

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 234 417**

21 Número de solicitud: 200302619

51 Int. Cl.7: **C12N 1/20**
C05F 11/08
A01N 63/00
A01N 63/02
// (C12N 1/20
C12R 1:01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **24.10.2003**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2005**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.06.2005

71 Solicitante/s: **PROBELTE, S.A.**
Ctra. Madrid, km. 384,6
Polígono Industrial el Tiro
30100 Espinardo, Murcia, ES

72 Inventor/es: **Villaverde Fernández , Mario;**
Fernández Martínez, Ana;
Nicolás Martínez, José Antonio;
Malo López-Román, Jorge;
Streintenberger, Sergio;
García Gómez, Antonio;
García Gil, Alejandro y
Martínez Ortiz, Pedro

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

54 Título: **Nuevo fertilizante biológico y procedimiento de obtención.**

57 Resumen:

Nuevo fertilizante biológico y procedimiento de obtención.
Nuevo fertilizante biológico y procedimiento de obtención.
La presente invención se refiere a un fertilizante biológico
y estimulador del crecimiento vegetal que contiene:

a.- un cultivo puro de la cepa C3 de la especie *Pantoea dispersa* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número CECT-5801 la cual es capaz de producir cantidades elevadas de ácidos orgánicos, los cuales tienen la capacidad de solubilizar fosfatos del suelo, así como sideróforos y otras sustancias reguladoras del crecimiento vegetal; y

b.- un cultivo puro de la cepa M3 de la especie *Azospirillum brasilense* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número CECT-5802 la cual produce cantidades elevadas de ácido indol-3-acético, ambas inmovilizadas en un soporte sólido.

ES 2 234 417 A1

DESCRIPCIÓN

Nuevo fertilizante biológico y procedimiento de obtención.

5 **Objeto de la invención**

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

15 **Estado de la técnica**

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

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

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

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

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

La inoculación del suelo con microorganismos solubilizadores de fosfatos es una práctica común desde hace años, aunque los resultados que se presentan en la literatura son bastante contradictorios. En los años 50 se llevó a cabo en la antigua URSS y otros países del este de Europa, la inoculación de suelos con un producto llamado "fosfobacteria", compuesto fundamentalmente por una cepa de *Bacillus megaterium*, obteniéndose, de acuerdo a los informes realizados y las publicaciones, resultados muy satisfactorios (URSS, Ministry of Agricultura, 1953). Sin embargo, experiencias realizadas en EE.UU. con este producto en diferentes cultivos, no satisficieron las expectativas creadas, pues no se lograron en general efectos positivos producto del tratamiento. (Kucey y col 1989). En la actualidad existen procedimientos que emplean los microorganismos, solubilizadores de fosfatos en la fertilización (US Pat. 5,912,398).

Los métodos utilizados en el aislamiento de los microorganismos solubilizadores de fosfato, se basan fundamentalmente en el empleo de sales inorgánicas insolubles de fósforo, tales como el hidroxipatito y el fosfato tricálcico, en medios de cultivo agarizados. Para la utilización, de dichas sales, el microorganismo produce ácidos orgánicos que al difundir en el medio, provocan una disminución del pH y como consecuencia la formación de un halo de transparencia en las proximidades de la colonia (Goldstein, 1986, Kucey y col, 1989; Chabot y col, 1997) Sin embargo, Nautiyal (1999) señala que los medios de cultivo agarizados no siempre detectan a los microorganismos más aptos para la solu-

bilización de fosfatos. Este autor plantea un esquema y selección de este tipo de microorganismos utilizando cultivos líquidos agitados y destaca la importancia de determinados componentes del medio y su concentración en los resultados alcanzados, proponiendo un medio de cultivo para llevar a cabo la selección. Por otra parte Gyaneshwar y col (1999), trabajando con medios agarizados, concluyeron que la capacidad amortiguadora de pH del medio de cultivo utilizado en el aislamiento, tiene una importancia determinante en la selección de cepas que produzcan cantidades suficientes de ácidos orgánicos para que presenten un interés real en la biofertilización. En su trabajo también demostraron que *Enterobacter asburiae*, el glucónico es el principal componente de los bledos orgánicos producidos. Otro aspecto importante de este trabajo es la demostración de que la enzima glucosa deshidrogenasa, responsable de la producción del ácido glucónico es regulada por inanición de fosfatos, es decir que las bajas concentraciones de fosfatos solubles estimulan la producción de ácidos en este tipo de microorganismo.

En el diseño de todos estos métodos de aislamiento se tuvieron en cuenta algunos aspectos particulares del fenómeno de la solubilización de fosfatos *in vitro*, por lo que la combinación adecuada de éstos métodos podría dar resultados muy satisfactorios, si se tienen en cuenta además las características del ecosistema donde se pretenda llevar a cabo el aislamiento.

Los géneros *Enterobacter* y *Pantoea* han sido utilizados en la agricultura como solubilizadores de fosfato y para la protección contra enfermedades de las plantas (Gyaneshwar y col, 1999; Patentes europeas; EP1116632 y EP1174030; Patente española ES 2149131). Dentro de éstos, *Pantoea dispersa* es una especie que, hasta donde conocemos, no ha sido utilizada para estos fines. Genes de esta especie, que codifican la enzima para la detoxificación de la albicidina, han sido empleados para la obtención de plantas transgénicas resistentes a las enfermedades producidas por hongos (US Pat. 6,388,175), lo que demuestra su capacidad para proteger contra enfermedades de plantas de origen fúngico. No hemos encontrado ningún reporte de su empleo en la solubilización de fosfatos hasta el momento ni la estimulación del crecimiento vegetal.

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

El nitrógeno es un elemento abundante, que compone casi el 80% de la atmósfera terrestre y una parte nutritiva muy escasa. La paradoja se resuelve fácilmente: el nitrógeno atmosférico es inerte y no pueden aprovecharlo la mayoría de los organismos, pudiendo solamente ser incorporado en la síntesis biológica cuando ha sido "fijado" o combinado con ciertos elementos como el hidrógeno o el oxígeno. Las bacterias son capaces de fijar 1,5 x 10⁸ toneladas métricas por año, una parte importante de la cual es sintetizada mediante el proceso de Haber-Bosch. (Brill, W.F., 1977; Atlas y Bartha, 1993).

En los años 70 varios experimentos realizados en Brasil determinaron la significativa contribución del N₂ fijado para las plantas por diferentes microorganismos, encontrándose *Azospirillum* entre los géneros principales. (Döbereiner y Day, 1976; Neyra y Döbereiner, 1977 entre muchas otros). Estudios posteriores de cuantificación de la fijación biológica del nitrógeno (FBN) en caña de azúcar en este país, demostraron que prácticamente el 65% del total del N₂ acumulado fue derivado de la FBN, lo que representa alrededor de 150 kg N₂ x ha⁻¹ x año⁻¹ de lo que se derivó la recomendación de reducir al mínimo el uso de los fertilizantes nitrogenados, (Döbereiner, 1989; Urquiaga y Döbereiner, 1990).

Es sabido que diferentes especies de plantas, producen diversos efectos sobre la rizosfera, siendo también conocido que las cepas aisladas en un tipo de especie vegetal, tiene un efecto totalmente distinto sobre la rizosfera de la cual fue aislada con respecto a otros cultivos. Sin embargo, Basham y Levanony (1988), trabajando con *Azospirillum brasilense*, llegaron a la conclusión de que es capaz de colonizar plantas de diferentes especies adsorbiéndose a las raíces. Muchos trabajos han demostrado la ubicuidad del género *Azospirillum* llevando a cabo su aislamiento en cultivos variados, así como en regiones con climas muy disímiles. (Day y col, 1975; Döbereiner y Day, 1976; Reynders y Valassak, 1976; Tyler y col, 1979; Singh y col, 1981; Stephan y col, 1981; Hatmann y col, 1983; Kosslak y col, 1987; De Coninck y col 1989; US Pat. 5,951,978 entre otros).

De igual forma Okon y Kapulnik, 1986, demostraron que al inocular diferentes cultivos de plantas con especies del género *Azospirillum* aparecían cambios en la morfología de las raíces. Ellos pudieron determinar que en las primeras tres semanas después de la germinación, el número de pelos radiales y ramas de las raíces aumentaba con la inoculación, lo cual produce un aumento de la superficie de absorción de las raíces.

Bashn y col 1986; Bashan y Levanony, 1988, realizaron estudios de inoculación de plantas de trigo con *Azospirillum brasilense* y pudieron observar al microscopio electrónico de barrido que en la superficie de las raíces inoculadas se formaban pequeños agregados celulares, y al hacer cortes, encontraron que algunas bacterias penetraban las células jóvenes de las raíces, pero existían muchas más en los espacios intercelulares, así como en las opas epidémicas de las células. Encontraron a su vez que la adsorción de esta bacteria a las raíces es débil y se realiza mediante procesos de metabolismo dependientes de las bacterias, mediados por factores de reconocimiento. También se ha demostrado la capacidad de esta especie de trasladarse en el suelo para colonizar las raíces de las plantas (Bashn, Y. y Levanony, H., 1988a; Alexander y col 2000). En 1991 Bashan y col demostraron mediante el uso de esta misma técnica de microscopio

pía, que *Azospirillum brasilense* Cd es capaz de colonizar además de cereales, diferentes cultivos, produciendo sobre las raíces de éstos cambios morfológicos análogos a los ocurridos en la familia *Graminaceae*.

5 Bashan y col (1990) demostraron que no es solo el nitrógeno el principal elemento involucrado en la relación *Azospirillum*-planta, sino que también el fósforo y el potasio juegan un papel fundamental en esta relación, concluyendo que en dependencia de la cepa utilizada, existirá un cambio cuantitativo en la toma de los minerales por la planta, aumentado significativamente algunas cosechas.

10 En la actualidad es muy común el uso de este género en producción de fertilizantes biológicos (US Pats. 5,386,532 y 5,951,978 y Patente española ES2093559).

15 Hay que destacar que muchos autores coinciden en señalar que los efectos beneficiosos producidos por la inoculación con microorganismos sobre el crecimiento vegetal, no son solo debidos a la solubilización de fosfatos o a la fijación biológica del nitrógeno. Existen mecanismos tales como la producción de fitohormonas y sideróforos o la actividad de la enzima L-aminocidopropano L-carboxilato desaminasa entre otros, que contribuyen notablemente en este efecto (Datta y col, 1992, Chabot y col, 1993, Deubel and Gransee 1995, Frietas y col, 1997, El-Khawas y col, 1998; Cassán y col 2001 entre otros).

20 Entre las relaciones microbianas que tienen lugar en la rizosfera se encuentran las llamadas de cooperación que son las que se establecen entre aquellos grupos microbianos que llevan a cabo metabolismos complementarios, puede ser este el caso de algunas bacterias solubilizadoras de fosfatos que excretan al medio ácidos orgánicos los que a su vez constituyen la fuente principal de carbono en algunos géneros de las bacterias nitro fijadoras, permitiendo esto la convivencia de ambos grupos, a la vez de un doble efecto en el mejoramiento de los cultivos y en la protección contra enfermedades.

25 El desarrollo asociativo de los géneros *Azospirillum* y *Pantoea* ha sido llevado a cabo exitosamente en la fijación biológica de nitrógeno, demostrándose que no existen incompatibilidades entre ambos géneros y que al mostrar diferentes los mecanismos de regulación metabólica pueden realizar diferentes funciones en un ecosistema dado (Ruppel and Merbach, 1995). Los cultivos mixtos de microorganismos del suelo, con diferentes capacidades ácidas pueden desarrollar relaciones de cooperación entre sí y con las plantas que hacen más eficiente la adsorción de nutrientes por éstas y además pueden producir sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal, aumentando la productividad de las cosechas y protegiéndolas contra los microorganismos patógenos.

30 Las tendencias actuales en la inoculación de plantas con microorganismos se orientan en el sentido de utilizar cultivos mixtos (llamados también consorcios) que potencien fenómenos tales como el incremento de la eficiencia de la absorción del fósforo por las raíces, la fijación biológica del nitrógeno, la estimulación del crecimiento vegetal por la producción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, así como sideróforos y la protección contra enfermedades producidas por microorganismos patógenos entre otros (Patente española ES2C93559; Patente europea EP1166632; US Pats 5,147,441; 6,277,167 y 6,596,273). Esta práctica se ha revelado como la más efectiva en la biofertilización.

35 La forma física de un bioestimulador es también un factor determinante en el resultado práctico del producto elaborado y puede variar, siempre que sea compatible con las prácticas agrícolas, incorporándose fácilmente a las operaciones de rutina. En el producto, los microorganismos deben permanecer viables, en estado latente o metabólicamente activos (Fernández, 1995). Este factor tiene dos aspectos determinantes, la durabilidad del producto y la capacidad de éste para colonizar las raíces de los cultivos que se quiere estimular o proteger, una vez aplicado en el campo. El empleo de preparaciones de células libres es una práctica común en la biotecnología agrícola y resulta muy efectiva cuando se trabaja con microorganismos rapaces de formar estructuras de resistencia, como en el caso de bacterias del género *Bacillus*. Los insecticidas basados en *Bacillus thuringiensis* son comunes en el mercado agrícola desde hace más de 30 años. En la actualidad son también utilizadas otras especies del género para la protección vegetal (US Pats 6,589,524 y 6,599,503). Este problema tiene otro carácter cuando se trata de células que no tienen la capacidad de formar estructuras de resistencia, ya que los cultivos van perdiendo viabilidad con el tiempo y además su capacidad de supervivencia en el suelo es muy baja. Muchos de los fracasos que se han producido en el campo de la biofertilización y la bioprotección están relacionados con este fenómeno. La inoculación de suelos con microorganismos capaces de favorecer la productividad de las plantas, es un proceso muy complejo en el cual pueden tener un efecto determinante toda una serie de factores (Berkum and Bohlool, 1980, Bashan and Levanony, 1988 (a), Kucey y col 1989, Chabot y col 1997, Gyaneshwar y col 1999 y otros). Por esta razón, es imprescindible que el producto sea capaz de preservar la viabilidad celular en condiciones adversas durante largos periodos de tiempo y garantizar en la medida de lo posible la capacidad de colonización de las raíces una vez aplicado en el campo (Fernández 1995). Uno de los criterios más importante a tener en cuenta para esto es lograr preparados que liberen un número apreciable de células viables consistentemente (Paau, AS., 1988).

40 Para este fin, las técnicas de inmovilización celular ofrecen una serie de ventajas con respecto a las células libres, que las hacen muy atractivas para su aplicación en la práctica y muy particularmente para la biotecnología agrícola y ambiental. El empleo de células inmovilizadas puede potenciar los efectos de los microorganismos sin crear problemas de contaminación, dando lugar a productos muy activos y novedosos. Una técnica que ha sido utilizada con éxito en la solución de este problema es la inmovilización por atrapamiento en geles (Patente cubana 22323, US Pat. 6,311,426). Vassileva y col 1998a, llevaron a cabo la inmovilización por atrapamiento en geles de agar, κ -carragenina y alginato

de una cepa de *Aspergillus niger*, obteniendo resultados superiores en la producción de ácido cítrico con respecto a las células libreas. Estos mismos autores inmovilizaron una cepa de *Enterobacter agglomerans* y obtuvieron resultados muy satisfactorios en la solubilización de fosfatos del suelo (Vassileva y col 1998b, Vassileva y col 1999).

5 Sin embargo, esta técnica de inmovilización tiene como desventaja fundamental para la agricultura su elevado costo, tanto de materia prima como del proceso industrial. Otra técnica muy utilizada en la práctica es la adsorción. Numerosos han sido los soportes empleados con este fin. En agricultura en particular, el empleo de arcilla, vermiculita, perlita, sepiolita, caolín, tierra de diatomeas, zeolita natural y otros es de uso habitual (US Pats. 5,503,652; 6,254,654).

10 Las zeolitas son aluminios-silicatos, cuyas redes están formadas por tetraedros de AlO_4^- y SiO_4^- . Este enrejado posee carga negativa que compensa con cationes intercambiables que ocupan sitios específicos en los canales y cavidades de la zeolita. Este mineral posee dos propiedades muy importantes; capacidad de adsorción e intercambio iónico, las cuales son muy ventajosas para su posible uso como soporte de inmovilización. En la actualidad se conoce alrededor de 50 tipos de zeolitas naturales. Como soporte de inmovilización celular ha sido utilizada en diferentes procesos e incluso para la conservación 5 de microorganismos. En Agricultura ha sido muy empleada como sustrato para cultivos sin tierra llamados "Zeopónicos" Steinberg y col (2000), así como en diferentes preparados como regenerador de suelos o fertilizante de liberación controlada (Frederick 1985; US Pats. 4,772,307; 5,451,242 y 6,271,174), promotor del crecimiento de plantas (US Pat 5,900,378) y como soporte inerte para diversos preparados biológicos fertilizantes (US Pats. 4,985,060; 5,670,345; 5,773,355 y 6,254,654). La combinación de todas estas propiedades podría resultar muy atractiva para la obtención de un producto seco para la biofertilización, más aún si se trata de microorganismos que no son capaces de formar estructuras de resistencia. Para este fin, sería imprescindible lograr que la mortalidad celular sea muy baja o nula durante el proceso de producción y particularmente en la etapa de secado del producto. Lograr este objetivo permitiría obtener productos muy efectivos siempre que se logre un proceso de producción.

25 Para que la obtención de un biopreparado resulte atractiva desde el punto de vista económico, es necesario realizar una selección adecuada del medio en que se va a llevar a cabo su producción. Para esto resulta seleccionar cuidadosamente las materias primas y materiales a utilizar, de manera que se minimicen los costos de la etapa (Fernández y Villaverde, 1993). Para este fin, es necesario que las materias primas y su concentración en el medio de fermentación permitan obtener una elevada concentración celular o del producto deseado a un costo mínimo. Los productos de origen natural pueden resultar muy ventajosos para este fin, dado su bajo costo y su inocuidad para el medio ambiente. Estos pueden tener como ventaja adicional, estimular efectos deseados si son incluidos en el preparado final. Los un-
30 cenarios de tomate han sido utilizados en la producción de giberelinas y otros usos, como fuente de nitrógeno (US Pat. 6,287,800), sin embargo, a pesar de su elevado contenido en carbono orgánico, no tenemos referencias de que hayan sido empleados como fuente de carbono para el crecimiento y la producción de metabolitos de origen microbiano. Por otra parte, el hidrolizado de colágeno de uso en la agricultura podría resultar una fuente de nitrógeno orgánico muy adecuada y barata, incluso para microorganismos incapaces de producir enzimas proteolíticas. La combinación de estas dos fuentes la lugar a un medio de cultivo bastante universal, así como de muy bajo costo y por tanto muy atractivo para la realización de procesos fermentativos a gran escala.

40 Descripción de la invención

El objeto de la presente invención es un fertilizante biológico que contiene células de nuevos aislados de *Azospirillum brasilense* (Tarrand y col, 1979) cepa M_3 fijadora de nitrógeno atmosférico y que presenta una elevada capacidad para producir sustancias reguladoras del crecimiento vegetal del tipo auxinas, así como otras, y *Pantoea dispersa* (Gavini, y col, 1989) cepa C_3 que posee una alta eficiencia en la producción de ácidos orgánicos para la solubilización de fosfatos y otros nutrientes del suelo, que los autores de la presente invención han logrado aislar. Dichos microorganismos han sido depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) que les ha asignado los números de depósito CECT-5802 a *Azospirillum brasilense* M_3 y CECT-5801 a *Pantoea dispersa* C_3 . Las bacterias fueron identificadas por los autores y se solicitó la además la identificación en la CECT verificándose su identidad. Dicho fertilizante biológico consiste en un producto constituido por un soporte sólido compuesto por gránulos de zeolita, en el cual han sido inmovilizadas las bacterias y que contiene además los nutrientes necesarios para garantizar su supervivencia, una vez inoculadas las plantas.

55 El microorganismo *Azospirillum brasilense* M_3 CECT 5802 constituye igualmente objeto de esta invención. El mismo fue obtenido mediante un procedimiento que combina el aislamiento en medio NFb semi-sólido (Kreig y Döbereiner, 1984) y la selección a través su capacidad para estimular el crecimiento vegetal y producir auxinas y otras fitohormonas. La capacidad para estimular el crecimiento vegetal fue comprobada mediante bioensayos de laboratorio e invernadero, según los métodos descritos por Bashan y col 1986, Fernández 1995 y Bashan 1998. Se comprobó, mediante estos bioensayos que la cepa M_3 fue la que mayor efecto estimulador del crecimiento produjo de los más de 60 50 aislados de bacterias fijadoras de nitrógeno ensayados. La producción de ácido-3-indol acético y otras sustancias promotoras del crecimiento vegetal fue verificada por métodos colorimétricos (Pilet y Chollet 970) y HPLC (Olivella y col 2001), así como se detectó la presencia de otras fitohormonas del tipo citoquininas. En la producción de ácido-3-indol acético, se logran valores de más del 95% de transformación del triptófano en medio tomate con 150 mg x L^{-1} de este aminoácido. Se comprobó también la actividad del enzima 1-aminociclopropano 1-carboxilato desaminasa presente en esta cepa, a través del crecimiento en medios con ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC) como única fuente de nitrógeno (Penrose 2001).

Así mismo constituye objeto de la presente invención el microorganismo *Pantoea dispersa* C_3 CECT 5801. El mis-

mo fue obtenido utilizando un procedimiento que combina el aislamiento en medios agarizados con tampón Tris_HCl 1N pH 8, por zonas de aclaramiento del agar (Gyaneshwar y col 1999) y selección mediante determinación del PO_4^{3-} solubilizado en medios líquidos agitados (Nautiyal 1999), empleando en ambos casos Ca_3PO_4 insoluble como única fuente de fósforo. Se llevó a cabo la caracterización de los ácidos orgánicos producidos y se comprobó que produce ácido glucónico mayoritariamente, así como otros ácidos orgánicos en pequeñas cantidades. La selección se efectuó también a través su capacidad para estimular el crecimiento vegetal y de producir auxinas. Así mismo se determinó su capacidad para producir sideróforos (Schwyn y Neilands 1987). La capacidad para estimular el crecimiento vegetal fue comprobada mediante bioensayos de laboratorio e invernadero, según los métodos descritos por Bashan y col 1986, Fernández 1995 y Bashan 1998. Se comprobó también la actividad del enzima 1-aminociclopropano 1-carboxilato desaminasa presente en es cepa, a través del crecimiento en medios con ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC) como única fuente de nitrógeno (Penrose 2001).

También constituye objeto de esta patente el medio de cultivo de producción de las citadas cepas el cual contiene pasta de tomate como fuente de carbono e hidrolizado de colágeno de piel de origen animal de uso fertilizante como fuente de nitrógeno orgánico con el que se alcanzan elevados conteos celulares en 12-14 horas de fermentación para ambas cepas. El medio de cultivo resulta muy económico y lo que es más importante, se alcanzan elevados conteos celulares del orden de 10^9 - 10^{10} células/mL en ambos casos. Este medio ha sido probado también con resultados similares en el cultivo de cepas de otros géneros de bacterias y hongos aislados por los autores.

De igual manera es objeto de esta invención el procedimiento de obtención del producto el cual consta de los siguientes pasos:

- a) Inmovilización de las células de las cepas M_3 y C_3 , embebiendo e impregnando los gránulos de zeolita hasta saturación de liquido en una proporción de entre 7 y 12 kg de soporte por litro de medio fermentado con una concentración celular entre 10^9 - 10^{10} células/mL de cada cepa. Posteriormente se lleva a cabo el secado de la zeolita húmeda en una corriente de aire a una temperatura inferior a 80°C hasta alcanzar entre un 3-6% de humedad. En estas condiciones se logra una elevada supervivencia celular.
- b) Adsorción de las diferentes sales al soporte, poniendo en contacto la zeolita con cada una de ellas para lograr la carga efectiva del soporte con los nutrientes necesarios y secado posterior de cada una de las fracciones activadas del soporte a niveles de humedad residual similares al paso a).
- c) Mezclado de las fracciones secas en las proporciones adecuadas para obtener el producto final.

Preferiblemente, las zeolitas son zeolitas naturales en las siguientes proporciones: zeolita- NH_4^+ , 20-30%, zeolita- K^+ , 15-25%, zeolitas Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} y Cu^{2+} , 0,02-0,1% de cada una, zeolita Ca^{2+} y Mg^{2+} , 2-7%, total de zeolita- M_3 , 20-30%, total de zeolita- C_3 , 20-30% y Roca Fosfórica 1-5%.

Este producto tiene una elevada estabilidad y conserva la viabilidad celular, sin pérdidas significativas, por al menos un año a temperaturas no mayores de 30°C . Su actividad estimuladora del crecimiento vegetal ha sido comprobada por más de un año, conservando sus propiedades iniciales. En su aplicación en el campo ha demostrado una alta efectividad para la colonización de raíces de diferentes cultivos y en suelos de distinta naturaleza, así como el efecto estimulador del crecimiento y de la nutrición general de las plantas en los ensayos realizados. También se ha comprobado mediante ensayos de campo, que permite reducir la fertilización química y produce una mejora notable en la estructura del suelo.

También es objeto de esta patente el procedimiento de inmovilización empleado, el cual ha sido utilizado con otras cepas microbianas con resultados muy satisfactorios.

Modo de realización preferente de la invención

Propagación de las cepas Azospirillum brasilense M_3 y Pantoea dispersa C_3

Se toma una ampolla del aislado de la cepa M_3 conservado se siembra en placas de medio Rojo Congo (Rodríguez Cáceres, 1982) y incuba a 30°C durante 72 h, para comprobar su pureza. De esta placa se prepara un inóculo para el fermentador tomándose una porción del cultivo con un asa, se inocula un matraz erlenmeyer de 1000 mL, con 100 mL de medio tomate y se incuba en agitación a 30°C durante 16 h. Al cabo de este tiempo se inocula el contenido del matraz, que se encuentra en fase exponencial, en un fermentador Braun Biotech BIOSTAT® B de 3 L con 1,9 L de medio tomate. Se lleva a cabo la fermentación durante 16 horas a una velocidad de agitación de 600 r.p.m., y una aireación de $2 \text{ L} \times \text{min}^{-1}$ (1 v.v.m.) y una temperatura de 30°C . El pH se deja variar libremente y al final tuvo un valor de 6,8. Se alcanzó una concentración de $8,9 \times 10^9$ cel x mL^{-1} . La velocidad específica de crecimiento en fase exponencial (μ) fue de $0,25 \text{ h}^{-1}$. Para la cepa C_3 se siguió, el mismo esquema de fermentación. La pureza del cultivo se comprobó en medio MacConkey (OXOID 1981) y el inóculo se incubó en agitador orbital durante 12 horas. El cultivo en el fermentador BIOSTAT® B se llevó a cabo durante 12 horas a una velocidad de agitación de 600 r.p.m., y una aireación de $3 \text{ L} \times \text{min}^{-1}$ (1,5 v.v.m.) y una temperatura de 30°C . El pH se deja variar libremente también y al final tuvo un valor de 6,9. Se alcanzó una concentración de $9,5 \times 10^9$ cel x mL^{-1} . La velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial para esta cepa fue de $\mu = 0,57 \text{ h}^{-1}$.

ES 2 234 417 A1

En ambas fermentaciones se utilizó un medio con la siguiente composición:

Medio para M₃ y C₃

5	Componente	g
	Pasta de tomate	36,00
	K ₂ PO ₄	3,30
10	KH ₂ PO ₄	2,75
	NH ₄ CL	0,84
	Hidrolizado de colágeno	5,00
	Extracto de levaduras	0,75
15	H ₂ O _(esp)	1 L
	pH=7,0	
	Esterilización 121°C por 30 minutos	

20 Con los caldos fermentados se procedió a impregnar una zeolita natural con un tamaño de partícula máximo de 2 mm, en la proporción de 10:1 (10 kg de zeolita / L de caldo fermentado), con agitación intermitente. Se dejó reposar durante 2 horas para que se embebiera el caldo en el sólido, hasta la saturación completa de la zeolita y luego se procedió a seca a mediante una corriente de aire a una temperatura inferior a 80°C, con movimiento continuo durante 2 horas. Al final se obtuvo 20 kg de zeolita-M₃ y otros 20 kg de zeolita-C₃, con una humedad residual de 4-8%.

25 La obtención de la zeolita cargada con cationes se llevó cabo poniendo en contacto el sólido con una solución de la sal a intercambiar, la proporción adecuada para cada sal. Posteriormente se deja en contacto durante aproximadamente 4 horas con agitación. Una vez terminado este paso, se separa la solución del sólido por decantación y se conserva para su regeneración y uso posterior. El sólido así tratado se escurre se seca en una corriente de aire 200°C con movimiento continuo durante 1 hora. Al final se obtienen porciones de zeolita seca cargada con la sal deseada con una humedad residual del 4-8%.

30 Para preparar 50 kg de producto total, las diferentes sales se ponen en contacto con la zeolita para el intercambio iónico de los macroelementos (Tabla 1) y los microelementos (Tabla 2) en las siguientes proporciones de sólido y solución de sales:

TABLA 1

Características del intercambio iónico para los macroelementos

Macroelementos				
Catión	Sal	kg de zeolita	V H₂O (L)	kg de sal
NH⁴⁺	(NH₄)₂SO₄	12,3	36,8	1,6
K⁺	K₂HPO₄	9,3	27,8	0,967

TABLA 2

Características del intercambio iónico para los microelementos

Microelementos				
Catión	Sal	g de zeolita	V H₂O (mL)	g de sal
Zn²⁺	Zn(NO₃)₂	25	75	0,624
Cu²⁺	CuSO₄·5H₂O	25	75	0,636
Mn²⁺	MnSO₄	25	75	0,444
Fe²⁺	FeSO₄	25	75	0,440

ES 2 234 417 A1

Una vez obtenidas las diferentes fracciones secas, el producto final es preparado mediante la mezcla de las diferentes fracciones. Para preparar 50 kg de producto se ponen las cantidades que se muestran en la Tabla 3:

TABLA 3

Cantidades y proporciones de las diferentes fracciones de zeolita

Tipo de fracción	% Fracción	kg Fracción
zeolita-NH ⁴⁺	24,6	12,3
zeolita-K ⁺	18,6	9,3
zeolita-Zn ²⁺	0,05	0,025
zeolita-Cu ²⁺	0,05	0,025
zeolita-Mn ²⁺	0,05	0,025
zeolita-Fe ²⁺	0,05	0,025
zeolita-M ₃	25	12,5
zeolita-C ₃	25	12,5
zeolita-Ca ²⁺ -Mg ²⁺	4,6	2,3
Roca fosfórica	2	1
Total	100%	50 kg

A este producto se le comprobó periódicamente la viabilidad celular en medio Rojo Congo (Rodríguez Cáceres, 1982) para *Azospirillum brasilense* M₃ y medio MacConkey (OXOID 1981) para *Pantoea dispersa* C₃, comprobándose que conserva más del 60% de viabilidad al cabo de un año de conservación a temperaturas no mayores de 35°C.

Con el producto elaborado se llevaron a cabo ensayos de laboratorio, invernadero experimental y en condiciones de producción en vivero y campo con resultados muy satisfactorios.

En tomate en particular los resultados obtenidos en invernadero experimental y vivero de producción se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

Resultados de los ensayos de tomate

Tipo de experimento	% incremento vs control	Variable	Tiempo días
Macetas en invernadero experimental	9,6	PF verde	60
	13,2	PF raíz	
Vivero de producción de plantas	14,9	PF verde	35
	17,5	PF raíz	

Se puede observar que existe una estimulación notable, sobre todo del peso fresco de la raíz, lo cual es muy importante para el desarrollo de la planta y el proceso de toma de nutrientes y producción.

ES 2 234 417 A1

También se llevó a cabo con este cultivo un ensayo en condiciones de campo en una parcela de invernadero de 320 m².

El módulo de ensayo se dividió en dos subparcelas, en una se transplantan 10 filas pareadas de tomate, con una densidad de plantación de 2,5 plantas/m².

La parcela se dividió en dos sectores independientes con fertirrigación diferenciada y el programa de fertilización mineral fue el estándar en la zona para este de cultivo.

En cada subparcela se aplicaron 2 tratamientos, con 4 repeticiones de cada uno de ellos distribuidos al azar. Los tratamientos son:

T₁: Tratamiento fertilizante según normas habituales de la zona.

T₂: Tratamiento con biofertiizante aplicado en el momento del transplante, sin fertilización, sólo con aporte de agua de riego.

En principio estaba previsto iniciar en el tratamiento con el fertilizante biológico una fertilización en cobertura según normas habituales de la zona, cuando la sintomatología de la plantación lo indicara conveniente. Finalmente esto no se hizo pues las plantas no mostraron carencias nutricionales en ningún momento del ensayo. La dosis del producto empleadas fueron de 25 g/planta, aplicada en la raíz en el momento del transplante. Se aplicaron los tratamientos fitosanitarios habituales para este tipo de cultivo con el objetivo de prevenir enfermedades y plagas. El ensayo se comenzó el 15 de enero de 2003 y se mantuvo por espacio de 7 meses aproximadamente. En la tabla 5 se muestran los resultados de producción durante todo el tiempo que duró el ensayo.

TABLA 5

Datos medios por recolecciones realizadas en las plantas de tomate (Kg/planta)

Fecha	T ₁	T ₂
24/04/2003	0,24	0,27
29/04/2003	0,18	0,38
05/05/2003	0,16	0,30
13/05/2003	0,42	0,50
20/05/2003	0,47	0,61
27/05/2003	0,51	0,71
03/06/2003	0,26	0,28
12/06/2003	0,66	0,65
23/06/2003	0,66	0,64
27/06/2003	0,85	0,61
05/07/2003	0,58	0,71
11/07/2003	0,66	0,52
18/07/2003	0,59	0,44
Total	6,24	6,66

Como se puede observar, se logró una producción similar, incluso superior en un 6% aproximadamente en el tratamiento con el fertilizante biológico solamente, con respecto al que fue fertilizado según un ciclo de fertilización mineral estándar para la zona donde se llevó a cabo.

ES 2 234 417 A1

Hay que destacar además que como resultado de este ensayo se demostró que la aplicación del producto produjo un incremento notable de la actividad microbiana en el suelo lo cual provocó una importante mejora de la estructura de éste, y un sensible aumento en los niveles asimilables de los diferentes nutrientes minerales. Por otra parte, se produjo un incremento de la masa radical en las plantas tratadas con el fertilizante biológico con respecto al control.

También se llevaron a cabo diferentes ensayos en invernadero experimental y vivero de producción en otros cultivos, obteniéndose resultados muy satisfactorios que se detallan en la Tabla 6.

TABLA 6

Resultado de los ensayos realizados en diferentes cultivos

Cultivo	% incremento vs control	Variable	Tipo de experimento
Trigo	54,5	PF verde ^{**}	Jardineras en invernadero experimental
	13,2	PF raíz	
Césped	12,0	PF total ^{***}	Jardineras en invernadero experimental
Lechuga	53,4	PF verde	Jardineras en invernadero experimental
Rábano	24,2	PF Bulbo ^{****}	Macetas
Melón	18,4	PF raíz	Semillero de producción
Pimiento	15,9	PF raíz	Semillero de producción

- = Peso fresco
- ** = Tallo y hojas
- *** = Raíz + tallo y hojas
- **** = Bulbo solo

Los experimentos en invernadero experimental fueron llevados a cabo en jardineras de 15 L de volumen total y el sustrato empleado fue tierra y turba en una proporción 3:1, mientras que las macetas fueron de 500 mL utilizando como sustrato turba y vermiculita en la proporción 3:1. Las dosis aplicadas en invernadero experimental fueron de 15 g x L⁻¹ de sustrato, mezclándose bien antes de la siembra e inoculación. En estos ensayos se tomó como control plantas sin inocular. En los semilleros de producción, el producto fue mezclado con el sustrato habitualmente empleado, en una proporción de 15 g x L⁻¹ de sustrato también. Se puede observar que el producto estimula en todos los casos el crecimiento de la raíz y la ramificación de éstas, con lo cual se favorece la nutrición vegetal y la toma de nutrientes de la planta, lo que se refleja en todo el crecimiento del vegetal y en su estado general. En el caso particular de la aplicación en semilleros, tiene como ventaja adicional, que la planta, al tener mayor masa radical, soporta mejor el proceso de transplante.

REIVINDICACIONES

1. Un cultivo puro de la cepa denominada C₃ de la especie *Pantoea dispersa* **caracterizada** por producir cantidades elevadas de ácidos orgánicos, los cuales tienen la capacidad de solubilizar fosfatos del suelo, así como sideróforos y otras sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número CECT-5801.

2. Un cultivo puro de la cepa denominada M₃ de la especie *Azospirillum brasilense* **caracterizada** por producir cantidades elevadas de ácido indol-3-acético, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número CECT-5802.

3. Fertilizante biológico y estimulador del crecimiento vegetal **caracterizado** por contener *Azospirillum brasilense* cepa M₃ (CECT-5802) y *Pantoea dispersa* cepa C₃ (CECT-5801) inmovilizadas en un soporte sólido.

4. Fertilizante biológico y estimulador del crecimiento vegetal según la reivindicación 3, **caracterizado** por mantener su actividad por un periodo de tiempo superior a un año.

5. Fertilizante biológico y estimulador del crecimiento vegetal según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, **caracterizado** por contener además de las células bacterianas, el sobrenadante del medio de cultivo con materia orgánica, fitohormonas y otras sustancias estimuladoras del crecimiento de plantas.

6. Fertilizante biológico y estimulador del crecimiento vegetal según cualquiera de las reivindicaciones 3-5, **caracterizado** porque dicho soporte sólido comprende diferentes fracciones de zeolitas naturales, activadas con iones NH₄⁺, K⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ o mezclas de las mismas.

7. Fertilizante biológico y estimulador del crecimiento vegetal según la reivindicación 6, **caracterizado** porque la proporción en la que se encuentran dichas zeolitas naturales en dicho soporte sólido es la siguiente: zeolita-NH₄⁺, 20-30%, zeolita-K⁺, 15-25%, zeolitas Zn²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺ y Cu²⁺, 0,02-0,1% de cada una, zeolita Ca²⁺ y Mg²⁺, 2-7%, total de zeolita-M₃, 20-30%, total de zeolita-C₃, 20-30% y Roca Fosfórica 1-5%.

8. Un procedimiento de obtención de un fertilizante biológico, según reivindicaciones 3-7 **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- a. cultivar células bacterianas mediante un proceso de fermentación sumergida en un medio de cultivo que comprende una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno orgánico.
- b. inmovilizar células bacterianas en un soporte sólido mediante un proceso de adsorción, dicho soporte embebido en el medio de cultivo fermentando con células hasta saturación.
- c. secar mediante corriente de aire a una temperatura inferior a 80°C.

caracterizado porque dichas células bacterianas son la *Azospirillum brasilense* cepa M₃ (CECT-5802) y la *Pantoea dispersa* cepa C₃ (CECT-5801).

9. Un procedimiento de obtención de un fertilizante biológico según la reivindicación 8, **caracterizado** porque dicha fuente de carbono es pasta de tomate concentrada al 3-6% en volumen con respecto al volumen total del cultivo, dicha fuente de nitrógeno es hidrolizado de colágeno de piel animal al 0,2-1% en volumen con respecto al volumen total del cultivo y en el cual se alcanzan concentraciones celulares de 10⁹-10¹⁰ células/mL,

10. Un procedimiento de obtención de un fertilizante biológico la reivindicación 8, **caracterizado** porque dicho soporte sólido se obtiene mezclando distintas zeolitas naturales en las siguientes proporciones: zeolita-NH₄⁺, 20-30%, zeolita-K⁺, 15-25%, zeolitas Zn²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺ y Cu²⁺, 0,02-0,1% de cada una, zeolita Ca²⁺ y Mg²⁺, 2-7%, total de zeolita-M₃, 20-30%, total de zeolita-C₃, 20-30% y Roca Fosfórica 1-5%.

11. Un procedimiento de obtención de un fertilizante biológico según la reivindicación 10, **caracterizado** porque dichas zeolitas naturales se obtienen cargando el soporte con los diferentes cationes mediante el contacto de la zeolita natural con la solución de la sal del catión que se pretende intercambiar, y posterior secado de la zeolita.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 234 417

② Nº de solicitud: 200302619

③ Fecha de presentación de la solicitud: 24.10.2003

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 1/20, C05F 11/08, 63/00, A01N 63/02 // (C12N 1/20, 1:01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil, 2003, Vol. 255, páginas 571-586.	2
A	RUPPEL, S. y MERBACH, W. Effect of ammonium and nitrate on $15N_2$ -fixation of <i>Azospirillum</i> spp. and <i>Pantoea agglomerans</i> in association with wheat plants. Microbiol. Res., 1997, Vol. 152, páginas 377-383.	1-3
A	KIM, K.Y. et al. Enterobacter agglomerans, phosphate solubilizing bacteria, and microbial activity in soil: Effect of carbon sources. Soil Biol. Biochem., 1998, Vol. 30 (Nº 8/9), páginas 995-1003.	1
A	RIGGS, P.J. et al. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. Aust. J. Plant Physiol., 2001, Vol. 28, páginas 829-836.	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.05.2005

Examinador
A. Polo Díez

Página
1/1