7 Composición con LPZ2704	160	29	74	0	400	32	60	60

10 La concentración final de rhizobia que alcanza el suelo después de la aplicación del fertilizante varía entre 3×10^2 y 9×10^2 CFU/semilla.

El abonado superior se detalla en la Tabla 8 y el trabajo agrícola ejecutado durante los ensayos de campo se muestra en la Tabla 9.

Tabla 8. Abonado superior en ensayos de campo.

Parcela	1 ^{er} abonado				2 ^o abonado			
	Fertilizante	Kg N/ha	Dosis (Kg/ha)	Fecha	Fertilizante	Kg N/ha	Dosis (Kg/ha)	Fecha
Trigo Core	Urea 46%	69	150	07/02/13	NAC 27%	41	150	26/03/13
Trigo Arthur Nick	Urea 46%	69	150	25/02/14	-	-	-	-

Tabla 9. Tareas hechas en los cultivos en los ensayos de campo.

Datos del ensayo	Trigo Core	Trigo Arthur Nick
Cultivo previo	Barbecho	Girasol
Abonado de fondo	23/11/12	21/11/13
Fecha de siembra	29/11/12	12/12/13
Dosis de siembra (kg/ha)	210	220
Abonado superior	07/02/13	25/02/14
	26/03/13	
Aplicación de fungicida	15/04/13	20/03/2014
Aplicación de herbicida	15/02/13	25/02/14
Fecha de recolección	10/06/13	02/06/14

- 5 Los tratamientos con las composiciones de acuerdo con la invención dieron un rendimiento de recolección mayor que los tratamientos fertilizados (Figura 6 y Figura 7). En ambos casos, la composición con la cepa LET4910 dio buenos resultados (Figura 6 y Figura 7).

Los aumentos en rendimiento superaron el 5%, un aumento que se considera que es viable desde el punto de vista agrícola y económico.

10 Conclusiones

Los rhizobia sobreviven en la superficie de los gránulos del fertilizante, y posteriormente al proceso de solubilización del mismo en el suelo, alcanzan la rizosfera de las plantas en una dosis y condiciones óptimas para ejercer un efecto PGPR, promoviendo el crecimiento del cultivo, tanto en trigo como en cebada.

Depósito de material biológico

- 15 Las cepas de *Rhizobium leguminosarum* de la presente solicitud se han depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, España, de acuerdo con las normativas del Tratado de Budapest. Los números de depósito y fechas de los mismos son como sigue:

Cepa	Número de depósito	Fecha de depósito
LET 4910	CECT 8873	14/04/2015
LCS 2403	CECT 8874	14/04/2015
LPZ 2704	CECT 8875	14/04/2015
LBM 1210	CECT 7685	14/04/2010

Bibliografía

Jose Olivares Pascual. Fijación biológica de Nitrógeno, 2008.

(<http://www.eez.csic.es/~olivares/ciencia/fijacion/>)

- 5 Adnan, M. 2014. Integrated Effects of Rhizobial Inoculum and Inorganic Fertilizers on Wheat Yield and Yield Components. *American Journal of Plant Sciences*, 5.
- García-Fraile, P., L. Carro, M. Robledo, M.H. Ramírez-Bahena, J.D. Flores-Félix, M.T. Fernández, P.F. Mateos, R. Rivas, J.M. Igual, E. Martínez-Molina, Á. Peix y E. Velázquez. 2012. Rhizobium promotes non-legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PloS One* 7, 5, e38122
- 10 Marks, B.B., M. Megías, M.A. Nogueira y M. Hungria. 2013. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of Bradyrhizobium spp. and Azospirillum brasilense inoculants with soybean and maize. *AMB Express*, 3: 21
- Hirsch, P.R. 1996. Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. *New Phytologist* 133: 159-171.
- 15 Albareda, M., D.N. Rodríguez-Navarro y F.J. Temprano. 2009. Soybean inoculation: Dose, N fertilizer supplementation and rhizobia persistence in soil. *Field Crops Research* 113: 352-356.
- Penna, C., R. Massa, F. Olivieri, G. Gutkind y F. Cassán. 2011. A simple method to evaluate the number of bradyrhizobia on soybean seeds and its implication on inoculant quality control. *AMB Express* 1:21.
- 20 Herrmann, L. y D. Lesueur. 2013. Challenges of formulation and quality of biofertilizers. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013 Oct;97(20):8859-73

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición sólida de fertilizante que comprende gránulos de un fertilizante mineral revestido al menos parcialmente con un microorganismo rizosférico con la capacidad de actuar como PGPR que está protegido por al menos un compuesto protector de microorganismos para permitir su supervivencia en las condiciones fisicoquímicas del fertilizante cuando la supervivencia del microorganismo se ensaya según el método del Número Más Probable, en donde el microorganismo es una especie del género *Rhizobium*.
2. La composición según la reivindicación 1, en donde el microorganismo es *Rhizobium leguminosarum*.
- 10 3. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el microorganismo pertenece al menos a una de las cepas CECT 7685, CECT 8873, CECT 8874, CECT 8875 de *Rhizobium leguminosarum*, en solitario o en cualquier combinación de las mismas.
4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la concentración de microorganismos está entre 6×10^7 UFC/ml y 6×10^9 UFC/ml.
5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto protector de microorganismos es goma de algarrobo.
- 15 6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el fertilizante es un fertilizante mineral complejo.
7. La composición según la reivindicación 6, en donde el fertilizante complejo mineral es un complejo NPK, NP, NK o PK.
- 20 8. Un procedimiento para la fabricación de una composición fertilizante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende las etapas de:
 - a) cultivar la cepa del microorganismo del género *Rhizobium* en medio sólido YMA;
 - b) inocular el cultivo resultante de la etapa (a) en medio líquido YMB;
 - c) añadir goma de algarrobo al cultivo de la etapa (b); y
 - d) revestir los gránulos de fertilizante mineral al menos parcialmente con el cultivo de la etapa (c).
- 25 9. El procedimiento según la reivindicación 8, en donde el revestimiento del fertilizante con el microorganismo se realiza entre el 3^{er} y 7^o días del cultivo en la etapa (b).
10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, donde la cantidad de goma de algarrobo empleada en la etapa (c) es al menos 0,25%.
- 30 11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde la cantidad de goma de algarrobo empleada en la etapa (c) es al menos 1,0%.
12. Un procedimiento para potenciar el crecimiento de cultivos, que comprende la etapa de aplicar la composición fertilizante según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 7 a una planta en cualquiera de sus etapas de crecimiento, o directamente al suelo a ser usado para el cultivo.
- 35 13. Un procedimiento según la reivindicación 12, donde la etapa de crecimiento de la planta es la semilla de la planta.
14. El procedimiento según la reivindicación 13, en donde la concentración de microorganismos en la composición en el momento de su aplicación a la semilla es al menos 1×10^2 CFU.
15. El uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en cultivos no leguminosos o en cereales.

Fig. 1.

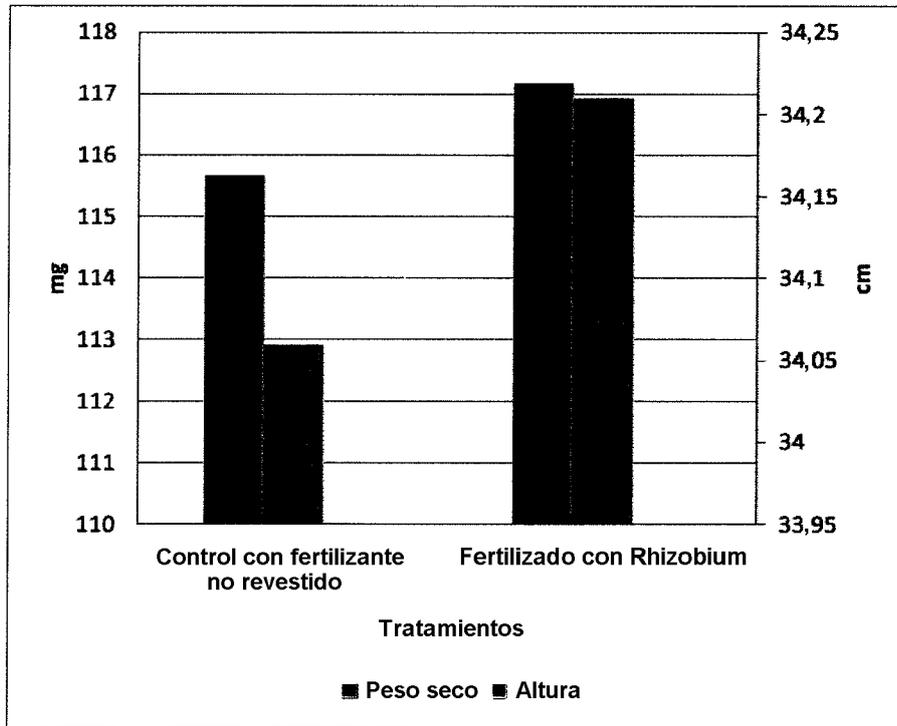


Fig. 2.

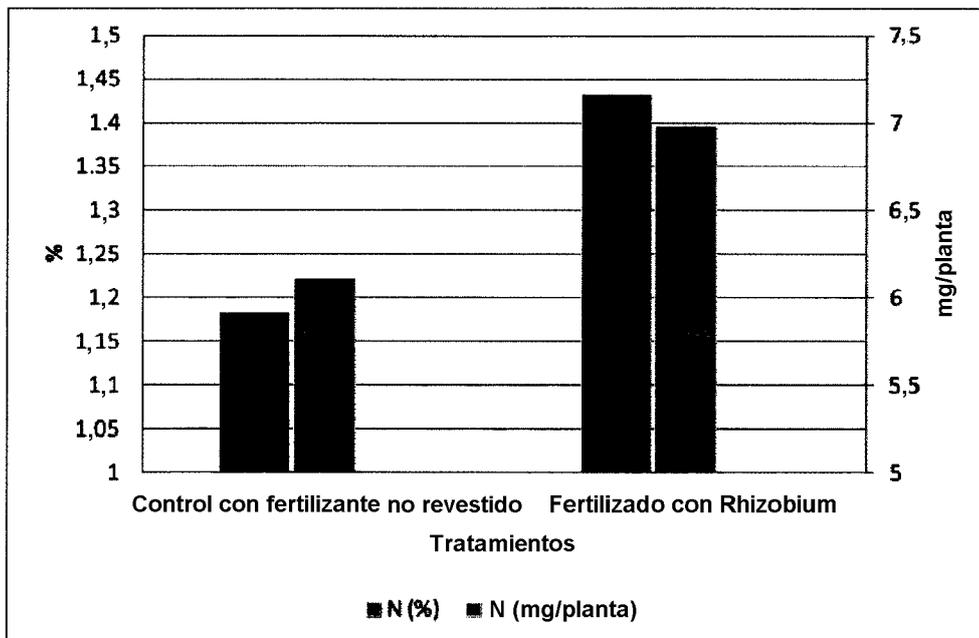


Fig. 3

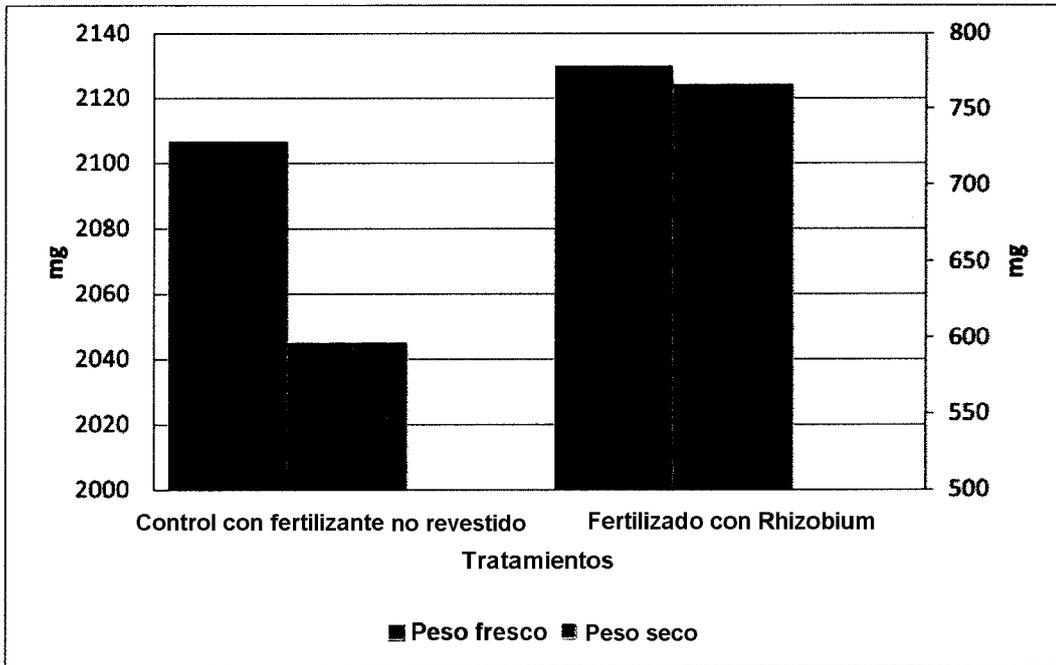


Fig. 4.

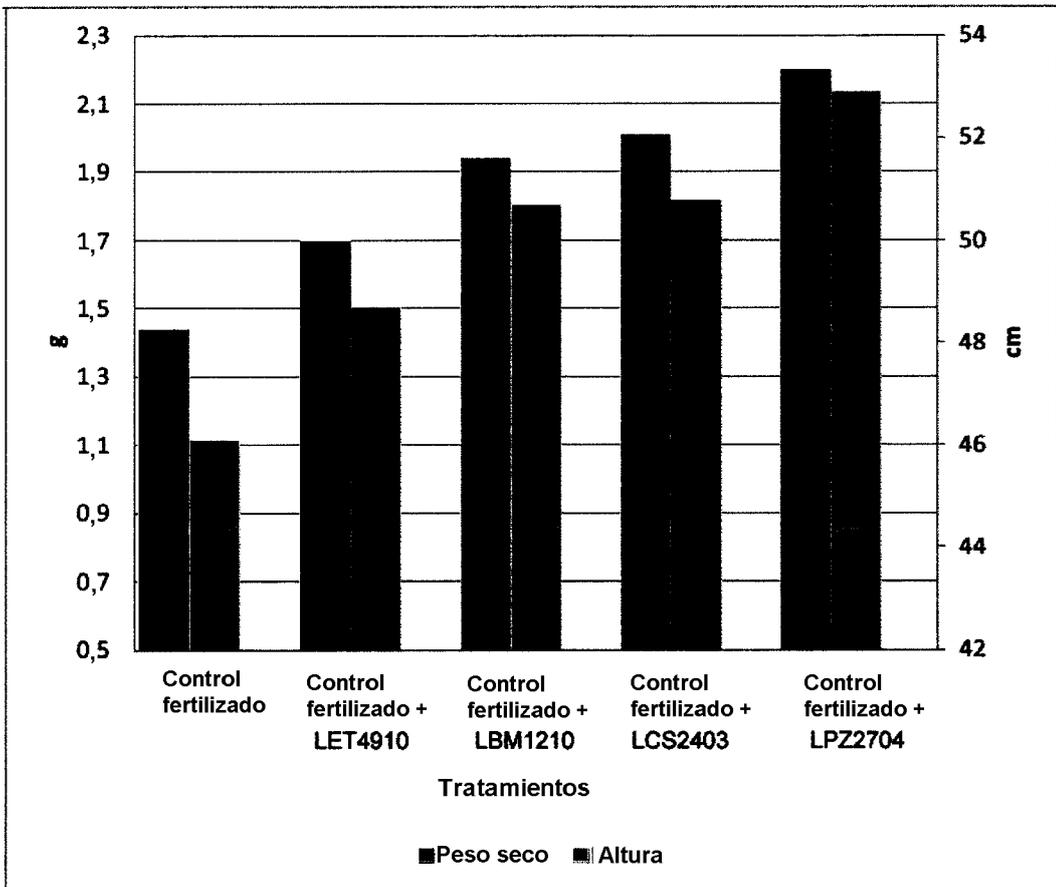


Fig 5

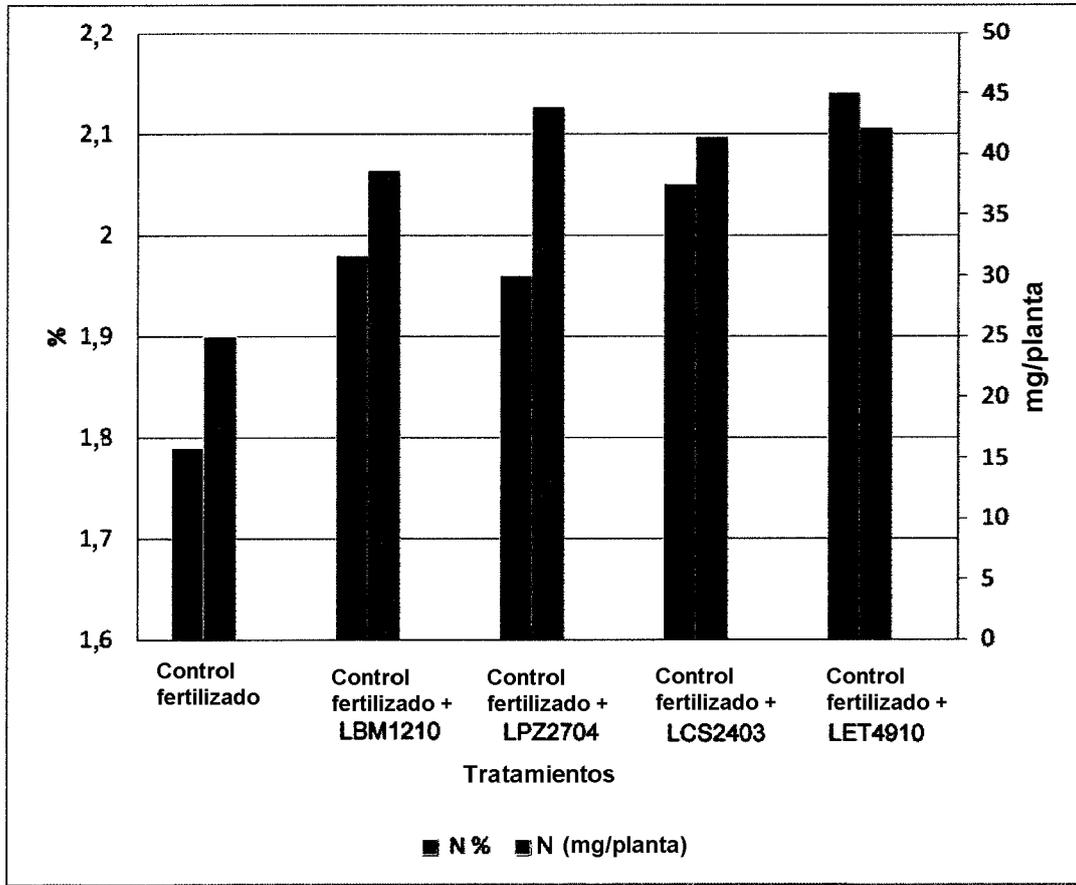


Fig. 6.

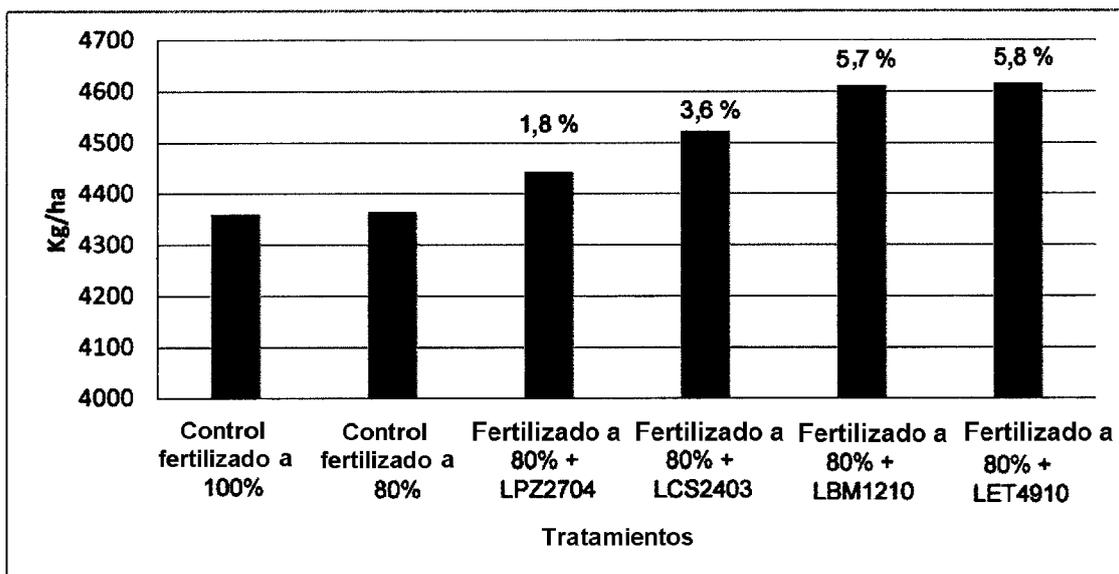


Fig. 7.

