

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2007.08.27	(73) Titular(es): PROBELTE, S.A.	
(30) Prioridade(s):	CTRA MADRID KM 384.6 30100 ESPINARDO	ES
(43) Data de publicação do pedido: 2010.06.09	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: 2015.08.19 231/2015	ANA ISABEL FERNANDEZ MARTINEZ	ES
	MARIO JORGE VILLAYERDE FERNANDEZ	ES
	JUAN ANTONIO CASANOVA ROCA	ES
	JORGE MALO LOPEZ-ROMAN	ES
	ISIDRO BLANCA PICÓ	ES
	(74) Mandatário:	
	FERNANDO ANTÓNIO FERREIRA MAGNO	PT
	RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º 1200-195 LISBOA	

(54) Epígrafe: **NOVO FERTILIZANTE BIOLÓGICO, MÉTODO PARA OBTENÇÃO DO MESMO E SUA UTILIZAÇÃO COMO ESTIMULADOR DO CRESCIMENTO DE PLANTAS**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A UM NOVO FERTILIZANTE BIOLÓGICO, A UM MÉTODO PARA OBTENÇÃO DO MESMO E À SUA UTILIZAÇÃO COMO UM ESTIMULADOR DO CRESCIMENTO DE PLANTAS, COMPREENDENDO O REFERIDO FERTILIZANTE UMA CULTURA PURA DA ESTIRPE C3 DE PANTOEIA DISPERSA, UMA CULTURA PURA DA ESTIRPE DE M3 DE AZOSPIRILLUM BRASILENSE E ÁCIDO INDOLO-3-ACÉTICO, TODOS IMOBILIZADOS NUM MEIO SÓLIDO ÚNICO QUE ATUA COMO SISTEMA DE LIBERTAÇÃO LENTA. O MÉTODO INCLUI OS SEGUINTE PASSOS PRINCIPAIS: CULTURA DOS MICRO-ORGANISMOS; IMOBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS, NUTRIENTES E OUTRAS SUBSTÂNCIAS NO MEIO; E UM ÚNICO PASSO DE SECAGEM EM LEITO FLUIDIZADO QUE PERMITE QUE TEMPERATURAS MAIS BAIXAS SEJAM USADAS E QUE SEJAM OBTIDOS TEORES MAIS BAIXOS DE HUMIDADE, PROPORCIONANDO ASSIM MAIOR ESTABILIDADE AO FERTILIZANTE. A AÇÃO DO FERTILIZANTE COMEÇA COM O CONTACTO COM A PLANTA.

RESUMO

"Novo fertilizante biológico, método para obtenção do mesmo e sua utilização como estimulador do crescimento de plantas"

A invenção refere-se a um novo fertilizante biológico, a um método para obter o mesmo e à sua utilização como um estimulador do crescimento de plantas, compreendendo o referido fertilizante uma cultura pura da estirpe C3 de *Pantoea dispersa*, uma cultura pura da estirpe de M3 de *Azospirillum brasilense* e ácido indolo-3-acético, todos imobilizados num meio sólido único que atua como sistema de libertação lenta. O método inclui os seguintes passos principais: cultura dos micro-organismos; imobilização das células, nutrientes e outras substâncias no meio; e um único passo de secagem em leito fluidizado que permite que temperaturas mais baixas sejam usadas e que sejam obtidos teores mais baixos de humidade, proporcionando assim maior estabilidade ao fertilizante. A ação do fertilizante começa com o contacto com a planta.

DESCRIÇÃO

"Novo fertilizante biológico, método para obtenção do mesmo e sua utilização como estimulador do crescimento de plantas"

Campo da invenção

A presente invenção refere-se a um produto para a fertilização biológica consistindo numa formulação granulada compreendendo duas estirpes de bactérias dos géneros *Azospirillum* e *Pantoea*, com a capacidade de fixar o azoto atmosférico, para solubilizar fosfatos, bem como outros nutrientes minerais do solo, e para produzir grandes quantidades de substâncias estimuladoras do crescimento de plantas. Os micro-organismos referidos foram imobilizados por meio da técnica de adsorção a um suporte sólido, atuando como um sistema de libertação lenta, o qual, além disso, assegura uma elevada estabilidade na viabilidade celular, bem como nutrientes orgânicos e sais suficientes para facilitar a colonização das raízes das plantas. Os micro-organismos isolados, o método de imobilização das células, e a utilização do fertilizante biológico assim obtido como um estimulador do crescimento de plantas são também objeto da presente invenção.

Estado da técnica

O uso de fertilizantes é essencial para manter os rendimentos das culturas elevados. Quantidades importantes de azoto, fósforo e potássio, bem como outros elementos minerais, são adicionados ao solo através de fertilização química, no entanto, as disponibilidades destes elementos são muito baixas, uma vez que é bem conhecido que uma fração é imobilizada no solo, formando compostos insolúveis que não podem ser assimilados pelas plantas e uma outra fração é lavada por meio de um processo de lixiviação, o qual gera um considerável problema de poluição ambiental, além de perdas económicas.

No caso do fósforo, especialmente uma parte considerável dos fosfatos solúveis adicionados é insolubilizada pelo ferro e pelo alumínio em solos ácidos e pelo cálcio em solos calcários (Chabot *et al.*, 1993), sendo progressivamente convertido em formas menos assimiláveis. Como resultado dos diferentes mecanismos de retenção, a maior parte do fósforo aplicado

através de fertilização não pode ser utilizado pelas culturas e é retida no solo em forma insolúvel (Stevenson, 1986). Dado este fenómeno e a aplicação cíclica de fertilizantes, a concentração de fósforo no solo aumentou consideravelmente, pelo que culturas de longo prazo poderiam ser estabelecidas em muitos solos se estas reservas pudessem ser exploradas economicamente (Kucey *et al.*, 1989).

A importância dos micro-organismos no ciclo dos nutrientes no solo e o seu papel na nutrição das plantas é bem conhecido. A sua participação ativa na decomposição e mineralização da matéria orgânica, assim na fixação e na libertação de nutrientes do solo é crucial para manter a produtividade vegetal. As interações que ocorrem entre os micro-organismos do solo e as raízes das plantas respondem a exigências nutricionais importantes para ambos. As raízes são diretamente influenciadas pela composição e densidade da comunidade microbiana que se desenvolve nessas raízes, sendo isto conhecido como o "efeito rizosfera", que pode ser estimado, mas que se sabe depender em particular da planta e da sua maturidade fisiológica (Atlas, RM e Bartha, R., 1993) A prática de inocular plantas com micro-organismos é bem conhecida há muitos anos (Patente US 570813).

Um grupo de micro-organismos que tem uma importância considerável neste fenómeno é aquele que participa na solubilização do fósforo a partir de fontes que de outra forma seriam inacessíveis para as plantas (Kucey *et al.*, 1989).

Micro-organismos que solubilizam fosfato foram isolados em praticamente todos os solos testados, embora o número e a proporção destes variem de acordo com o tipo de solo, o clima e outros fatores, tais como a evolução histórica do solo. Muitos micro-organismos são capazes de assimilar o fósforo insolúvel do solo, libertando parte deste sob a forma de fosfatos solúveis que por sua vez podem ser utilizados pelas plantas, contribuindo assim para a nutrição das plantas (Chabot *et al.*, 1993). É geralmente aceite que a solubilização de fosfatos no solo se deve à produção de ácidos orgânicos e oxo-ácidos de açúcares quelantes (Leyval e Barthelin 1989, Deubel e Gransee 1996, Yadav e Dadarwal, 1997).

Os géneros *Enterobacter* e *Pantoea* têm sido utilizados em agricultura como solubilizantes de fosfato e para proteção

contra doenças das plantas. Entre estes géneros, *Pantoea dispersa* é uma espécie que tem sido utilizada para estes fins.

Um outro aspeto que na prática tem um papel muito importante é a utilização de micro-organismos da rizosfera que são fixadores de azoto atmosférico. Esta prática também é conhecida há muitos anos (patente US1212196. Um número de microrganismos tem sido usado para esta função, incluindo bactérias de géneros tais como *Rhizobium*, *Azotobacter* e *Azospirillum* (patente espanhola ES2093559; patente US5951978), e fungos dos géneros *Saccharomyces*, *Hansenula* (US6596273) e *Aspergillus* (US4670037), entre outros.

O azoto é um elemento abundante, formando quase 80% da atmosfera da Terra e uma parte nutritiva muito escassa. O paradoxo é facilmente resolvido: o azoto atmosférico é inerte e a maioria dos organismos não pode usá-lo, sendo apenas incorporado em síntese biológica quando tenha sido "fixado" ou combinado com certos elementos tais como hidrogénio ou oxigénio. As bactérias são capazes de fixar $1,5 \times 10^8$ toneladas métricas por ano, uma parte considerável do qual é sintetizado pelo processo de Haber-Bosch (Brill, WF, 1977; Atlas e Bartha, 1993).

Diversas experiências realizadas no Brasil na década de 1970 determinaram a contribuição significativa do N₂ fixado para as plantas, por diferentes micro-organismos, estando *Azospirillum* entre os principais micro-organismos (Döbereiner e Day, 1976; Neyra e Döbereiner de 1977, *inter alia*).

Sabe-se que diferentes espécies de plantas têm diferentes efeitos na rizosfera, sendo também conhecido que as estirpes isoladas num certo tipo de espécie de plantas têm um efeito completamente diferente na rizosfera a partir do qual foram isoladas, em relação a outras culturas. No entanto, no seu trabalho com *Azospirillum brasilense*, Basham e Levanony (1988) concluíram que esta espécie é capaz de colonizar plantas de espécies diferentes, ao ser adsorvido para as raízes.

A utilização deste género para a produção de fertilizantes biológicos é hoje muito comum (patentes US5366532 e 5951978 e patente espanhola ES2093559).

As tendências atuais na inoculação de plantas com micro-organismos visam a utilização de culturas mistas (também

chamadas consórcios) que melhoram fenômenos como o aumento da eficiência da absorção de fósforo pelas raízes, a fixação biológica de azoto, a estimulação do crescimento de plantas pela produção de substâncias reguladoras do crescimento de plantas, bem como sideróforos, e proteção contra doenças causadas por micro-organismos patogénicos, entre outros. Esta prática tem demonstrado ser a mais eficaz em biofertilização.

A forma física de um bioestimulador também é um fator determinante no resultado prático do produto preparado e pode variar, desde que seja compatível com práticas agrícolas, sendo prontamente incorporadas em operações de rotina. Os micro-organismos devem manter-se viáveis no produto, quer em estado latente ou metabolicamente ativos. Este fator tem dois aspetos determinantes, a durabilidade do produto e a capacidade do produto para colonizar as raízes das culturas que estão para ser estimuladas ou protegidas, uma vez aplicado no campo. Alguns problemas podem surgir quando se lida com as células que não têm a capacidade de formar estruturas resistentes uma vez que as culturas perdem viabilidade gradualmente ao longo do tempo e a sua capacidade de sobrevivência no solo é, além disso, muito baixa. Por esta razão, é essencial que o produto seja capaz de preservar a viabilidade das células em condições adversas por longos períodos de tempo e assegurar, tanto quanto possível, a capacidade para colonizar as raízes, uma vez aplicado no campo. Um dos critérios mais importantes a ter em consideração para este efeito é obter preparações que libertam consistentemente um número considerável de células viáveis. Para este propósito, as técnicas de imobilização celular oferecem uma série de vantagens relativamente às células livres, tornando-as muito apelativas para a sua aplicação na prática e, muito particularmente, para a biotecnologia agrícola e ambiental. O uso de células imobilizadas pode melhorar os efeitos dos micro-organismos sem criar problemas de poluição, dando origem a produtos muito ativos e novos. Uma técnica amplamente utilizada na prática é a adsorção. Há um certo número de suportes utilizados para esta finalidade. Na agricultura, em particular, o uso de argila, vermiculite, perlite, sepiolite, caulino, terra de diatomáceas, zeólitos naturais e similares é típico.

Os zeólitos são aluminossilicatos, cujas redes são formadas por tetraedros de AlO_4 e SiO_4 . Esta estrutura tem uma carga negativa que é compensada com catiões permutáveis ocupando

locais específicos nos canais e cavidades do zeólito. Este sal tem duas propriedades muito importantes: a capacidade de adsorção e troca iónica, que são muito vantajosas para sua possível utilização como um suporte de imobilização. As propriedades destes produtos podem ser muito apelativas para a obtenção de um produto seco para biofertilização, ainda mais se envolve micro-organismos que não são capazes de formar estruturas resistentes. Para este efeito, seria essencial que a morte celular fosse muito baixa ou nula durante o processo de produção e, particularmente, no passo de secagem do produto. Alcançar este objetivo permitiria obter produtos muito eficazes, desde que seja conseguido um processo de produção.

ES 2234417 descreve um fertilizante biológico consistindo numa formulação granular contendo a estirpe C₃ da espécie *Pantoea dispersa* depositada na Coleção Espanhola de Culturas Tipo (CECT) com o número CECT 5801 e a estirpe M₃ da espécie *Azospirillum brasilense* depositada na Coleção Espanhola de Culturas Tipo (CECT) com o número CECT 5802, ambas imobilizadas num suporte sólido, e um processo para a sua preparação.

O referido fertilizante biológico é capaz de fixação de azoto atmosférico, bem como de solubilização de fosfatos e outros nutrientes minerais, tendo, assim, uma boa atividade de fertilização. Esta atividade é devida ao facto de, por exemplo, a estirpe C₃ ser capaz de produzir grandes quantidades de ácidos orgânicos, principalmente ácido glucónico, que é útil para solubilizar o fosfato insolúvel do solo, enquanto, por exemplo, a estirpe M₃ é capaz de fixação de azoto e de produção de ácido indolo-3-acético, que é um fator muito importante envolvido no crescimento das plantas.

Estas estirpes são imobilizadas num suporte sólido, por exemplo, um zeólito, a fim de obter um produto final caracterizado por uma boa estabilidade, bem como uma viabilidade celular satisfatória. O suporte sólido é adicionalmente abastecido com sais para facilitar a colonização das raízes das plantas.

No entanto, quando o fertilizante de acordo com ES2234417 contacta com a planta através do solo, necessita de algum tempo para realizar a sua ação uma vez que para as estirpes serem capazes de começar a sua atividade, elas têm que colonizar as raízes das plantas e estabelecer com as referidas raízes uma

relação que lhes permita realizar a sua ação de conversão num produto útil. Assim, a atividade de fertilização não pode ser levada a cabo imediatamente quando o fertilizante contacta com a planta através do solo, mas pode ser observada depois de um certo tempo, dependendo das características do solo, das condições climáticas e de muitos outros fatores. Este aspeto pode provocar um atraso na ação biofertilizante e um certo atraso no crescimento, pelo menos inicialmente, nas plantas tratadas. De facto, certas condições climáticas, tais como chuva, granizo, etc., podem afetar parcialmente ou completamente o fertilizante do solo, incapacitando portanto a sua atividade.

Além disso, de acordo com ES2234417 o processo para a preparação de um fertilizante biológico inclui a adsorção das estirpes, bem como dos nutrientes e sais no suporte sólido, obtendo-se assim um produto molhado que necessita de ser seco, de forma a se obter estabilidade celular elevada. De facto, um elevado nível de humidade no produto final pode causar degradação rápida das estirpes e viabilidade mais baixa.

O passo de secagem é levado a cabo a uma temperatura compreendida entre 60 - 80°C, a qual é relativamente elevada para preservar a viabilidade das estirpes. O nível de humidade assim obtido está compreendido entre 3-6%.

De acordo com ES2234417, cada estirpe, bem como os nutrientes, são adsorvidos num suporte sólido diferente, obtendo-se assim pelo menos duas séries diferentes de suportes sólidos, que são misturados em quantidades predeterminadas, obtendo-se o fertilizante biológico. De acordo com este processo é portanto necessário levar a cabo pelo menos dois passos de secagem diferentes, uma vez que os nutrientes e as estirpes são secos separadamente e as células nunca atingem temperaturas superiores a 80°C.

Sumário da invenção

Um objeto da presente invenção é proporcionar um fertilizante biológico que exerce uma ação fertilizante e/ou estimulante para o crescimento imediato das plantas assim que o fertilizante contacta com a planta através do solo.

Outro objeto da presente invenção é proporcionar um fertilizante biológico que exerce uma atividade fertilizante e/ou estimulante para o crescimento melhorado.

De igual forma, um outro objeto da presente invenção consiste em proporcionar um fertilizante biológico cuja atividade é mantida, ou seja, é mantido estável em condições de armazenamento, durante um longo período de tempo, pelo menos, dois anos.

Finalmente, um outro objeto da presente invenção consiste em proporcionar um processo para a preparação de um fertilizante biológico compreendendo um menor número de passos em comparação com o processo de acordo com o estado da técnica tendo várias vantagens industriais.

Divulgação da Invenção

Estas e outras vantagens que vão ser mais bem explicadas abaixo são obtidas com um fertilizante que compreende:

- a.- uma cultura pura da estirpe C₃ da espécie *Pantoea dispersa* depositada na Coleção Espanhola de Culturas Tipo (CECT) com o número CECT 5801,
 - b.- uma cultura pura da estirpe M₃ da espécie *Azospirillum brasilense* depositada na CECT com o número CECT 5802,
- ambas imobilizadas num suporte sólido,
- c.- ácido indolo-3-acético (IAA) ou um promotor de ácido indolo-3-acético selecionado como L-triptofano.

O novo fertilizante biológico de acordo com a presente invenção contém células de *Azospirillum brasilense*, estirpe M₃, um fixador de azoto atmosférico, e tem uma elevada capacidade de produzir substâncias reguladoras do crescimento de plantas do tipo ácido indolo-3-acético (IAA), e *Pantoea dispersa*, estirpe C₃, que é altamente eficaz na produção de ácidos orgânicos, principalmente ácido glucónico, para a solubilização

de fosfatos e outros nutrientes do solo, bem como tem a capacidade de produzir, por exemplo, sideróforos e substâncias reguladoras do crescimento das plantas. Os referidos micro-organismos foram depositados na Coleção Espanhola de Culturas Tipo (CECT) aos quais foram atribuídos os números de acesso CECT-5802 para *Azospirillum brasilense* M₃ e CECT-5801 para *Pantoea dispersa* C₃. O referido fertilizante biológico consiste num produto formado por um suporte sólido, no qual as bactérias foram imobilizadas e contendo, além disso, os nutrientes necessários para assegurar a sua sobrevivência uma vez que as plantas sejam inoculadas, atuando assim como um sistema de libertação lenta.

O micro-organismo *Azospirillum brasilense* M₃ CECT 5802 foi obtido através de um método que combina o isolamento em meio semissólido NFb e a seleção através da sua capacidade para estimular o crescimento das plantas e produzir ácido indolo-3-acético e outras hormonas vegetais. A capacidade para estimular o crescimento das plantas foi verificada através de bioensaios laboratoriais e de estufa, de acordo com os métodos descritos por Bashan et al. 1986, Fernández 1995 e Bashan 1998. Verificou-se através destes bioensaios que a estirpe M₃ foi a que produziu o maior efeito estimulador do crescimento dos mais de 50 isolados de bactérias fixadoras de azoto testadas. A produção de ácido indolo-3-acético (IAA) foi verificada através de métodos colorimétricos (Pilet Chollet e 1970) e por HPLC (Olivella et al., 2001), e a presença de outras hormonas vegetais do tipo citocinina foi também detetada. Na produção de IAA em meio de tomate com 200 mg x L⁻¹ de triptofano, são alcançadas concentrações de 100 - 180 mg x mL⁻¹ e uma percentagem de transformação de até 95% deste aminoácido. O micro-organismo *Pantoea dispersa* C₃ CECT 5801 foi obtido utilizando um método que combina o isolamento em meio de ágar com tampão Tris-HCl 1N, pH 8, por causa da clareza do ágar (Gyaneshwar et al., 1999) e seleção por meio da determinação do PO₄³⁻ solubilizado no meio líquido agitado (Nautiyal 1999), utilizando em ambos os casos Ca₃PO₄ insolúvel como a única fonte de fósforo. Os ácidos orgânicos produzidos foram caracterizados e verificou-se que produz principalmente ácido glucónico. A seleção foi feita também através da capacidade do mesmo para estimular o crescimento das plantas e para produzir auxinas.

De acordo com a invenção, o novo fertilizante biológico compreende, além das estirpes C_3 e M_3 , ácido indolo-3-acético (IAA).

Este terceiro componente representa um progresso significativo em relação aos fertilizantes biológicos conhecidos. De facto, a presença de IAA desde o início, juntamente com as duas estirpes C_3 e M_3 dá ao produto resultante a possibilidade de ser ativo imediatamente, assim que o fertilizante contacta com a planta através do solo, uma vez que o IAA é capaz de exercer a sua ação como estimulador do crescimento das plantas, enquanto que as estirpes C_3 e M_3 são capazes de iniciar a produção de IAA após a sua inoculação no solo e depois da conversão dos substratos necessários. Com o novo fertilizante, de acordo com a presente invenção, existe uma vantagem imediata devido à presença de IAA, que atua como um estimulador do crescimento da planta assim que o fertilizante contacta com a planta através do solo, permitindo, assim que as estirpes C_3 e M_3 colonizem as raízes das plantas e estabeleçam com elas a relação que lhes permite realizar a sua ação estimuladora do crescimento.

Além disso, e surpreendentemente, verificou-se que a mesma estirpe C_3 produz ácido indolo-3-acético (IAA) numa quantidade muito significativa.

Por exemplo, na produção de IAA em meio de tomate com $200 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ de triptofano, são alcançadas concentrações de $80 - 120 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ e uma percentagem de transformação de até 60% deste aminoácido.

Este é um aspeto muito importante, uma vez que a produção de ácido indolo-3-acético (IAA) pela estirpe C_3 representa uma melhoria na atividade total do fertilizante biológico resultante.

De facto, no novo produto fertilizante de acordo com a presente invenção, ambas as estirpes C_3 e M_3 são capazes de produzir ácido indolo-3-acético, conferindo assim ao produto uma atividade substancialmente melhorada como fertilizante para plantas e estimulador de crescimento de plantas, se este for comparado com os fertilizantes biológicos conhecidos atuando em quantidades semelhantes.

O novo fertilizante biológico, de acordo com a presente invenção, em comparação com a mesma quantidade de um fertilizante de acordo com o estado da técnica é, portanto, capaz de produzir uma maior quantidade de IAA. O anteriormente mencionado representa, portanto, uma enorme vantagem comercial e económica.

De acordo com a presente invenção, numa primeira concretização, o IAA pode ser vantajosamente produzido durante o passo de fermentação para a preparação de estirpes, ou diretamente adicionado no final do processo de fermentação das estirpes, antes da adsorção das mesmas no suporte sólido. Como uma alternativa, o IAA pode ser adicionado aos nutrientes antes da adsorção do mesmo no suporte sólido.

De acordo com uma segunda concretização da presente invenção, a formação de IAA pode ser induzida através da adição de triptofano ao meio de cultura durante o passo de fermentação para a preparação de estirpes, permitindo que as mesmas produzam o IAA e obtendo um produto completamente natural. De acordo com este exemplo, o caldo de cultura resultante inclui as estirpes (C₃ ou M₃) e o IAA que foi produzido diretamente pelas estirpes. O caldo pode ser adsorvido diretamente no suporte sólido incluindo o IAA produzido durante a fermentação.

A presente invenção proporciona um processo para produzir fertilizantes biológicos, compreendendo o referido processo os seguintes passos:

- a) Cultura dos micro-organismos C₃ e M₃.
- b) Imobilização em matrizes sólidas.
- c) Secagem.

De acordo com o processo, o passo c) consiste na secagem da matriz sólida. Este passo é o passo principal do método melhorado.

De acordo com o estado da técnica, a secagem em separado de micro-organismos e nutrientes em matrizes sólidas é bem conhecida; as temperaturas de secagem são de 80°C e 200°C, respetivamente. De facto, é necessária uma temperatura alta para reduzir o teor de humidade da matriz sólida, por exemplo, um zeólito. O teor de humidade aceitável tem que estar

compreendido entre 4 e 8%, embora fosse desejável um teor de humidade mais baixo.

De facto, sabe-se que quando um micro-organismo está ligado a uma matriz, quanto mais baixa é a temperatura da corrente do ar de secagem maior a sobrevivência, sendo a temperatura de secagem máxima permitida no presente caso de 80°C uma vez que temperaturas mais elevadas da corrente de secagem induzirem a morte do micro-organismo.

Os limites e as condições acima mencionados de acordo com o estado da técnica, são surpreendentemente superados pelo método descrito de acordo com a presente invenção. A melhoria na secagem é essencialmente baseada no facto de que, na presente invenção, a secagem é realizada num secador em leito fluidizado, o que permite reduzir consideravelmente a temperatura do ar de secagem já que aumenta consideravelmente a área de contacto.

O passo de secagem de acordo com a presente invenção é, portanto, caracterizado por compreender a desidratação do suporte sólido adsorvido com os micro-organismos e/ou nutrientes e sais levada a cabo num secador em leito fluidizado, o que permite reduzir consideravelmente a humidade residual do produto operando a uma temperatura de apenas 35°C.

Breve descrição dos desenhos

A figura 1 mostra os resultados de tratamentos de fertilização em plantas obtidos com o fertilizante biológico de acordo com a presente invenção.

Além disso, as figuras 2, 3 e 4 mostram um resumo dos resultados obtidos nos diferentes testes realizados, em termos de peso médio das alfaces e o teor de nitrato nos solos e nas folhas.

Descrição detalhada de uma concretização

Uma descrição do método para obter o objeto de acordo com a presente invenção é explicada em baixo sob a forma de um exemplo.

O secador em leito fluidizado é alimentado com a massa necessária para o seu funcionamento e é operado a uma temperatura do ar máxima de 35°C. O produto será assim

progressivamente seco até atingir uma humidade que irá ser entre 2-5%, de preferivelmente 2-3%, mais preferivelmente 2-2,5%, que é o valor de humidade do produto acabado.

O processo de imobilização e adsorção dos nutrientes num único passo e secagem a temperaturas máximas de 35°C permitiu aumentar a estabilidade e a eficácia do produto, que preserva a sua atividade, sem perdas significativas no armazenamento, durante pelo menos dois anos a temperaturas de até 35°C. A sua atividade estimuladora do crescimento de plantas foi verificada por mais de dois anos, preservando as suas propriedades iniciais. Na sua aplicação no campo, provou ser altamente eficaz para colonizar raízes de diferentes culturas e em diferentes tipos de solos, bem como provou o efeito estimulante do crescimento e o efeito geral de nutrição das plantas nos testes realizados.

Também foi verificado através de testes de campo que este método permite a eliminação de fertilização química e produz um melhoramento considerável na estrutura do solo.

O melhoramento descrito acima relacionado com o método para a produção do fertilizante biológico tem várias vantagens em relação ao processo de acordo com o anterior estado da técnica. Temperaturas e teores de humidade mais baixos tornam o fertilizante mais estável e permitem que ele permaneça ativo por pelo menos dois ou três anos.

O novo método de produção do fertilizante biológico de acordo com a presente invenção proporciona uma solução para os problemas técnicos e industriais acima descritos. Além disso, o referido método de acordo com o passo a) tem uma outra vantagem na utilização como meio de cultura para a produção das estirpes mencionadas de pasta de tomate como fonte de carbono e hidrolisado de colagénio de pele animal para utilização em fertilização como uma fonte de azoto orgânico com o qual são atingidas elevadas contagens celulares em 24-36 horas de fermentação para ambas as estirpes. Além disso, a introdução de L-triptofano no meio de cultura faz com que grandes quantidades de auxinas sejam produzidas durante a fermentação, que mais tarde vão ser passadas para o produto final, conferindo-lhe um efeito adicional de penetração na raiz desde a sua aplicação. O meio de cultura é muito eficaz em termos de custo e, mais importante, são alcançadas elevadas contagens celulares na

ordem de 10^9 - 10^{10} células x mL⁻¹ em ambos os casos. Este meio foi também testado com resultados semelhantes na cultura de estirpes de outros géneros de bactérias e fungos isolados pelos autores.

A presença de L-triptofano no meio de crescimento da fase de fermentação proporciona uma fonte imediata para a produção de IAA pelos micro-organismos C₃ e M₃.

Além disso, de acordo com o presente método, o passo b) tem uma outra vantagem que consiste na imobilização de células, sais e nutrientes na mesma matriz sólida.

Este processo realiza-se simultaneamente e por pulverização do sólido com os caldos de fermentação e as soluções de nutrientes, seguindo um esquema sequencial. A fim de levar a cabo esta fase é usado um misturador de sólidos que tem um acessório que permite pulverizar líquidos enquanto eles são misturados e homogeneizados. O misturador é carregado com zeólito e rocha fosfática e o processo de mistura é realizado durante 5-10 minutos. Em seguida, e mantendo o misturador em movimento, os caldos de células são adicionados por uma ordem sequencial, primeiro M₃ e, em seguida C₃. O processo de adsorção dos nutrientes é efetuado utilizando as seguintes matérias-primas e as proporções quando terminado e com o misturador em movimento, de modo a se obter um sólido molhado homogéneo:

Sal	Concentração	Volume x 100 kg de sólidos
(NH ₄) ₂ SO ₄	550-650 g/L	3,5-4,0 L de solução
K ₂ HPO ₄	500-600 g/L	0,8-1,2 L de solução
Zn(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	100-150 g/L	0,1-0,2 L de solução
MnSO ₄ .H ₂ O	100-150 g/L	0,1-0,2 L de solução
CuSO ₄ .5H ₂ O	10-40 g/L	0,03-0,06 L de solução
FeSO ₄ .7H ₂ O	10-40 g/L	0,03-0,06 L de solução

Sem parar o misturador, cada uma das soluções acima descritas é pulverizada sequencialmente e pela mesma ordem em que são descritas. Mistura-se bem durante 15-30 minutos, a fim de se obter um sólido molhado homogéneo.

Este novo passo melhorado reduz o tempo do processo e permite a obtenção de uma matriz sólida contendo os componentes da invenção. Esta vantagem é muito importante, uma vez que o suporte sólido pode ser sujeito a um passo de secagem único,

evitando assim a necessidade de realizar pelo menos três passos diferentes de secagem para diferentes suportes sólidos com diferentes componentes.

A principal vantagem do método para obter o produto de acordo com a presente invenção é o novo passo de secagem. O referido novo passo de secagem pode ser levado a cabo em suportes sólidos de acordo com o anterior estado da técnica, e também em suportes sólidos obtidos de acordo com um novo aspeto, ou seja, a possibilidade de imobilizar ambas as estirpes C_3 e M_3 , bem como os nutrientes e qualquer outro componente na matriz sólida, ao mesmo tempo e num passo único do processo.

Portanto, de acordo com a presente invenção, o fertilizante biológico pode ser produzido de acordo com qualquer processo aqui descrito, e o novo processo pode ser utilizado para produzir qualquer produto do tipo descrito acima.

Secção experimental

Os exemplos seguintes servem para ilustrar os princípios e metodologias através dos quais todos os fertilizantes biológicos são obtidos. Estes exemplos servem para ilustrar os princípios e metodologias da presente invenção, mas não limitam o seu âmbito.

Exemplo 1: Propagação de estirpes M_3 de *Azospirillum brasilense* e C_3 de *Pantoea dispersa*

Uma bolha do isolado preservado da estirpe M_3 é colhida, é semeada em placas de meio vermelho do Congo (Rodriguez Cáceres, 1982) e é incubada a 30°C durante 72 horas, a fim de verificar a sua pureza. Um inóculo é preparado a partir desta placa para o fermentador, sendo uma porção da cultura recolhida com uma ansa, 3 frascos Erlenmeyer de 2000 ml são cada um inoculados com 750 ml de meio de tomate sem L-triptofano e são incubados sob agitação a 30°C durante 14-16 horas. Após este tempo, o conteúdo do frasco, que está em fase exponencial, é inoculado num fermentador de 30L Braun Biotech BIOSTAT® C com 18L de meio de tomate sem L-triptofano. É cultivado durante 8-10 horas e quando atinge uma concentração de células elevada e está ainda em fase exponencial, é inoculado num fermentador de 300 L Braun Biotech BIOSTAT® D com 200 L de meio de tomate. A fermentação é levada a cabo durante 24-36 horas a uma velocidade de agitação

de 200 rpm, e com um arejamento de $50 \text{ L} \times \text{min}^{-1}$ (0,25 vvm) e a uma temperatura de 30°C . O pH é deixado variar livremente e no final tinha um valor de 6,5. Foi alcançada uma concentração de $9,4 \times 10^9$ células $\times \text{mL}^{-1}$ e a concentração final de IAA foi de $120 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$. A taxa de crescimento específica em fase exponencial () foi de $0,28 \text{ h}^{-1}$.

Como ilustrado acima, a estirpe C₃ seguiu o mesmo esquema de fermentação. A pureza da cultura foi verificada em meio MacConkey (Oxoid 1981) e o inóculo foi incubado num agitador orbital durante 12 horas. A cultura foi levada a cabo no fermentador BIOSTAT® D durante 24-36 horas a uma velocidade de agitação de 300 rpm e arejamento de $100 \text{ L} \times \text{min}^{-1}$ (0,5 vvm) e a uma temperatura de 30°C . O pH também é deixado a variar livremente e no final tinha um valor de 6,7. Foi alcançada uma concentração de $1,12 \times 10^{10}$ células $\times \text{mL}^{-1}$ e a concentração final de IAA foi de $50 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$. A taxa específica de crescimento na fase exponencial para esta estirpe foi $= 0,52 \text{ h}^{-1}$.

Meio de tomate:

Componente	g
Pasta de tomate	36,00
K ₂ HPO ₄	3,30
KH ₂ PO ₄	3,75
NH ₄ CL	0,84
Hidrolisado de colagénio	5,00
Extratos de levedura	0,75
Triptofano	0,2
H ₂ O _(qs) pH = 7,0	1 L

Esterilização a 121°C durante 30 minutos

Exemplo 2: Imobilização celular e carregamento de nutrientes

É usado misturador de arado que tem um pulverizador para levar a cabo este processo e são usadas as matérias-primas seguintes:

97,5 kg de zeólito
2,5 kg de rocha fosfática

3,6 L de caldo de M₃

3,6 L de caldo de C₃

O misturador é carregado com o zeólito e com a rocha fosfática e o processo de mistura é levado a cabo durante 5 - 10 minutos. Em seguida, e mantendo o misturador em movimento, os caldos de células são pulverizados por uma ordem sequencial, primeiro M₃ e, em seguida, C₃. O processo de adsorção dos nutrientes é levado a cabo utilizando as seguintes matérias-primas e proporções quando terminado e com o misturador em movimento, a fim de se obter um sólido molhado homogêneo:

(NF ₄) ₂ SO ₄	590 g/L	3,83 L de solução
K ₂ HPO ₄	550 g/L	1,05 L de solução
Zn(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	122,5 g/L	0,15 L de solução
MnSO ₄ .H ₂ O	120 g/L	0,15 L de solução
CuSO ₄ .5H ₂ O	24 g/L	0,05 L de solução
FeSO ₄ .7H ₂ O	24 g/L	0,05 L de solução

Sem parar o misturador, cada uma das soluções acima descritas é pulverizada sequencialmente e pela mesma ordem em que são descritas, passando uma pequena quantidade de água entre cada nutriente para limpar os canais. Um total de 7,2 L foram adicionados nesta fase. Mistura-se bem durante 15-30 minutos, a fim de se obter um sólido molhado homogêneo.

O zeólito com a rocha fosfática foi humedecido com 14,4 L de líquido total, que foi completamente absorvido sem que houvesse qualquer tipo de líquido em sobra.

Exemplo 3: Secagem

O secador em leito fluidizado é alimentado com a massa necessária para o seu funcionamento e é operado a uma temperatura do ar máxima de 35°C. O produto será assim progressivamente seco até atingir uma humidade final que vai ser entre 2-3%, que é o valor de humidade do produto acabado.

A viabilidade celular deste produto irá ser verificada periodicamente em meio vermelho do Congo (Rodriguez Cáceres, 1982) para *Azospirillum brasilense* M₃ e em meio MacConkey (Oxoid 1981) para *Pantoea dispersa* C₃, verificando-se que mais de 90% da atividade das mesmas é preservada ao longo de mais do que

dois anos de armazenamento a temperaturas não superiores a 35°C. É óbvio que o processo combinado de imobilização e adsorção de nutrientes, permite uma maior saturação do suporte, e a temperatura de secagem de 35°C, que é muito mais baixa no que diz respeito à temperatura de secagem de acordo com o estado da técnica anterior, e que atua muito favoravelmente na sobrevivência das células no processo de armazenagem do produto, permitiram aumentar consideravelmente a eficácia da vida útil do produto, como pode ser visto na figura 1.

Esta figura mostra particularmente que a alface tratada com o fertilizante biológico com mais de dois anos de armazenamento mantém um nível mais elevado de crescimento natural, em comparação com o controlo, que não recebeu qualquer tratamento. A barra cinzenta no gráfico representa o peso fresco das partes verdes das plantas (FWG, em inglês) e a barra preta indica o peso fresco da raiz (FWR, em inglês) de alface resultante de um bioensaio em estufa em vasos e com turfa como substrato. O gráfico de barras mostra que o fertilizante obtido por este método mantém maior estabilidade e atividade por mais de dois anos. Como se pode ver, depois de 2 anos e meio, o produto ainda preservava mais de 90% da sua eficácia.

Exemplo 4: Avaliação das vantagens agrícolas

De forma a mostrar que o produto é mais ativo em comparação com fertilizantes químicos, foram investigadas várias condições experimentais. Por exemplo, diferentes culturas foram testadas em condições de campo e os resultados obtidos foram muito satisfatórios. A cultura de alface, em particular, foi testada em condições de campo para avaliar a variabilidade entre os solos, variedades e sistemas de irrigação.

Em todos estes ensaios, a fertilização química foi completamente substituída, obtendo-se excelentes resultados em termos de colheita da cultura e em termos de teor de nitrato tanto nas folhas como no solo. Os resultados da distribuição de tamanhos das alfaces num dos testes realizados são mostrados na Tabela 1. Como pode ser visto, foi conseguida uma melhor distribuição de tamanhos (tamanhos mais adequados) de interesse comercial com a utilização do produto para fins da colheita da cultura, porque foi conseguida uma proporção de C-9 e C-10 muito maior com o fertilizante do que no cultivo tradicional tratado com fertilização química.

Tabela 1.- Distribuição de tamanhos comercial no teste Águilas.

% DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS		
TAMANHOS	Fertilizante	CULTURA USADA
C-9	16%	28%
C-10	57%	68%
C-12	27%	4%

A Figura 2 mostra os efeitos do tratamento no crescimento da planta, medido como peso médio, em gramas. A barra cinzenta do gráfico representa o fertilizante biológico de acordo com a presente invenção, e a barra preta indica o controlo usado. Observou-se que em determinadas condições experimentais o peso da alface tratada com o fertilizante é superior ou comparável ao da alface tratada com fertilizante químico. De facto, observa-se que apesar de não se usar fertilização química, os resultados obtidos são semelhantes ou até superiores àqueles da cultura usada.

As figuras 3 e 4 mostram uma redução da concentração de nitratos e poluentes ambientais no solo (Figura 3) e nas folhas (Figura 4). É óbvio que a utilização de fertilizante biológico reduz significativamente a presença de nitratos e/ou poluentes tanto no solo como nas folhas em comparação com fertilizantes químicos.

Na Figura 3, pode-se também concluir que a poluição ambiental devido a nitratos, fosfatos e outros fertilizantes químicos é drasticamente reduzida através da utilização deste produto biofertilizante. Uma vez que nenhum tipo de fertilização química é adicionado, o efeito de lavagem destes sais dos solos é praticamente eliminado. O teor de nitrato em folhas (Figura 4) foi, além disso, consideravelmente reduzido, tornando o produto mais saudável.

Lisboa, 2015-11-11

REIVINDICAÇÕES

1. Fertilizante biológico e estimulador de crescimento de plantas consistindo em:

- a.- uma cultura pura de estirpe C₃ da espécie *Pantoea dispersa* depositada na Coleção Espanhola de Culturas Tipo (CECT) com número CECT 5801,
- b.- uma cultura pura da estirpe M₃ da espécie *Azospirillum brasilense* depositada na CECT com o número CECT 5802, e
- c.- ácido indolo-3-acético (IAA), ou um promotor de ácido indolo-3-acético selecionado, como L-triptofano.

2. Fertilizante biológico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a referida estirpe referida como C₃ ser capaz de produzir ácido indolo-3-acético em meio de tomate em concentrações da ordem de 80-120 mg x L⁻¹.

3. Fertilizante biológico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as referidas estirpes C₃, M₃ e o referido ácido indolo-3-acético estarem imobilizados num suporte sólido, selecionado do grupo compreendendo argila, vermiculite, perlite, sepiolite, caulino, terra de diatomáceas e zeólitos naturais.

4. Fertilizante biológico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender uma concentração de ácido indolo-3-acético da ordem de 50-120 mg x kg⁻¹ de produto.

5. Fertilizante biológico de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por os referidos zeólitos naturais terem sido carregados com sais e terem a seguinte composição: azoto total (NH₄⁺): 0,3-0,5%, potássio (K₂O): 0,10-0,25%, fósforo (P₂O₅): 0,50-0,75%, zinco (Zn²⁺): 85-110 ppm, ferro (Fe²⁺): 600-800 ppm, manganês (Mn²⁺): 250-300 ppm e cobre (Cu²⁺): 10-20 ppm.

6. Fertilizante biológico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se comportar como um sistema de libertação lenta para libertar células, nutrientes e outras substâncias.

7. Fertilizante biológico de acordo a reivindicação 1, caracterizado por ter um teor de humidade compreendido entre 2-5%.

8. Fertilizante biológico de acordo a reivindicação 7, caracterizado por ter um teor de humidade compreendido entre 2-2,5%.

9. Método para obter um fertilizante biológico de acordo com as reivindicações 1-8, caracterizado por compreender a obtenção das estirpes através da cultura de estirpes C₃ e M₃ através de um processo de fermentação imersa num meio de cultura compreendendo uma fonte de carbono e uma fonte de azoto orgânico contendo triptofano.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por compreender o passo de imobilização celular e carregamento de nutrientes num suporte sólido, que são levados a cabo em simultâneo e por pulverização do sólido com os caldos de fermentação e as soluções de nutrientes, seguindo um esquema sequencial, misturando continuamente para obter um sólido molhado homogéneo.

11. Método de acordo com a reivindicação 9 caracterizado por a referida fonte de carbono ser pasta de tomate concentrada a 3-5% em volume em relação ao volume total da cultura, a referida fonte de azoto ser hidrolisado de colagénio de pele animal a 0,2 - 1% em volume em relação ao volume total da cultura, em que são atingidas concentrações de células de 10⁹-10¹⁰ células/mL e uma concentração de ácido indolo-3-acético não inferior a 50 mg x L⁻¹ e por o referido ácido indolo-3-acético ser adicionado durante e/ou após o passo de fermentação.

12. Método para a preparação e a produção de um fertilizante biológico, de acordo com a reivindicação 1, compreendendo os passos de cultura das referidas estirpes, sua imobilização em matrizes sólidas e secagem das referidas matrizes, em que o referido passo de secagem é levado a cabo num secador em leito fluidizado a uma temperatura inferior a 35°C, com secagem e fluxo de ar contínuos, obtendo-se o referido fertilizante biológico com um teor de humidade entre 2 - 5%.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por o referido passo de cultura das referidas estirpes

compreender a fermentação das estirpes referidas num meio de crescimento com L-triptofano adicionado.

Lisboa, 2015-11-11

Figura 1 - Teste de estabilidade do produto à temperatura ambiente

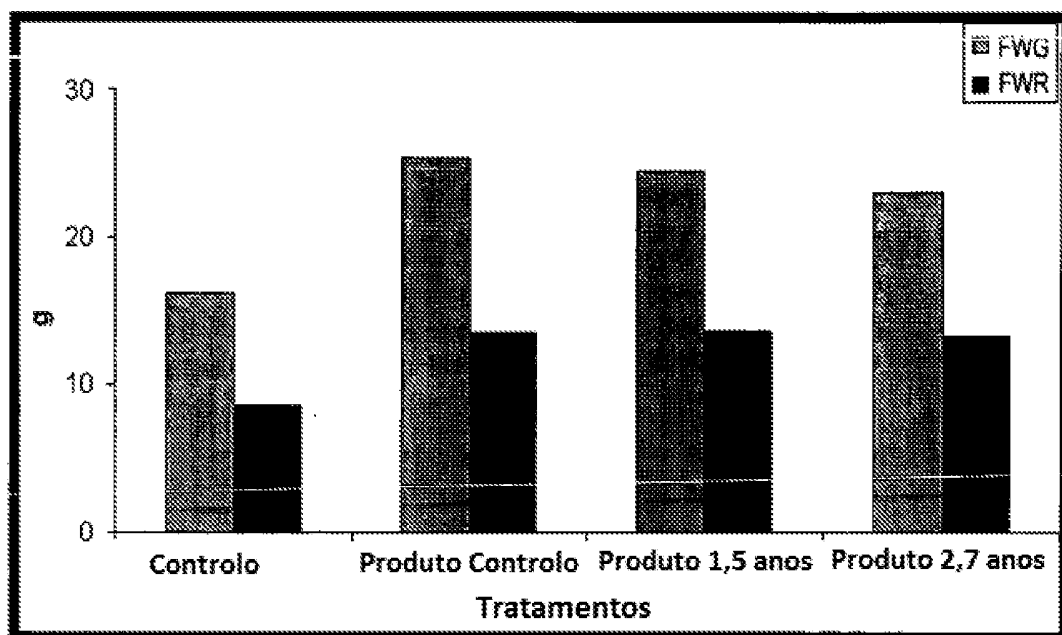


Figura 2 - Peso médio da alface em cada um dos testes efetuados

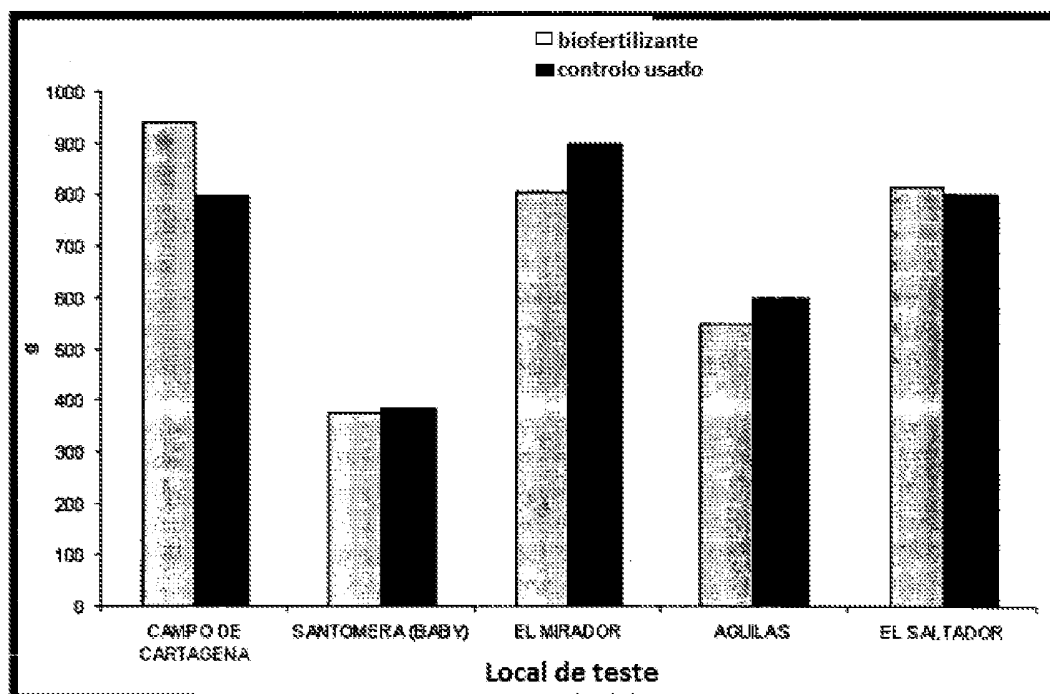


Figura 3- Quantidade de nitratos no solo depois de terminada a colheita da cultura

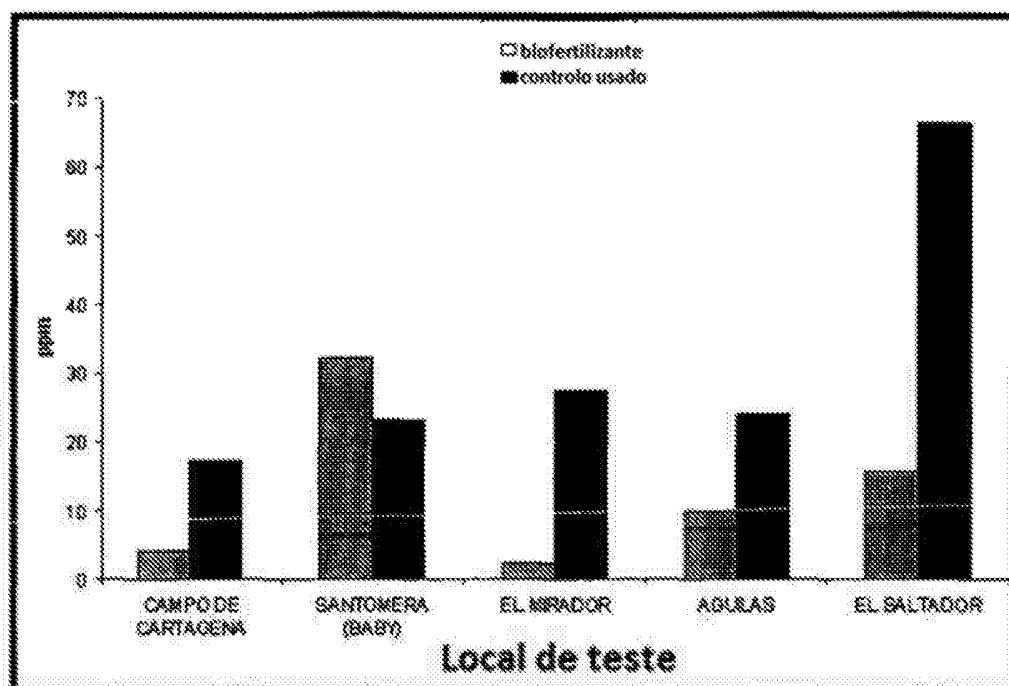


Figura 4- Teor de nitrato na folha no momento da colheita

