

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 525**

51 Int. Cl.:

**C05D 9/02** (2006.01)

**C05F 11/02** (2006.01)

**C05G 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2016 E 16382063 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2020 EP 3208254**

54 Título: **Composición fertilizante que incluye iones complejados con sustancias húmicas para mejorar la fijación biológica del nitrógeno por parte de microorganismos presentes en el suelo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.02.2021**

73 Titular/es:  
**FERTINAGRO BIOTECH, S.L. (100.0%)**  
**Pol. Ind. La paz, parcelas 185-188**  
**44195 Teruel, ES**

72 Inventor/es:  
**ATARES REAL, SERGIO;**  
**ROMERO LÓPEZ, JOAQUÍN;**  
**COLOM TOMÁS, ELENA;**  
**NARANJO OLIVERO, MIGUEL ÁNGEL;**  
**SALAET MADORRAN, IGNASI y**  
**FERRER GINÉS, MARÍA**

74 Agente/Representante:  
**GONZÁLEZ LÓPEZ-MENCHERO , Álvaro Luis**

ES 2 805 525 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

Composición fertilizante que incluye iones complejados con sustancias húmicas para mejorar la fijación biológica del nitrógeno por parte de microorganismos presentes en el suelo

La presente invención se refiere generalmente a una composición fertilizante que incluye iones complejados con sustancias húmicas para mejorar la fijación biológica del nitrógeno por parte de microorganismos presentes en el suelo, en particular microorganismos fijadores de nitrógeno, facilitando de esta manera la absorción del nitrógeno en forma de derivados amónicos, nitrito y nitrato por parte de las plantas.

Más específicamente, la invención proporciona una composición fertilizante que incluye iones metálicos complejados con sustancias húmicas, consistiendo los iones metálicos en cobalto, hierro y molibdeno para mejorar la capacidad de los microorganismos fijadores de nitrógeno presentes en el suelo tales como *Clostridium*, en particular *Clostridium pasteurianum*, *Rhizobium* y *Azotobacter*, de convertir el nitrógeno atmosférico, que no se combina fácilmente con otros elementos, en metabolitos asimilables por las plantas y, de esta manera, aumentar la cantidad de nitrógeno asimilable por las plantas en el suelo, mejorando de esta manera el crecimiento o desarrollo de las mismas. Las composiciones fertilizantes que comprenden iones complejados con sustancias húmicas se conocen de los documentos EP 1 612 200 A2, US5.213.692 A, DE 41 05 247 A1, US 5.354.350 A y RU 2 237 643 C2.

Esta composición fertilizante, por lo tanto, facilita no sólo el desarrollo y crecimiento de las plantas, sino también constituye un tratamiento para los suelos, más concretamente para los microorganismos presentes en los suelos, permitiendo de forma similar combatir el problema de la acumulación de nitrógeno en los suelos y reduciendo la necesidad de fertilizar los suelos con abonos nitrogenados.

El crecimiento de todas las plantas está determinado de forma directa o indirecta por la disponibilidad de nutrientes minerales, en particular el nitrógeno. Una vez cubiertas las necesidades de agua, el factor limitante más importante es el nitrógeno. Una planta con deficiencia de nitrógeno sufriría clorosis, manifestando una coloración amarillenta de tallos y hojas, falta de desarrollo y debilidad. Por el contrario, cuando la planta tiene suficiente nitrógeno, sus hojas y tallos crecen rápidamente. En agricultura, el nitrógeno es el principal nutriente para el crecimiento de las plantas y, de esta manera, los rendimientos de los cultivos en suelos carentes de nitrógeno son bajos.

El nitrógeno es un elemento esencial para el crecimiento de todos los microorganismos. El nitrógeno está presente en la atmosfera en forma de  $N_2$  en un 80 % aproximadamente, sin embargo, debido a la fortaleza del enlace entre los dos átomos de nitrógeno, la reactividad de éste es prácticamente nula, lo que provoca que no sea asimilable por la mayoría de los organismos vivos.

Así, los átomos de nitrógeno están en continuo movimiento; se desplazan lentamente entre el aire, la tierra, el agua y los organismos vivos o muertos. Este ininterrumpido ciclo cerrado se denomina ciclo del nitrógeno. La estabilidad del nitrógeno le dificulta la combinación con otros elementos y, por lo tanto, es difícil de asimilar por los organismos y necesita una gran cantidad de energía para combinarse con otros elementos. Sin embargo, existe un grupo de microorganismos, que son capaces de utilizar este nitrógeno a través del proceso conocido como fijación biológica del nitrógeno y que, en general, consiste en la conversión del nitrógeno atmosférico en formas metabolizables que puedan asimilarse por los seres vivos, en particular formas de amonio, nitrito y nitrato.

Todos los microorganismos capaces de llevar a cabo la fijación biológica del nitrógeno lo hacen gracias a la actividad del complejo enzimático, Nitrogenasa. Las nitrogenasas son enzimas oxidoreductasas que catalizan reacciones de tipo óxido-reducción, específicamente la reducción de nitrógeno molecular; siendo de particular importancia para las plantas, ya que en ellas llevan a cabo el proceso de fijación de nitrógeno convirtiéndolo en amonio fácilmente asimilable. En general, las nitrogenasas están formadas por dos componentes (Chan, Michael K.; Jongsun, Kim Rees, D. C., The Nitrogenase FeMo--Cofactor and P--Cluster Pair: 2.2 Å Resolution Structures, Science, 260, 792-794, 1993):

- La proteína Fe-M, en donde el metal (M) puede ser molibdeno, vanadio o hierro. Es un tetrámero  $\alpha_2\beta_2$  formado por 30 átomos de hierro y dos del metal correspondiente, distribuidos en dos tipos de agrupaciones: los paquetes cúbicos o tipo "P" ( $8Fe, 7S^{2-}$ ) y el cofactor Fe-M.
- La proteína sólo hierro, sensible al oxígeno, contiene únicamente agrupaciones tipo  $4Fe_4S$ , así como dos sitios de unión a MgATP.

Las nitrogenasas se encuentran en bacterias tales como *Clostridium pasteurianum*, *Rhizobium* y Azotobacterias. Las bacterias *Rhizobium* se encuentran en las raíces de las leguminosas de tal manera que la fijación de nitrógeno se lleva a cabo en los nódulos de las mismas; allí, las bacterias degeneran ahí en bacterioides y en una hemoglobina especial, denominada leghemoglobina, que atrapa el oxígeno, protegiendo a la nitrogenasa y proporcionando esto al resto de la planta.

El cobalto es una coenzima precursora de la leghemoglobina, enzima que mantiene las condiciones anaerobias en el entorno de la nitrogenasa. Una deficiencia en cobalto inhibe la síntesis de la leghemoglobina, lo que provocaría un flujo excesivo de oxígeno, inactivando la nitrogenasa (Biología de las plantas, Volumen 2. Peter H. Raven, Ray F.

Evert, Susan E. Editorial Reverté).

Hay diversos factores ambientales que limitan la fijación del nitrógeno. Por ejemplo, la nodulación se ve afectada por el exceso o carencia de determinados elementos minerales. Una deficiencia de molibdeno influye negativamente en la fijación del nitrógeno. Otro elemento mineral es el hierro, que sin embargo cuando escasea no tiene un efecto directo sobre la fijación del nitrógeno. El hierro y el molibdeno son elementos constituyentes de la nitrogenasa, es por ello que la presencia de ambos elementos es esencial para el buen funcionamiento de la enzima.

Los microorganismos fijadores de nitrógeno pueden llegar a ser una solución al problema medioambiental de nitrificación de los suelos, prueba de ello es el hecho de que existen diversos estudios y patentes relacionadas con la activación de los mismos, por ejemplo la patente US 2004/0241847, en donde se utilizan microorganismos modificados genéticamente para aumentar la actividad nitrogenasa de los microorganismos.

La composición fertilizante objeto de la invención incluye iones cobalto, hierro y molibdeno complejados con sustancias húmicas para mejorar la capacidad de los microorganismos fijadores de nitrógeno presentes en el suelo, tales como *Clostridium pasteurianum*, *Rhizobium* y *Azotobacter*, de convertir el nitrógeno atmosférico en metabolitos asimilables por las plantas y, de esta manera, aumentar la cantidad de nitrógeno asimilable por las plantas en el suelo, mejorando de esta manera el crecimiento o desarrollo de las mismas.

De la técnica anterior son conocidas composiciones fertilizantes que comprenden agentes bioactivos, en particular microorganismos que facilitan el crecimiento de las plantas. Por ejemplo, en el documento US 20140352376, se describe una composición fertilizante NPK que incluye un vehículo revestido con una mezcla de bacterias seleccionadas de entre el género *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* y en donde la mezcla de bacterias está recubierta con el vehículo en una proporción de  $10^6$  a  $10^{11}$  UFC por gramo de vehículo.

El objeto de la presente invención es proporcionar una composición fertilizante que incluye iones cobalto, hierro y molibdeno complejados con sustancias húmicas para mejorar la capacidad de los microorganismos fijadores de nitrógeno presentes en el suelo, tales como *Clostridium pasteurianum*, *Rhizobium* y *Azotobacter*, de convertir el nitrógeno atmosférico, que no se combina fácilmente con otros elementos, en metabolitos asimilables por las plantas y, con ello, aumentar la cantidad de nitrógeno asimilable por las plantas en el suelo, mejorando con ello el crecimiento o desarrollo de las mismas.

En la presente invención, la frase "composición fertilizante" se refiere a cualquier composición orgánica o inorgánica, natural o sintética, tanto en estado sólido como líquido, que proporcione a las plantas uno o varios de los elementos nutritivos esenciales para el desarrollo vegetal normal de las mismas, habitualmente macroelementos primarios (N, P, K), macroelementos secundarios (Ca, Mg, S) y microelementos (B, Cl, Co, CU, Fe, Mn, Mo y Zn). La frase "composición fertilizante" abarca, en particular, fertilizantes minerales sencillos (contenidos en uno solo de los macroelementos siguientes: nitrógeno, fósforo o potasio) y fertilizantes minerales complejos (contenidos en más de uno de los macroelementos siguientes: nitrógeno, fósforo o potasio), fertilizantes orgánicos, fertilizantes órgano-minerales, etc., tales como, fertilizantes P, fertilizantes K, fertilizantes N, fertilizantes NP, fertilizantes PK, fertilizantes NK o fertilizantes NPK.

La composición fertilizante incluye iones cobalto, hierro y molibdeno complejados con sustancias húmicas.

Los ácidos húmicos son agrupaciones macromoleculares complejas que forman parte de la materia orgánica del suelo y que mejoran la absorción de macronutrientes, estimulando de esta manera el crecimiento vegetal. La extracción, caracterización y propiedades de los ácidos húmicos se describe por ejemplo en los documentos US3398186 A, US3544296 A o EP0284339 B1.

A este respecto, debe indicarse que no todos los ácidos húmicos tienen las mismas capacidades de complejación, por lo tanto en la presente invención estos ácidos húmicos se modifican para adquirir esta capacidad, siendo esta característica diferenciadora del resto de ácidos húmicos convencionales. Los ácidos húmicos se modifican de esta manera para potenciar aquellos grupos funcionales de los mismos que ayudan en la complejación, particularmente los grupos carboxilato y éster aromático, aumentando la concentración de estos grupos.

Por ejemplo, para obtener ácidos húmicos que se originan a partir de la leonardita, se lleva a cabo una doble extracción. La primera extracción se lleva a cabo por adición de potasa a una solución acuosa de una leonardita de características conocidas. La segunda extracción se lleva a cabo en un medio ácido, se ajusta mediante la adición de ácido sulfúrico a un pH entre 0 y 2, lo que significa de esta manera que las sustancias húmicas precipitan. Por último, las sustancias húmicas se redisuelven añadiendo carbonato potásico y pirofosfato hasta un pH de aproximadamente 10.

En la Figura 1 se muestra un espectro infrarrojo que muestra las diferencias entre los ácidos húmicos modificados y otros existentes en el mercado. Esta prueba se llevó a cabo con tres muestras diferentes, dos productos ya existentes en el mercado (composición comercial 1 y composición comercial 2) y el correspondiente a la invención, todos ellos en estado sólido, empleando un aparato Carry 630 FTIR Spectrometer de Agilent, a temperatura ambiente y presión

atmosférica. De cada una de las muestras se pesó la misma cantidad y se depositó sobre el cristal de diamante ATR del equipo, detectando las frecuencias de vibración típicas de cada uno de los grupos funcionales del ácido húmico en un rango comprendido entre 4000 cm<sup>-1</sup> y 650 cm<sup>-1</sup>. Una vez obtenidos los espectros de cada una de las muestras, y con el fin de comparar los resultados, los espectros se superpusieron para obtener de esta manera el espectro de la Figura 1.

En la Figura 2 se muestra un gráfico de amplificación-fluorescencia PCR obtenido con un sistema de detección con SYBR Green.

Como puede observarse en el espectro de la Figura 1, los picos que aparecen a 1400 y a 1010 cm<sup>-1</sup> correspondientes a los grupos carboxilato y éster aromático implican una concentración claramente superior de estos grupos complejantes en los ácidos húmicos usados aquí. Como ya se ha mencionado, éstos son los responsables de la complejación, por lo que, a mayor concentración de estos, mayor capacidad de complejación.

La concentración de iones metálicos cobalto, hierro y molibdeno complejados con sustancias húmicas presente en la composición se encuentra en el intervalo que fluctúa entre el 0,01 % y el 50 % en peso con respecto al peso total de la composición.

La concentración de iones cobalto, hierro y molibdeno complejados con sustancias húmicas presente en la composición fertilizante es la mostrada en la siguiente Tabla 1, expresada en porcentaje en peso con respecto al peso total de la composición fertilizante:

Tabla 1

	Concentración (p/p)
Mo	0,01 % - 20 %
Co	0,01 % - 20 %
Fe	0,01 % - 50 %

Se llevó a cabo una prueba para estudiar el crecimiento y el desarrollo de microorganismos con la capacidad de fijar el nitrógeno para verificar que la adición de la composición fertilizante de acuerdo con la invención implica un crecimiento de microorganismos fijadores de nitrógeno presentes en el suelo (*Clostridium pasteurianum*, *Rhizobium* y *Azotobacter*). Para este fin, se prepararon cultivos que contenían, en cada caso, tierra, un exceso de azúcares para evitar que la fuente de carbono fuera un factor limitante y la composición fertilizante de la invención. Se preparó también un cultivo de control incluyendo la misma tierra y la misma concentración de azúcares, pero sin la composición fertilizante de la invención. Los cultivos se prepararon en cámara de cultivo con agitación y temperatura controlada durante un periodo de 3 a 5 días.

Se recogió una muestra de estos cultivos tanto en el momento de su preparación como tras el cultivo durante el tiempo citado y se llevó a cabo un análisis comparativo del número de microorganismos con actividad nitrogenasa mediante PCR en tiempo real. Los resultados se muestran en la Figura 2.

Tal como se observa en la Figura 2, puede verificarse que existe una mayor cantidad de microorganismos con capacidad para fijar nitrógeno en las muestras donde se añade la composición fertilizante de la invención. De esta manera pueden observarse unas primeras curvas de fluorescencia entre los ciclos 22-23, que corresponden con la muestra de ensayo final que contiene la composición fertilizante de la invención, indicando un mayor número de microorganismos con actividad enzimática nitrogenasa que la muestra que no la contiene, interpretado con las curvas que aparecen en el ciclo 33. A su vez se llevó a cabo el análisis de las muestras recogidas inicialmente en la muestra, tanto la muestra sin la composición de la invención, curvas del ciclo 38, como con la composición, que corresponde con las curvas en torno al ciclo 37. Queda así reflejada la importancia que tiene la adición de fertilizante en el crecimiento de microorganismos con la actividad enzimática buscada. En las muestras control, el crecimiento de microorganismos fijadores de nitrógeno es menor, curvas de fluorescencia en el ciclo 36. Las 4 últimas curvas, ciclos 36-38, son las muestras de prueba iniciales. Las pruebas se llevaron a cabo por duplicado.

En la siguiente Tabla 2, se indican los resultados en Ct de cada una de las curvas de amplificación de las pruebas.

Tabla 2

	Ct a lo largo del tiempo			
	Tiempo inicial (0 h)		Tiempo final (120 h)	
Muestra control	37,26	37,84	33,45	33,62
Muestra con la composición fertilizante de la invención	36,67	36,93	23,11	22,87

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición fertilizante de tipo N, P, K, NP, NK, PK o NPK **caracterizada por que** incluye iones metálicos complejados con sustancias húmicas, consistiendo los iones metálicos en cobalto, hierro y molibdeno, para mejorar la capacidad de fijar biológicamente nitrógeno por parte de microorganismos fijadores de nitrógeno presentes en el suelo y aumentar la absorción del nitrógeno en forma de derivados de amonio, nitrito y nitrato por parte de las plantas.
- 10 2. La composición fertilizante de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** los microorganismos fijadores de nitrógeno pertenecen a los géneros *Clostridium*, *Rhizobium* y *Azotobacter*.
- 15 3. La composición fertilizante de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** la concentración de iones cobalto, hierro y molibdeno complejados con sustancias húmicas presente en la composición se encuentra en el intervalo que fluctúa entre el 0,01 % y el 50 % en peso con respecto al peso total de la composición.
- 20 4. La composición fertilizante de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada por que** la concentración de iones cobalto complejados con sustancias húmicas presente en la composición se encuentra en el intervalo del 0,01 % - 20 % en peso con respecto al peso total de la composición.
- 25 5. La composición fertilizante de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada por que** la concentración de iones molibdeno complejados con sustancias húmicas presente en la composición se encuentra en el intervalo del 0,01 % - 20 % en peso con respecto al peso total de la composición.
6. La composición fertilizante de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada por que** la concentración de iones hierro complejados con sustancias húmicas presente en la composición se encuentra en el intervalo del 0,01 % - 50 % en peso con respecto al peso total de la composición.

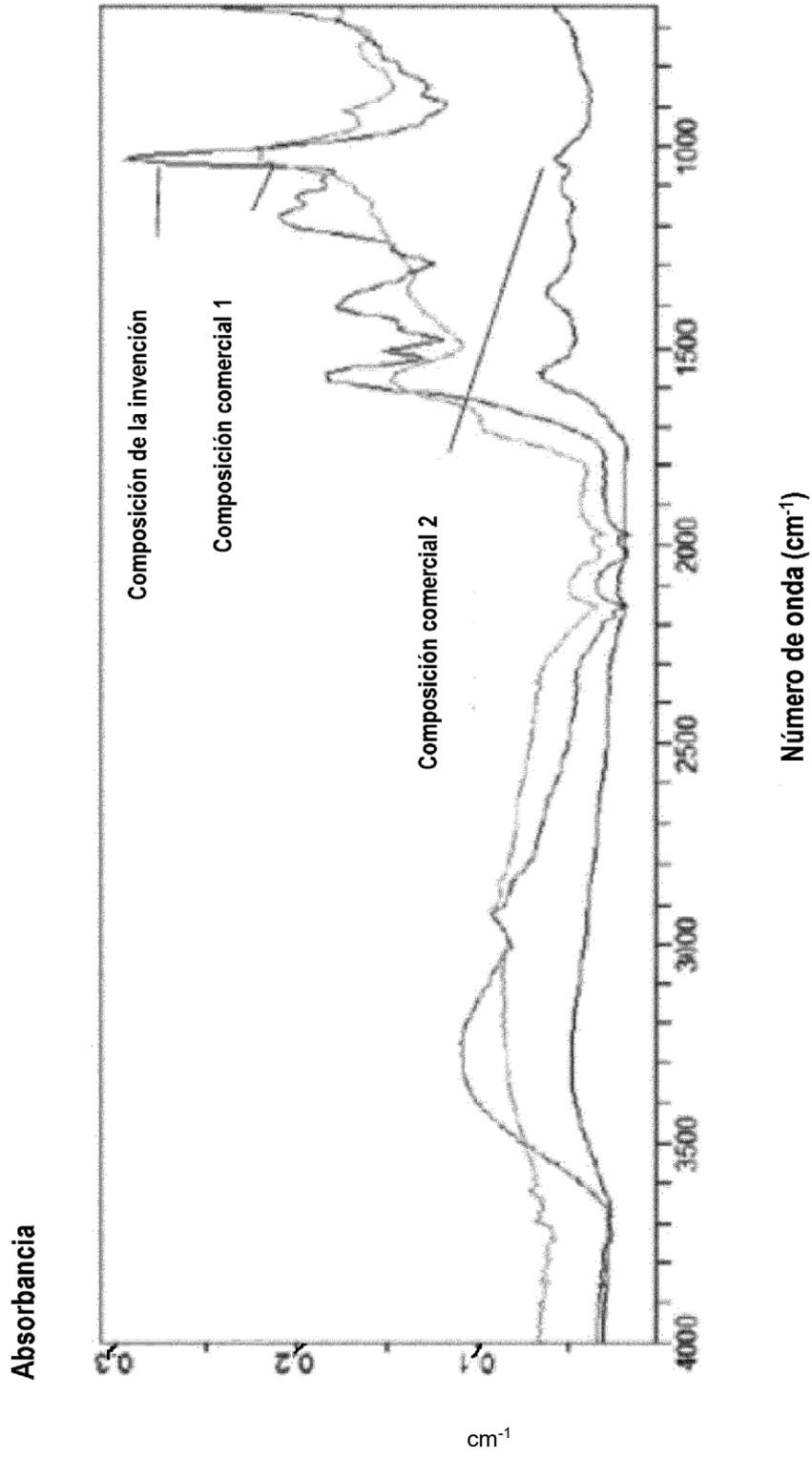
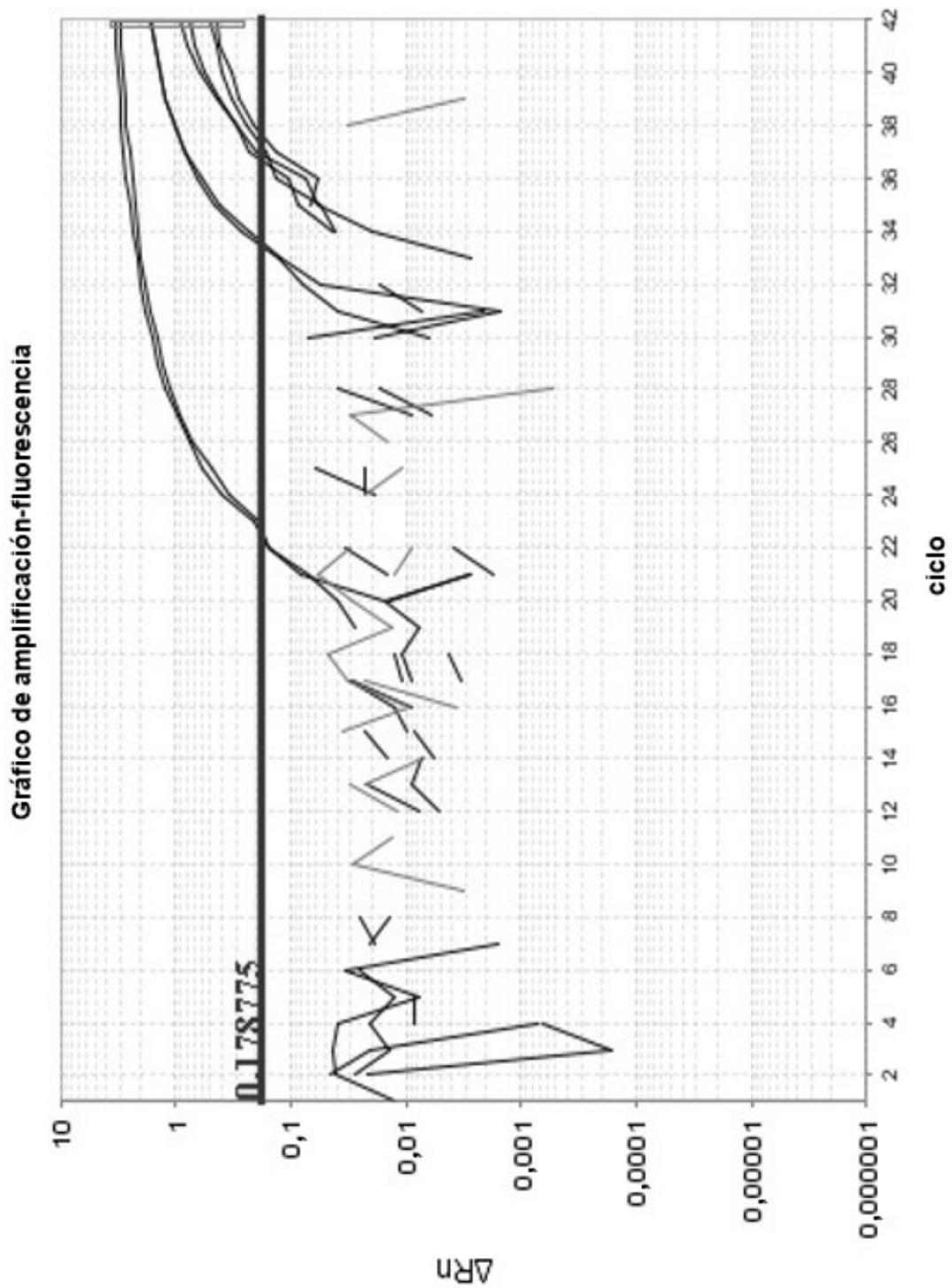


Figura 1



Amplificación por PCRq mediante un sistema SYBR Green de microorganismos fijadores de nitrógeno

Fig. 2