

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 857 561**

51 Int. Cl.:

A01N 63/20	(2010.01)
A01N 25/32	(2006.01)
A01N 47/00	(2006.01)
A01P 21/00	(2006.01)
A01C 1/06	(2006.01)
C12N 1/04	(2006.01)
A01C 1/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2014 PCT/US2014/031952**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14160827**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2014 E 14776165 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2020 EP 2978300**

54 Título: **Composiciones y métodos para mejorar la estabilidad microbiana**

30 Prioridad:

28.03.2013 US 201361806093 P

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

29.09.2021

73 Titular/es:

NOVOZYMES BIOAG A/S (50.0%)
Krogshoejvej 36
2880 Bagsvaerd, DK y
NOVOZYMES BIOLOGICALS, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

DEMARES, DIEGO OMAR;
OLIVIERI, FLORENCIA y
GUTKIND, GABRIEL OSVALDO

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 857 561 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

Composiciones y métodos para mejorar la estabilidad microbiana

CAMPO

5 [0001] Composiciones y métodos para mejorar la estabilidad de los microorganismos, particularmente cuando los microorganismos se aplican a semillas.

ANTECEDENTES

10 [0002] El crecimiento de las plantas depende al menos en parte de las interacciones entre la planta y los microorganismos que habitan en la tierra circundante. Por ejemplo, la simbiosis entre las bacterias gramnegativas del suelo, Rhizobiaceae y Bradyrhizobiaceae, y las leguminosas como la soja está bien documentada. La base bioquímica para estas relaciones incluye un intercambio de señalización molecular, donde los compuestos de señalización de plantas a bacterias incluyen flavonas, isoflavonas y flavanonas, y los compuestos de señalización de bacterias a plantas, que incluyen los productos finales de la expresión de los genes nod de bradirrizobios y rizobios, conocidos como lipoquitooligosacáridos (LCO). La simbiosis entre estas bacterias y las leguminosas permite que la leguminosa fije nitrógeno atmosférico para el crecimiento de las plantas, obviando así la necesidad de fertilizantes de nitrógeno. Ya que los fertilizantes de nitrógeno pueden aumentar significativamente el coste de los cultivos y se asocian con una serie de efectos contaminantes, la industria agrícola continúa sus esfuerzos para explotar esta relación biológica y desarrollar nuevos agentes y métodos para mejorar el rendimiento de las plantas sin aumentar el uso de fertilizantes a base de nitrógeno.

20 [0003] Otra asociación simbiótica conocida y bien estudiada entre las plantas y los microorganismos del suelo implica hongos micorrícicos arbusculares (MA). Este grupo de hongos, al que recientemente se le ha dado el nuevo nombre de *Glomeromycota*, está distribuido ampliamente por todo el reino vegetal, incluidas angiospermas, gimnospermas, pteridofitas y algunas briófitas (Smith y Read, 2008). Entre las angiospermas, al menos un 80 % de las especies pueden formar simbiosis MA, donde las únicas principales excepciones son *Brassicaceae* y *Chenopodiaceae*. Los hongos micorrícicos arbusculares son capaces de transferir nutrientes minerales raramente o poco solubles como fósforo, zinc y cobre del suelo a la planta, que a su vez proporciona carbohidratos al hongo. Este intercambio de nutrientes puede ser de importancia crítica cuando la fertilidad del suelo y la disponibilidad de agua son bajas, condiciones que limitan gravemente la producción agrícola en la mayoría de partes del mundo (Smith, et al., *Mycorrhizal symbiosis*. 787 págs., Academic Press. (2008)).

30 [0004] Además de las relaciones simbióticas con los microorganismos, el crecimiento sano requiere que las plantas extraigan una variedad de elementos como fósforo y micronutrientes (cobre, hierro, zinc, etc.) del suelo. Los suelos pueden ser a menudo deficitarios en estos elementos o contener formas de los elementos que no pueden ser asimilados fácilmente por la planta. Los fertilizantes se aplican típicamente a los suelos para aumentar la cantidad de fósforo para su absorción por la planta. Sin embargo, la gran mayoría del fósforo aplicado se convierte rápidamente en formas que no pueden ser utilizadas por la planta. Se han aplicado al suelo varias cepas fúngicas de *Penicillium* (por ejemplo, *P. bilaiae*) y *Rhizobium* spp. para facilitar la absorción de fósforo por la planta. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses 5,026,417 y 5,484,464 y la publicación de solicitud de patente estadounidense 2010/0099560.

40 [0005] Se siguen realizando esfuerzos para explotar estos tipos de relaciones entre las plantas y los microorganismos con el objetivo de aumentar el crecimiento y el rendimiento de las plantas. Uno de dichos esfuerzos se halla en el campo de los inoculantes, donde se están dedicando esfuerzos específicos para mejorar las tecnologías de inoculación "sobre las semillas" y, en particular, para mejorar la supervivencia de los inoculantes una vez se han aplicado a una semilla. Una de tales causas responsables de la baja supervivencia de los inoculantes incluye, entre otras cosas, la presencia de compuestos incompatibles existentes en los tratamientos de semillas. Dichos compuestos pueden incluir conservantes u otros biocidas usados en los ingredientes de tratamiento de semillas.

[0006] La patente estadounidense n.º: 4,149,869 divulga semillas recubiertas con una mezcla que contiene una sal de caseinato y bacterias rizobiales viables.

[0007] La publicación de solicitud de patente EP n.º: 0454291 divulga un proceso para producir un inoculante *Rhizobium* mejorado.

[0008] La patente estadounidense n.º: 5,106,648 divulga un método para recubrir semillas, sin embargo, la divulgación declara que es necesario usar cepas rizobiales que sean resistentes a fungicidas para permitir que las semillas sean recubiertas con fungicidas al mismo tiempo.

5 [0009] La publicación de solicitud de patente estadounidense n.º: 2008/0132411 divulga un método para mejorar la supervivencia y la viabilidad de inoculantes de microorganismos sobre las semillas que comprende el paso de recubrir las semillas con una mezcla que comprende un carbohidrato, un alcohol de azúcar y microorganismos.

10 [0010] La publicación de solicitud de patente estadounidense n.º: 2012/0208699 divulga métodos y composiciones para reducir la unión de las semillas tratadas, incluidos algunos que mejoran también la supervivencia de cualquiera de los microorganismos beneficiosos incluidos en la composición o mezclados con la misma y/o mejoran el rendimiento de las plantas que crecen de la semilla a la que se le aplica el tratamiento.

[0011] La publicación de solicitud de patente n.º: WO 1994/06732 divulga un método de obtención de una formulación de inoculante en polvo humectable para su uso con plantas de cultivo leguminosas.

15 [0012] La publicación de solicitud de patente n.º: WO 2006/071369 divulga un método para producir un inoculante líquido que contiene un desecante, donde el método puede mejorar la supervivencia y la estabilidad de las bacterias en inoculantes líquidos en paquete y sobre las semillas.

[0013] Dey, B.P., Engley Jr., F. B. (1994). Neutralization of antimicrobial chemicals by recovery media. J. Microbiol. Methods. 19: 51-58 (divulga la capacidad para neutralizar una variedad de agentes antimicrobianos usando un medio de neutralización para recuperar la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6532 de superficies de baldosas expuestas a un fenol comercial y un compuesto de amonio cuaternario).

20 [0014] Sin embargo, sigue habiendo una necesidad de composiciones y métodos que puedan mejorar la supervivencia de los microorganismos cuando se usan compuestos que no son compatibles con inoculantes microbianos como parte de un tratamiento de semillas.

RESUMEN

25 [0015] Se describe en la presente un método para aumentar la supervivencia de uno o más microorganismos fijadores de nitrógeno en una composición de tratamiento de semillas, que comprende la adición a una composición de tratamiento de semillas de uno o más compuestos de estabilización microbiana seleccionados del grupo que consiste en extracto de levadura, peptonas y aminoácidos para inhibir la actividad antimicrobiana del bencilhemiformal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

30 [0016] Las formas de realización descritas se refieren a composiciones y métodos para mejorar el crecimiento de las plantas.

Definiciones:

[0017] Como se utiliza en la presente, las formas singulares "uno", "una", "el" y "la" están destinadas a incluir también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

35 [0018] Como se utiliza en la presente, "compuesto(s) de estabilización microbiana" significa cualquier compuesto capaz de mantener y/o aumentar la viabilidad, la supervivencia y/o UFC de uno o más microbios. Como se utiliza en la presente un "compuesto(s) de estabilización microbiana" está destinado además a significar cualquier compuesto capaz de prevenir y/o disminuir la cantidad de muerte y/o tasa de mortalidad de uno o más microbios.

40 [0019] Como se utiliza en la presente, el término "sustrato lácteo" significa la leche de un animal, así como componentes de la leche (por ejemplo, nata) y combinaciones de leche y nata (por ejemplo, mitad y mitad). Como se utiliza en la presente, el término "leche" significa leche entera producida por un animal, así como formas procesadas de la misma. De hecho, cualquier forma adecuada de leche se puede usar en las presentes formas de realización, incluida leche que incluye o no incluye lactosuero, así como leche entera, leche cruda, leche desnatada, leche evaporada, leche reconstituida, leche condensada, leche pasteurizada, no pasteurizada,
45 homogeneizada, no homogeneizada o leche en polvo rehidratada.

[0020] Como se utiliza en la presente, el término "urea" significa un compuesto orgánico con la fórmula química NH_2CONH_2 , así como sus isómeros, sales, solvatos y derivados.

5 [0021] Como se utiliza en la presente, el término "aminoácido" significa aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de modo similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Aminoácido también se refiere a poli(aminoácido) como péptidos, polipéptido y proteínas.

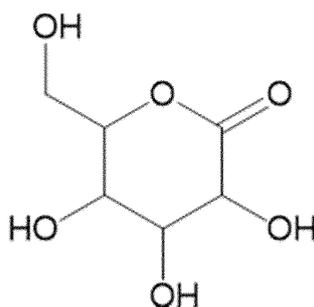
10 [0022] "Análogos de aminoácidos" significa compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R. Los ejemplos de análogos de aminoácidos incluyen, pero de forma no limitativa, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metilsulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural.

15 [0023] Los "aminoácidos no naturales" no están codificados por el código genético y pueden, pero no necesariamente, tener la misma estructura básica que un aminoácido de origen natural. Los aminoácidos no naturales incluyen, pero de forma no limitativa, ácido azetidincarboxílico, ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido aminopropiónico, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, butilglicina terciaria, ácido 2,4-diaminoisobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, N-etilglicina, N-etilasparagina, homoprolina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilalanina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, N-metilpentilglicina, N-metilvalina, naftalanina, norvalina, ornitina, pentilglicina, ácido piperólico y tioprolina.

25 [0024] "Miméticos de aminoácidos" significa compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de modo similar a un aminoácido de origen natural.

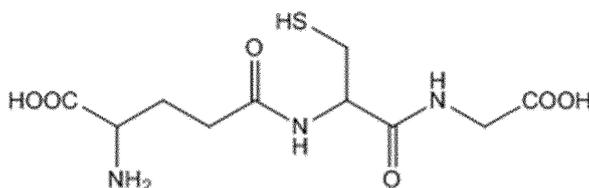
[0025] En la presente se puede hacer referencia a los aminoácidos por los símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una sola letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Asimismo, se puede hacer referencia a los nucleótidos por sus códigos de letra única comúnmente aceptados.

30 [0026] Como se utiliza en la presente, el término "gluconolactona" significa moléculas que tienen la fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6$, una masa molar de aproximadamente $178,14 \text{ g mol}^{-1}$ y la estructura



e incluye sus isómeros, sales y solvatos.

35 [0027] Como se utiliza en la presente, el término "glutatión" significa moléculas que tienen la fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$, una masa molar de aproximadamente $307,32 \text{ g mol}^{-1}$ y la estructura



e incluye sus isómeros, sales y solvatos.

[0028] Como se utiliza en la presente, el término "lecitina" significa una mezcla de fosfátidos. El término lecitina como se utiliza en la presente sin un adjetivo modificador puede referirse a una o a las dos formas, acilada y no acilada, de la lecitina.

5 [0029] Como se utiliza en la presente, el término "polisorbato" significa ésteres de oleato de sorbitol y sus anhídridos, típicamente copolimerizados con óxido de etileno.

[0030] Como se utiliza en la presente, el término "albúmina" se usa de forma intercambiable con "albúmina de suero" y no está destinado a definir la fuente de la albúmina. El término "albúmina" como se utiliza en la presente incluye cualquiera de los derivados de la albúmina o versiones modificadas de la albúmina. Así, el término
10 "albúmina" como se utiliza en la presente puede referirse a albúmina purificada a partir de una fuente natural tal como la sangre o los fluidos serosos, o puede referirse a albúmina sintetizada químicamente o producida por recombinación o variantes de la albúmina o derivados de albúminas nativas.

[0031] Como se utiliza en la presente, "estable" es un término que se conoce en la técnica y, en un aspecto, estable
15 significa la capacidad del microorganismo para permanecer en una forma viable hasta que se aplica como se describe en la presente (por ejemplo, a una planta y/o una parte de una planta, para mejorar el crecimiento de una planta y/o una parte de una planta, mejorar la germinación de semillas, mejorar la emergencia de plántulas, mejorar la fijación de nitrógeno, mejorar la solubilización de fosfatos, etc.).

[0032] Como se utiliza en la presente, el término "ingrediente(s) beneficioso(s) para la agricultura" significa
20 cualquier agente o combinación de agentes capaces de causar o proporcionar un efecto beneficioso y/o útil en la agricultura.

[0033] Como se utiliza en la presente, "ingrediente(s) biológicamente activo(s)" significa ingredientes biológicamente activos (por ejemplo, moléculas de señalización de plantas, otros microorganismos, etc.) distintos del compuesto estabilizante bacteriano descrito en la presente.

[0034] Como se utiliza en la presente, los términos "molécula(s) de señalización" o "molécula(s) de señalización
25 de plantas", que se pueden usar de forma intercambiable con "agente(s) de mejora del crecimiento de plantas", significa, en términos generales, cualquier agente, tanto de origen natural en plantas o microbios, como sintéticos (y que pueden ser de origen no natural), que directa o indirectamente activa o inactiva una vía bioquímica de plantas, dando como resultado el crecimiento de plantas aumentado o mejorado, en comparación con plantas no tratadas o plantas cosechadas a partir de semillas no tratadas.

[0035] Como se utiliza en la presente, los términos "cantidad eficaz", "concentración eficaz" o "dosificación eficaz"
30 significa la cantidad, concentración o dosificación del uno o más compuestos de estabilización microbiana suficiente para inhibir la actividad antimicrobiana de uno o más compuestos. La dosificación eficaz real en valor absoluto depende de los factores, incluidos, pero de forma no limitativa, la cantidad (por ejemplo, la concentración, el volumen, de compuesto antimicrobiano, etc.) de compuesto antimicrobiano que se va a inhibir, interacciones
35 sinérgicas o antagonistas entre los otros ingredientes activos o inertes que puedan aumentar o reducir los efectos/la actividad de inhibición antimicrobiana del uno o más compuestos de estabilización microbiana, y la estabilidad del uno o más compuestos de estabilización microbiana en composiciones y/o como tratamientos de plantas o partes de planta. La "cantidad eficaz", "concentración eficaz" o "dosificación eficaz" del uno o más compuestos de estabilización microbiana puede determinarse, por ejemplo, por un experimento de respuesta a la
40 dosis rutinario.

[0036] Como se utiliza en la presente, el término "portador" significa un "portador agronómicamente aceptable". Un "portador agronómicamente aceptable" significa cualquier material que se pueda usar para suministrar los
45 activos (por ejemplo, los compuestos de estabilización microbiana descritos en la presente, ingrediente(s) beneficioso(s) para la agricultura, ingrediente(s) biológicamente activo(s), etc.) a una planta o una parte de una planta (por ejemplo, una semilla), y preferiblemente dicho portador se puede aplicar (a la planta, parte de una planta (por ejemplo, una semilla) o el suelo) sin tener un efecto adverso sobre el crecimiento de la planta, la estructura del suelo, el drenaje del suelo o similares.

[0037] Como se utiliza en la presente, el término "nutriente(s)" significa cualquier nutriente (por ejemplo, vitaminas,
50 macrominerales, micronutrientes, oligoelementos, ácidos orgánicos, etc.) que son necesarios para el crecimiento de las plantas, la salud de las plantas y/o el desarrollo de las plantas.

- [0038] Como se utiliza en la presente, el término "bioestimulante(s)" significa cualquier agente o combinación de agentes capaz de mejorar los procesos metabólicos o fisiológicos en las plantas y los suelos.
- 5 [0039] Como se utiliza en la presente, el término "herbicida(s)" significa cualquier agente o combinación de agentes capaz de matar malas hierbas y/o inhibir el crecimiento de malas hierbas (siendo la inhibición reversible bajo determinadas condiciones).
- [0040] Como se utiliza en la presente, el término "fungicida(s)" significa cualquier agente o combinación de agentes capaz de matar hongos y/o inhibir el crecimiento fúngico.
- [0041] Como se utiliza en la presente, el término "insecticida(s)" significa cualquier agente o combinación de agentes capaz de matar uno o más insectos y/o inhibir el crecimiento de uno o más insectos.
- 10 [0042] Como se utiliza en la presente, el término "nematicida(s)" significa cualquier agente o combinación de agentes capaz de matar uno o más nematodos y/o inhibir el crecimiento de uno o más nematodos.
- [0043] Como se utiliza en la presente, el término "acaricida(s)" significa cualquier agente o combinación de agentes capaz de matar uno o más ácaros y/o inhibir el crecimiento de uno o más ácaros.
- 15 [0044] Como se utiliza en la presente, el término "crecimiento de plantas mejorado" significa rendimiento de plantas aumentado (por ejemplo, biomasa aumentada, número de frutos aumentado, número de cápsulas aumentado o una combinación de los mismos que se pueda medir por fanegas por acre), número de raíces aumentado, masa de raíces aumentada, volumen de raíces aumentado, área de hoja aumentada, área cultivada aumentada, vigor de las plantas aumentado, emergencia de plántulas más rápida (es decir, emergencia mejorada), germinación más rápida (es decir, germinación mejorada) o combinaciones de los mismos.
- 20 [0045] Como se utiliza en la presente, los términos "planta(s)" y "parte(s) de una planta" significa todas las plantas y poblaciones de plantas tales como las plantas salvajes o las plantas de cultivo deseadas y no deseadas (incluidas las plantas de cultivo de origen natural). Las plantas de cultivo pueden ser plantas que se pueden obtener por métodos convencionales de cultivo y optimización vegetal o por métodos biotecnológicos y de ingeniería genética o por combinaciones de estos métodos, incluidas las plantas transgénicas e incluidas las variedades de cultivo de plantas protegibles o no protegibles por derechos de obtentor. Se debe entender que partes de una planta significa todas las partes y los órganos de las plantas por encima y por debajo del suelo, como brote, hoja, flor y raíz, de 25 las que ejemplos que se pueden mencionar son hojas, agujas, cañas, tallos, flores, cuerpos frutales, frutas, semillas, raíces, tubérculos y rizomas. Las partes de una planta incluyen también material cosechado y material de propagación vegetativa y generativa (por ejemplo, esquejes, tubérculos, rizomas, brotes y semillas, etc.).
- 30 [0046] Como se utiliza en la presente, el término "inóculo" significa cualquier forma de células microbianas, o esporas, que es capaz de propagarse sobre o en el suelo cuando las condiciones de temperatura, humedad, etc. son favorables para el crecimiento microbiano.
- [0047] Como se utiliza en la presente, el término "organismo(s) fijador(es) de nitrógeno" significa cualquier organismo capaz de convertir nitrógeno atmosférico (N_2) en amoníaco (NH_3).
- 35 [0048] Como se utiliza en la presente, el término "organismo solubilizador de fosfato" significa cualquier organismo capaz de convertir fosfato insoluble en una forma de fosfato soluble.
- [0049] Como se utiliza en la presente, el término "espora" tiene su significado normal, que es bien conocido y entendido por aquellas personas expertas en la técnica. Como se utiliza en la presente, el término espora significa un microorganismo en su estado latente y protegido.
- 40 [0050] Como se utiliza en la presente, el término "fuente" de un elemento particular significa un compuesto de ese elemento que, al menos en las condiciones del suelo bajo consideración, no hace que el elemento esté completamente disponible para la absorción de las plantas.

Compuestos de estabilización microbiana

- 45 [0051] Los compuestos de estabilización microbiana descritos en la presente inhiben la actividad del bencilhemiformal.

[0052] El compuesto de estabilización microbiana incluye extracto de levadura. Los extractos de levadura son ampliamente usados, por ejemplo, para dar sabor en las industrias alimentarias, en los medios de fermentación de microorganismos y como alimentos saludables. La producción de extracto de levadura se describe en la bibliografía, véase por ejemplo Kelly, M. (1982) Yeast Extract (en: Industrial Enzymology, Godfrey, T. ed.) o Chae, H. J. et al. (2001), Bioresource Technology 76, 253-258. Se fabrica típicamente descomponiendo la levadura por hidrólisis ácida o rotura mecánica o química de las células seguida de autólisis con enzimas endógenas para degradar las estructuras macromoleculares de la levadura, en particular las proteínas, en la máxima cantidad de material soluble. Posiblemente, se añaden enzimas exógenas, incluidas proteasas como la papaína, para aumentar el efecto de las enzimas propias de la levadura. Después de la hidrólisis enzimática, el extracto de levadura se separa de los restos celulares y posiblemente se pasteuriza y se concentra.

[0053] El compuesto de estabilización microbiana además incluye un aminoácido, un análogo de aminoácido, un aminoácido no natural, un aminoácido mimético o una combinación de los mismos. Se puede hacer referencia a los aminoácidos, tal y como se define en la presente, por los símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una sola letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Asimismo, se puede hacer referencia a los nucleótidos por sus códigos de letra única comúnmente aceptados. En una forma de realización particular, el aminoácido es triptófano.

[0054] El compuesto de estabilización microbiana además incluye una peptona. Los ejemplos no limitativos incluyen peptonas tripticas o de papaína que se pueden usar e incluyen peptonas tripticas derivadas de animales o plantas. En una forma de realización particular, la peptona digerida es de harina de soja. En otra forma de realización, la peptona es una peptona de soja (por ejemplo, peptonas derivadas de harina de soja). En todavía otra forma de realización, la peptona de soja es caldo de soja triptico.

[0055] Así, el compuesto de estabilización microbiana se selecciona del grupo que consiste en extracto de levadura, aminoácidos, peptonas y combinaciones de los mismos.

Portadores

[0056] Las composiciones descritas en la presente pueden comprender además uno o más portadores para suministrar el uno o más compuestos de estabilización microbiana. Los ejemplos no limitativos de portadores descritos en la presente incluyen líquidos, geles, suspensiones acuosas o sólidos (incluidos polvos humectables o polvos secos). La selección del material portador dependerá de la aplicación destinada. El portador puede, por ejemplo, ser un portador compatible con el suelo, un portador compatible con las semillas y/o un portador compatible con las hojas. En una forma de realización particular, el portador es un portador compatible con las semillas.

[0057] En una forma de realización, el portador es un portador líquido. Los ejemplos no limitativos de líquidos útiles como portadores para las composiciones descritas en la presente incluyen agua, una solución acuosa o una solución no acuosa. En una forma de realización particular el portador es agua.

[0058] Si se usa un portador líquido, el portador líquido puede incluir además medios de cultivo para cultivar una o más cepas microbianas usadas en las composiciones descritas. Los ejemplos no limitativos de medios de cultivo adecuados para cepas microbianas incluyen medios YEM, extracto de levadura-manitol, extracto de levadura-glicerol, medio Czapek-Dox, caldo de dextrosa y patata, o cualquier medio conocido por las personas expertas en la técnica que sea compatible con la cepa microbiana que puede incluirse en las composiciones descritas en la presente y/o proporcione nutrientes de crecimiento a la misma.

Ingredientes beneficiosos para la agricultura

[0059] Las composiciones descritas en la presente pueden comprender uno o más ingredientes beneficiosos para la agricultura. Los ejemplos no limitativos de ingredientes beneficiosos para la agricultura incluyen uno o más ingredientes biológicamente activos, nutrientes, bioestimulantes, conservantes, polímeros, agentes humectantes, tensioactivos, herbicidas, fungicidas, insecticidas o combinaciones de los mismos.

Ingrediente(s) biológicamente activo(s):

[0060] Las composiciones descritas en la presente pueden incluir opcionalmente uno o más ingredientes biológicamente activos como se describe en la presente. Los ejemplos no limitativos de ingredientes biológicamente activos incluyen moléculas de señalización de plantas (por ejemplo, lipoquitooligosacáridos (LCO), quitooligosacáridos (CO), flavonoides, compuestos quitinosos, ácido jasmónico o derivados del mismo, ácido linoleico o derivados del mismo, ácido linolénico o derivados del mismo, karrikinas, etc.) y microorganismos

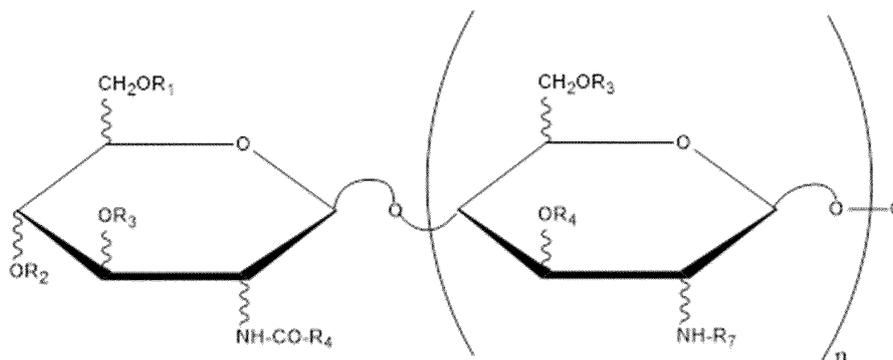
beneficiosos (por ejemplo, *Rhizobium spp.*, *Bradyrhizobium spp.*, *Sinorhizobium spp.*, *Azorhizobium spp.*, *Glomus spp.*, *Gigaspora spp.*, *Hymenoscyphous spp.*, *Oidiodendron spp.*, *Laccaria spp.*, *Pisolithus spp.*, *Rhizopogon spp.*, *Scleroderma spp.*, *Rhizoctonia spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Arthrobacter spp.*, *Arthrobotrys spp.*, *Aspergillus spp.*, *Azospirillum spp.*, *Bacillus spp.*, *Burkholderia spp.*, *Candida spp.*, *Chryseomonas spp.*, *Enterobacter spp.*, *Eupenicillium spp.*, *Exiguobacterium spp.*, *Klebsiella spp.*, *Kluyvera spp.*, *Microbacterium spp.*, *Mucor spp.*, *Paecilomyces spp.*, *Paenibacillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Serratia spp.*, *Stenotrophomonas spp.*, *Streptomyces spp.*, *Streptosporangium spp.*, *Swaminathania spp.*, *Thiobacillus spp.*, *Torulospora spp.*, *Vibrio spp.*, *Xanthobacter spp.*, *Xanthomonas spp.*, etc.).

Molécula(s) de señalización de plantas:

[0061] En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden incluir opcionalmente una o más moléculas de señalización de plantas. En una forma de realización, la una o más moléculas de señalización de plantas son uno o más LCO. En otra forma de realización, la una o más moléculas de señalización de plantas son uno o más CO. En todavía otra forma de realización, la una o más moléculas de señalización de plantas son uno o más compuestos quitinosos. En otra forma de realización, la una o más moléculas de señalización de plantas son uno o más flavonoides. En otra forma de realización, la una o más moléculas de señalización de plantas son uno o más inductores de genes nod no flavonoides (por ejemplo, ácido jasmónico, ácido linoleico, ácido linolénico y derivados de los mismos). En todavía otra forma de realización, la una o más moléculas de señalización de plantas son una o más karrikinas o derivados de las mismas. En todavía otra forma de realización, la una o más moléculas de señalización de plantas son uno o más LCO, uno o más CO, uno o más compuestos quitinosos, uno o más flavonoides, uno o más inductores de genes nod no flavonoides y derivados de los mismos, una o más karrikinas y derivados de las mismas, o cualquier combinación de moléculas de señalización derivada.

LCO:

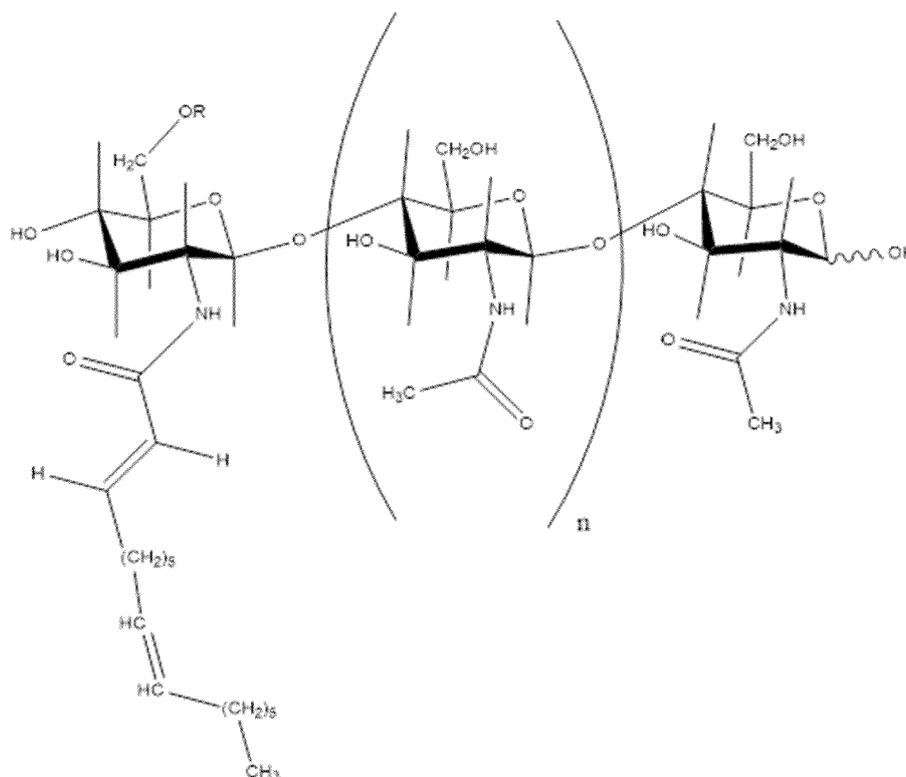
[0062] Compuestos de lipoquitooligosacáridos (LCO), también conocidos en la técnica como señales Nod o factores Nod simbióticos, consisten en un esqueleto de oligosacárido de residuos *N*-acetil-D-glucosamina ("GlcNAc") con enlaces β -1,4 con una cadena de acilo graso con enlace *N*- condensada en el extremo no reductor. Los LCO difieren en el número de residuos de GlcNAc en el esqueleto, en la longitud y el grado de saturación de la cadena de acilo graso, y en las sustituciones de residuos de azúcar reductores y no reductores. Los LCO están destinados a incluir todos los LCO, así como isómeros, sales y solvatos de los mismos. Un ejemplo de un LCO se presenta a continuación como la fórmula I:



donde:

G es una hexosamina que puede ser sustituida, por ejemplo, por un grupo acetilo en el nitrógeno, un grupo sulfato, un grupo acetilo y/o un grupo éter en un oxígeno,
 R_1 , R_2 , R_3 , R_5 , R_6 y R_7 , que pueden ser idénticos o diferentes, representan H, CH_3 CO--, $C_x H_y$ CO--, donde x es un número entero entre 0 y 17 e y es un número entero entre 1 y 35, o cualquier otro grupo de acilo tal como, por ejemplo, un carbamilo,
 R_4 representa una cadena alifática mono-, di-, tri- y tetrainsaturada que contiene al menos 12 átomos de carbono, y n es un número entero entre 1 y 4.

[0063] Los LCO se pueden obtener (aislados y/o purificados) a partir de bacterias como rizobios, por ejemplo, *Rhizobium spp.*, *Bradyrhizobium spp.*, *Sinorhizobium spp.* y *Azorhizobium spp.* La estructura de los LCO es característica para cada una de dichas especies bacterianas, y cada cepa puede producir múltiples LCO con estructuras diferentes. Por ejemplo, se han descrito también LCO específicos de *S. meliloti* en la patente estadounidense 5,549,718 que tienen la fórmula II:



donde R representa H o $\text{CH}_3 \text{CO--}$ y n es igual a 2 o 3.

[0064] LCO aún más específicos incluyen NodRM, NodRM-1, NodRM-3. Cuando se acetilan (el $\text{R}=\text{CH}_3 \text{CO--}$), se vuelven AcNodRM-1 y AcNodRM-3, respectivamente (patente estadounidense 5,545,718).

5 [0065] Se describen LCO de *Bradyrhizobium japonicum* en las Patentes estadounidenses 5,175,149 y 5,321,011. En términos generales, son fitohormonas pentasacáridas que comprenden metilfucosa. Se describen una serie de estos LCO derivados de *B. japonicum*: BjNod-V ($\text{C}_{18:1}$); BjNod-V (Ac, $\text{C}_{18:1}$); BjNod-V ($\text{C}_{16:1}$); y BjNod-V (Ac, $\text{C}_{16:0}$), donde "V" indica la presencia de cinco N-acetilglucosaminas; "Ac" una acetilación; el número después de la "C" indica el número de carbonos en la cadena lateral de ácido graso; y el número después de ":", el número de enlaces dobles.

[0066] Los LCO usados en composiciones de la divulgación se pueden obtener (es decir, aislar y/o purificar) a partir de cepas bacterianas que producen LCO, tales como cepas de *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* (incluyendo *B. japonicum*), *Mesorhizobium*, *Rhizobium* (incluyendo *R. leguminosarum*), *Sinorhizobium* (incluyendo *S. meliloti*), y cepas bacterianas genéticamente modificadas para producir LCO.

15 [0067] La presente descripción también abarca las composiciones que usan LCO obtenidos (es decir, aislados y/o purificados) a partir de un hongo micorrízico, tales como hongos del grupo *Glomerocycota*, por ejemplo, *Glomus intraradicus*. Las estructuras de los LCO representativos obtenidos a partir de estos hongos se describen en la WO 2010/049751 (también se hace referencia a los LCO descritos en la misma como "factores Myc").

20 [0068] Las composiciones de la presente descripción abarcan además el uso de compuestos de LCO sintéticos, tales como los descritos en la WO 2005/063784, y LCO recombinantes producidos a través de ingeniería genética. La estructura básica de origen natural de los LCO puede contener modificaciones o sustituciones encontradas en los LCO de origen natural, tales como las descritas en Spaink, Crit. Rev. Plant Sci. 54:257-288 (2000) y D'Haese, et al., Glycobiology 12:79R-105R (2002). Las moléculas de oligosacáridos precursores (CO, que como se describe a continuación, son también útiles como moléculas de señalización de plantas en la presente descripción) para la construcción de LCO también pueden ser sintetizadas por organismos genéticamente modificados, por ejemplo, como en Samain, et al., Carb. Res. 302:35-42 (1997); Samain, et al., J. Biotechnol. 72:33-47 (1999).

[0069] Los LCO se pueden utilizar en varias formas de pureza y se pueden usar solos o en forma de un cultivo de bacterias u hongos productores de LCO. Los métodos para proporcionar LCO sustancialmente puros incluyen simplemente eliminar las células microbianas de una mezcla de LCO y el microbio, o continuar aislando y

purificando las moléculas de LCO a través de la separación de fase solvente de LCO seguida de una cromatografía HPLC como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense 5,549,718. La purificación se puede mejorar por HPLC repetida, y las moléculas de LCO purificadas se pueden liofilizar para su almacenamiento a largo plazo.

CO:

5 [0070] Los quitooligosacáridos (CO) se conocen en la técnica como estructuras de N actil glucosamina con enlaces β -1-4 identificadas como oligómeros de quitina, también como N-acetilquitooligosacáridos. Los CO tienen decoraciones de las cadenas laterales únicas y diferentes que los hacen diferentes de las moléculas de quitina [(C₈H₁₃NO₅)_n, CAS n.º 1398-61-4] y las moléculas de quitosano [(C₅H₁₁NO₄)_n, CAS n.º 9012-76-4]. La bibliografía representativa que describe la estructura y la producción de los CO es la siguiente: Van der Holst, et al., *Current Opinion in Structural Biology*, 11:608-616 (2001); Robina, et al., *Tetrahedron* 58:521-530 (2002); Hanel, et al., *Planta* 232:787-806 (2010); Rouge, et al. Chapter 27, "The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates" en *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer Science; Wan, et al., *Plant Cell* 21:1053-69 (2009); PCT/F100/00803 (9/21/2000); y Demont-Caulet, et al., *Plant Physiol.* 120(1):83-92 (1999). Los CO pueden ser sintéticos o recombinantes. Se conocen en la técnica métodos para la preparación de CO recombinantes. Véanse, por ejemplo, Samain, et al. (*supra.*); Cottaz, et al., *Meth. Eng.* 7(4):311-7 (2005) y Samain, et al., *J. Biotechnol.* 72:33-47 (1999). Los CO están destinados a incluir isómeros, sales y solvatos de los mismos.

Compuestos quitinosos:

20 [0071] Las quitinas y los quitosanos, que son componentes principales de las paredes celulares de los hongos y los exoesqueletos de los insectos y los crustáceos, están también compuestos por residuos de GlcNAc. Los compuestos quitinosos incluyen quitina, (IUPAC: N-[5-[[3-acetilamino-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2il]metoximetil]-2-[[5-acetilamino-4,6-dihidroxi-2-(hidroximetil)oxan-3-il]metoximetil]-4-hidroxi-6-(hidroximetil)oxan-3-is]jetanamida), quitosano, (IUPAC: 5-amino-6-[5-amino-6-[5-amino-4,6-dihidroxi-2(hidroximetil)oxan-3-il]oxi-4-hidroxi-2-(hidroximetil)oxan-3-il]oxi-2(hidroximetil)oxano-3,4-diol), e isómeros, sales y solvatos de los mismos.

25 [0072] Estos compuestos se pueden obtener comercialmente, por ejemplo, de Sigma-Aldrich, o preparar a partir de insectos, cáscaras de crustáceos o paredes celulares fúngicas. Los métodos para la preparación de quitina y quitosano se conocen en la técnica y se han descrito, por ejemplo, en la patente estadounidense 4,536,207 (preparación a partir de cáscaras de crustáceos), Pochanavanich, et al., *Let. Appl. Microbiol.* 35:17-21 (2002) (preparación a partir de paredes celulares fúngicas) y la patente estadounidense 5,965,545 (preparación a partir de cáscaras de cangrejos e hidrólisis de quitosano comercial). Se pueden obtener quitinas y quitosanos desacetilados que varían desde menos del 35 % hasta más del 90 % de desacetilación y cubren un amplio espectro de pesos moleculares, por ejemplo, oligómeros de quitosano de bajo peso molecular inferior a 15 kD y oligómeros de quitina de 0,5 a 2 kD; quitosano de "calidad práctica" con un peso molecular de aproximadamente 15 kD; y quitosano de alto peso molecular de hasta 70 kD. También están disponibles comercialmente composiciones de quitina y quitosano formuladas para el tratamiento de semillas. Los productos comerciales incluyen, por ejemplo, ELEXA® (Plant Defense Boosters, Inc.) y BEYOND™ (Agrihouse, Inc.).

Flavonoides:

40 [0073] Los flavonoides son compuestos fenólicos que tienen la estructura general de dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos. Los flavonoides son producidos por las plantas y tienen muchas funciones, por ejemplo, como moléculas de señalización beneficiosas y como protección contra insectos, animales, hongos y bacterias. Las clases de flavonoides se conocen en la técnica. Véanse, Jain, et al., *J. Plant Biochem. & Biotechnol.* 11:1-10 (2002); Shaw, et al., *Environmental Microbiol.* 11:1867-80 (2006). Hay compuestos flavonoides comercialmente disponibles, por ejemplo, de Novozymes BioAg, Saskatoon, Canadá; Natland International Corp., Research Triangle Park, NC; MP Biomedicals, Irvine, CA; LC Laboratories, Woburn MA. Los compuestos flavonoides se pueden aislar de plantas o semillas, por ejemplo, como se describe en las patentes estadounidenses 5,702,752; 5,990,291; y 6,146,668. Los compuestos flavonoides también pueden ser producidos por organismos genéticamente modificados, tales como la levadura, como se describe en Ralston, et al., *Plant Physiology* 137:1375-88 (2005). Los compuestos flavonoides están destinados a incluir todos los compuestos flavonoides, así como isómeros, sales y solvatos de los mismos.

50 [0074] El uno o más flavonoides pueden ser un flavonoide natural (es decir, no producido sintéticamente), un flavonoide sintético (por ejemplo, un flavonoide químicamente sintetizado) o una combinación de los mismos. En una forma de realización particular, las composiciones descritas en la presente comprenden un flavanol, una flavona, una antocianidina, un isoflavonoide, un neoflavonoide y combinaciones de los mismos, incluidas todas las variaciones de isómeros, solvatos, hidratos, polimórficas, formas cristalinas, formas no cristalinas y sales de los mismos.

[0075] En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender uno o más flavanoles. En todavía otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender uno o más flavanoles seleccionados del grupo que consiste en flavan-3-oles (por ejemplo, catequina (C), galocatequina (GC), 3-galato de catequina (Cg), 3-galato de galocatequina (GCg), epicatequinas (EC), epigalocatequina (EGC), 3-galato de epicatequina (ECg), 3-galato de epigalocatequina (EGCg), etc.), flavan-4-oles, flavano-3,4-dioles (por ejemplo, leucoantocianidina), proantocianidinas (por ejemplo, incluye dímeros, trímeros, oligómeros o polímeros de flavanoles) y combinaciones de los mismos. En todavía otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender uno o más flavanoles seleccionados del grupo que consiste en catequina (C), galocatequina (GC), 3-galato de catequina (Cg), 3-galato de galocatequina (GCg), epicatequinas (EC), epigalocatequina (EGC), 3-galato de epicatequina (ECg), 3-galato de epigalocatequina (EGCg), flavan-4-ol, leucoantocianidina, y dímeros, trímeros, oligómeros o polímeros de los mismos.

[0076] En otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender una o más flavonas. En todavía otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender una o más flavonas seleccionadas del grupo que consiste en flavonas (por ejemplo, luteolina, apigenina, tangeritina, etc.), flavonoles (por ejemplo, quercetina, quercitrina, rutina, kaempferol, kaempferitrina, astragalina, soforaflavonolósido, miricetina, fisetina, isoramnetina, paquipodol, ramnacina, etc.), flavanonas (por ejemplo hesperetina, hesperidina, naringenina, eriodictiol, homoeriodictiol, etc.) y flavanonoles (por ejemplo, dihidroquercetina, dihidrokaempferol, etc.). En todavía otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender una o más flavonas seleccionadas del grupo que consiste en luteolina, apigenina, tangeritina, quercetina, quercitrina, rutina, kaempferol, kaempferitrina, astragalina, soforaflavonolósido, miricetina, fisetina, isoramnetina, paquipodol, ramnacina, hesperetina, hesperidina, naringenina, eriodictiol, homoeriodictiol, dihidroquercetina, dihidrokaempferol, y combinaciones de las mismas.

[0077] En todavía otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender una o más antocianidinas. En otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender una o más antocianidinas seleccionadas del grupo que consiste en cianidinas, delfinidinas, malvidinas, pelargonidinas, peonidinas, petunidinas, y combinaciones de las mismas.

[0078] En otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender uno o más isoflavonoides. En todavía otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente comprenden uno o más isoflavonoides seleccionados del grupo que consiste en fitoestrógenos, isoflavonas (por ejemplo, genisteína, daidzeína, gliciteína, etc.) e isoflavanos (por ejemplo, equol, loncocarpano, laxiflorano, etc.), y combinaciones de los mismos. En otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender uno o más isoflavonoides seleccionados del grupo que consiste en genisteína, daidzeína, gliciteína, equol, loncocarpano, laxiflorano, y combinaciones de los mismos.

[0079] En otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender uno o más neoflavonoides. En otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender uno o más neoflavonoides seleccionados del grupo que consiste en neoflavonas (por ejemplo, calofilolida), neoflavenos (por ejemplo, dalbergicromeno), coutareageninas, dalberginas, nivetinas, y combinaciones de los mismos. En todavía otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender uno o más neoflavonoides seleccionados del grupo que consiste en calofilolida, dalbergicromeno, coutareagenina, dalbergina, nivetina, y combinaciones de los mismos.

[0080] En otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender uno o más flavonoides seleccionados del grupo que consiste en catequina (C), galocatequina (GC), 3-galato de catequina (Cg), 3-galato de galocatequina (GCg), epicatequinas (EC), epigalocatequina (EGC), 3-galato de epicatequina (ECg), 3-galato de epigalocatequina (EGCg), flavan-4-ol, leucoantocianidina, proantocianidinas, luteolina, apigenina, tangeritina, quercetina, quercitrina, rutina, kaempferol, kaempferitrina, astragalina, soforaflavonolósido, miricetina, fisetina, isoramnetina, paquipodol, ramnacina, hesperetina, hesperidina, naringenina, eriodictiol, homoeriodictiol, dihidroquercetina, dihidrokaempferol, cianidinas, delfinidinas, malvidinas, pelargonidinas, peonidinas, petunidinas, genisteína, daidzeína, gliciteína, equol, loncocarpano, laxiflorano, calofilolida, dalbergicromeno, coutareagenina, dalbergina, nivetina, y combinaciones de los mismos. En todavía otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender uno o más flavonoides seleccionados del grupo que consiste en hesperetina, hesperidina, naringenina, genisteína, daidzeína, y combinaciones de los mismos. En una forma de realización particular, la composición descrita en la presente puede comprender el flavonoide hesperetina. En otra forma de realización particular, la composición descrita en la presente puede comprender el flavonoide hesperidina. En todavía otra forma de realización particular, la composición descrita en la presente puede comprender el flavonoide naringenina. En todavía otra forma de realización particular, la composición descrita en la presente puede comprender el flavonoide genisteína. En todavía otra forma de realización particular más, la composición descrita en la presente puede comprender el flavonoide daidzeína.

Inductor(es) de genes nod no flavonoide(s):

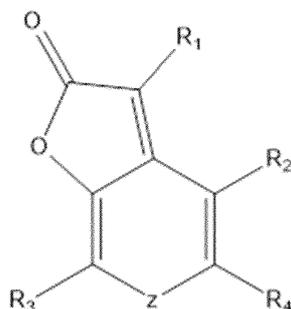
[0081] También se pueden usar en las composiciones descritas en la presente ácido jasmónico (JA, ácido [1R-[1 α ,2 β (Z)]]-3-oxo-2-(pentenil)ciclopentanoacético) y sus derivados, ácido linoleico (ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico) y sus derivados, y ácido linolénico (ácido (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoico) y sus derivados. Los inductores de genes nod no flavonoides están destinados a incluir no solo los inductores de genes nod no flavonoides descritos en la presente, sino también isómeros, sales y solvatos de los mismos.

[0082] El ácido jasmónico y su éster metílico, el jasmonato de metilo (MeJA), colectivamente conocidos como jasmonatos, son compuestos a base de octadecanoides que se dan de forma natural en las plantas. El ácido jasmónico es producido por las raíces de las plántulas de trigo y por microorganismos fúngicos tales como *Botryodiplodia theobromae* y *Gibbrella fujikuroi*, levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y cepas patógenas y no patógenas de *Escherichia coli*. El ácido linoleico y el ácido linolénico son producidos en el curso de la biosíntesis del ácido jasmónico. Se ha informado de que los jasmonatos, el ácido linoleico y el ácido linoleico (y sus derivados) son inductores de la expresión de genes nod o la producción de LCO por las rizobacterias. Véanse, por ejemplo, Mabood, Fazli, "Jasmonates induce the expression of nod genes in Bradyrhizobium japonicum", 17 de mayo, 2001; y Mabood, Fazli, "Linoleic and linolenic acid induce the expression of nod genes in Bradyrhizobium japonicum", USDA 3, 17 de mayo, 2001.

[0083] Los derivados útiles del ácido linoleico, el ácido linolénico y el ácido jasmónico que pueden ser útiles en las composiciones de la presente descripción incluyen ésteres, amidas, glucósidos y sales. Ésteres representativos son compuestos donde el grupo carboxilo del ácido linoleico, el ácido linolénico o el ácido jasmónico se ha sustituido con un grupo --COR, donde R es un grupo --OR¹, donde R¹ es: un grupo alquilo, tal como un grupo alquilo C₁-C₈ no ramificado o ramificado, por ejemplo, un grupo metilo, etilo o propilo; un grupo alqueno, tal como un grupo alqueno C₂-C₈ no ramificado o ramificado; un grupo alquino, tal como un grupo alquino C₂-C₈ no ramificado o ramificado; un grupo arilo que tiene, por ejemplo, de 6 a 10 átomos de carbono; o un grupo heteroarilo que tiene, por ejemplo, de 4 a 9 átomos de carbono, donde los heteroátomos en el grupo heteroarilo pueden ser, por ejemplo, N, O, P o S. Las amidas representativas son compuestos donde el grupo carboxilo del ácido linoleico, el ácido linolénico o el ácido jasmónico se ha sustituido con un grupo --COR, donde R es un grupo NR²R³, donde R² y R³ son independientemente: hidrógeno; un grupo alquilo, tal como un grupo alquilo C₁-C₈ no ramificado o ramificado, por ejemplo, un grupo metilo, etilo o propilo; un grupo alqueno, tal como un grupo alqueno C₂-C₈ no ramificado o ramificado; un grupo alquino, tal como un grupo alquino C₂-C₈ no ramificado o ramificado; un grupo arilo que tiene, por ejemplo, de 6 a 10 átomos de carbono; o un grupo heteroarilo que tiene, por ejemplo, de 4 a 9 átomos de carbono, donde los heteroátomos en el grupo heteroarilo pueden ser, por ejemplo, N, O, P o S. Los ésteres se pueden preparar por métodos conocidos, como la adición nucleofílica catalizada por ácido, donde el ácido carboxílico se hace reaccionar con un alcohol en presencia de una cantidad catalítica de un ácido mineral. Las amidas también se pueden preparar por métodos conocidos, como haciendo reaccionar el ácido carboxílico con la amina apropiada en presencia de un agente de acoplamiento tal como la dicitohexilcarbodiimida (DCC), bajo condiciones neutras. Las sales adecuadas de ácido linoleico, ácido linolénico y ácido jasmónico incluyen, por ejemplo, sales de adición de bases. Las bases que se pueden usar como reactivos para preparar sales de bases metabólicamente aceptables de estos compuestos incluyen aquellas derivadas de cationes tales como cationes de metales alcalinos (por ejemplo, potasio y sodio) y cationes de metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio y magnesio). Estas sales se pueden preparar fácilmente mezclando una solución de ácido linoleico, ácido linolénico o ácido jasmónico con una solución de la base. La sal puede precipitarse a partir de la solución y recogerse por filtración o puede recuperarse por otros medios tal como por evaporación del solvente.

Karrikina(s):

[0084] Las karrikinas son 4H-pironas vinílogas, por ejemplo, 2H-furo[2,3-c]piran-2-onas, incluyendo sus derivados y análogos. Se pretende que las karrikinas incluyan isómeros, sales y solvatos de las mismas. Ejemplos de estos compuestos están representados por la estructura siguiente:



donde: Z es O, S o NR₆; R₁, R₂, R₃ y R₄ son cada uno independientemente H, alquilo, alquenoilo, alquinilo, fenilo, bencilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, feniloxi, benciloxi, CN, COR₆, COOR=, halógeno, NR₆R₇ o NO₂; y R₅, R₆ y R₇ son cada uno independientemente H, alquilo o alquenoilo, o una sal derivada biológicamente aceptable. Los ejemplos de sales biológicamente aceptables de estos compuestos pueden incluir sales de adición de ácido formadas con ácidos biológicamente aceptables, cuyos ejemplos incluyen hidrocioruro, hidrobromuro, sulfato o bisulfato, fosfato o hidrógenofosfato, acetato, benzoato, succinato, fumarato, maleato, lactato, citrato, tartrato, gluconato; metanosulfonato, bencenosulfonato y ácido p-toluenosulfónico. Las sales de metales biológicamente aceptables adicionales pueden incluir sales de metales alcalinos, incluyendo bases, cuyos ejemplos incluyen las sales de sodio y potasio. Los ejemplos de los compuestos abarcados por la estructura y que pueden ser adecuados para usar en la presente descripción incluyen los siguientes: 3-metil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde R₁=CH₃, R₂, R₃, R₄=H), 2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde R₁, R₂, R₃, R₄=H), 7-metil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde R₁, R₂, R₄=H, R₃=CH₃), 5-metil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde R₁, R₂, R₃=H, R₄=CH₃), 3,7-dimetil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde R₁, R₃=CH₃, R₂, R₄=H), 3,5-dimetil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde R₁, R₄=CH₃, R₂, R₃=H), 3,5,7-trimetil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde R₁, R₃, R₄=CH₃, R₂=H), 5-metoximetil-3-metil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde R₁=CH₃, R₂, R₃=H, R₄=CH₂OCH₃), 4-bromo-3,7-dimetil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde R₁, R₃=CH₃, R₂=Br, R₄=H), 3-metilfuro[2,3-c]piridin-2(3H)-ona (donde Z=NH, R₁=CH₃, R₂, R₃, R₄=H), 3,6-dimetilfuro[2,3-c]piridin-2(6H)-ona (donde Z=N-CH₃, R₁=CH₃, R₂, R₃, R₄=H). Véase la patente estadounidense 7,576,213. Estas moléculas se conocen también como karrikinas. Véase Halford, "Smoke Signals", en Chem. Eng. News (12 de abril, 2010), en las páginas 37-38 (que informa de que las karrikinas o butenolidas que están contenidas en el humo actúan como estimulantes del crecimiento y estimulan la germinación de las semillas después de un incendio forestal, y pueden vigorizar las semillas como maíz, tomates, lechuga y cebollas que han sido almacenadas). Estas moléculas son el tema de la patente estadounidense 7,576,213.

Microorganismo(s) beneficioso(s):

[0085] Las composiciones descritas en la presente incluyen uno o más microorganismos beneficiosos que son diazotófos (es decir, bacterias que son bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas). En otra forma de realización, el uno o más microorganismos beneficiosos son diazotófos bacterianos seleccionados de los géneros *Rhizobium spp.*, *Bradyrhizobium spp.*, *Azorhizobium spp.*, *Sinorhizobium spp.*, *Mesorhizobium spp.*, *Azospirillum spp.*, y combinaciones de los mismos. En todavía otra forma de realización, el uno o más microorganismos beneficiosos son bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Rhizobium cellulosilyticum*, *Rhizobium daejeonense*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium galegae*, *Rhizobium gallicum*, *Rhizobium giardinii*, *Rhizobium hainanense*, *Rhizobium huautlense*, *Rhizobium indigoferae*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium loessense*, *Rhizobium lupini*, *Sinorhizobium lusitanum*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium mongolense*, *Rhizobium miluonense*, *Rhizobium sullae*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium undicola*, *Rhizobium yanglingense*, *Bradyrhizobium betae*, *Bradyrhizobium canariense*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium iriomotense*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium jicamae*, *Bradyrhizobium liaoningense*, *Bradyrhizobium pachyrhizi*, *Bradyrhizobium yuanmingense*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azorhizobium doebereinae*, *Sinorhizobium abri*, *Sinorhizobium adhaerens*, *Sinorhizobium americanum*, *Sinorhizobium aboris*, *Sinorhizobium fredii*, *Sinorhizobium indiaense*, *Sinorhizobium kostiense*, *Sinorhizobium kummerowiae*, *Sinorhizobium medicae*, *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium mexicanus*, *Sinorhizobium morelense*, *Sinorhizobium saheli*, *Sinorhizobium terangae*, *Sinorhizobium xinjiangense*, *Mesorhizobium albiziae*, *Mesorhizobium amorphae*, *Mesorhizobium chacoense*, *Mesorhizobium ciceri*, *Mesorhizobium huakuii*, *Mesorhizobium loti*, *Mesorhizobium mediterraneum*, *Mesorhizobium pluifarium*, *Mesorhizobium septentrionale*, *Mesorhizobium temperatum*, *Mesorhizobium tianshanense*, *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum canadense*, *Azospirillum doebereinae*, *Azospirillum formosense*, *Azospirillum halopraeferans*, *Azospirillum irakense*, *Azospirillum largimobile*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum melinis*, *Azospirillum oryzae*, *Azospirillum picis*, *Azospirillum rugosum*, *Azospirillum thiophilum*, *Azospirillum zeae*, y combinaciones de las mismas.

[0086] En una forma de realización particular, el microorganismo beneficioso es un diazotrofo bacteriano seleccionado del grupo que consiste en *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti*, *Sinorhizobium meliloti*, *Azospirillum brasilense*, y combinaciones de los mismos. En otra forma de realización, el microorganismo beneficioso es el diazotrofo bacteriano *Bradyrhizobium japonicum*. En otra forma de realización, el microorganismo beneficioso es el diazotrofo bacteriano *Rhizobium leguminosarum*. En otra forma de realización, el microorganismo beneficioso es el diazotrofo bacteriano *Rhizobium meliloti*. En otra forma de realización, el microorganismo beneficioso es el diazotrofo bacteriano *Sinorhizobium meliloti*. En otra forma de realización, el microorganismo beneficioso es el diazotrofo bacteriano *Azospirillum brasilense*.

[0087] En una forma de realización particular, el uno o más diazotófos comprende una o más cepas de *Rhizobium leguminosarum*. En otra forma de realización particular, la cepa de *R. leguminosarum* comprende la cepa SO12A-2-(IDAC 080305-01). En otra forma de realización particular, el uno o más diazotófos comprende una cepa de *Bradyrhizobium japonicum*. En todavía otra forma de realización particular, la cepa de *Bradyrhizobium japonicum* comprende la cepa *B. japonicum* USDA 532C, *B. japonicum* USDA 110, *B. japonicum* USDA 123, *B. japonicum* USDA 127, *B. japonicum* USDA 129, *B. japonicum* NRRL B-50608, *B. japonicum* NRRL B-50609, *B. japonicum*

NRRL B-50610, *B. japonicum* NRRL B-50611, *B. japonicum* NRRL B-50612, *B. japonicum* NRRL B-50592 (depositada también como NRRL B-59571), *B. japonicum* NRRL B-50593 (depositada también como NRRL B-59572), *B. japonicum* NRRL B-50586 (depositada también como NRRL B-59565), *B. japonicum* NRRL B-50588 (depositada también como NRRL B-59567), *B. japonicum* NRRL B-50587 (depositada también como NRRL B-59566), *B. japonicum* NRRL B-50589 (depositada también como NRRL B-59568), *B. japonicum* NRRL B-50591 (depositada también como NRRL B-59570), *B. japonicum* NRRL B-50590 (depositada también como NRRL B-59569), NRRL B-50594 (depositada también como NRRL B-50493), *B. japonicum* NRRL B-50726, *B. japonicum* NRRL B-50727, *B. japonicum* NRRL B-50728, *B. japonicum* NRRL B-50729, *B. japonicum* NRRL B-50730, y combinaciones de las mismas.

[0088] En todavía una forma de realización más particular, el uno o más diazótrofos comprende una o más cepas de *R. leguminosarum* y comprende la cepa SO12A-2-(IDAC 080305-01), *B. japonicum* USDA 532C, *B. japonicum* USDA 110, *B. japonicum* USDA 123, *B. japonicum* USDA 127, *B. japonicum* USDA 129, *B. japonicum* NRRL B-50608, *B. japonicum* NRRL B-50609, *B. japonicum* NRRL B-50610, *B. japonicum* NRRL B-50611, *B. japonicum* NRRL B-50612, *B. japonicum* NRRL B-50592 (depositada también como NRRL B-59571), *B. japonicum* NRRL B-50593 (depositada también como NRRL B-59572), *B. japonicum* NRRL B-50586 (depositada también como NRRL B-59565), *B. japonicum* NRRL B-50588 (depositada también como NRRL B-59567), *B. japonicum* NRRL B-50587 (depositada también como NRRL B-59566), *B. japonicum* NRRL B-50589 (depositada también como NRRL B-59568), *B. japonicum* NRRL B-50591 (depositada también como NRRL B-59570), *B. japonicum* NRRL B-50590 (depositada también como NRRL B-59569), NRRL B-50594 (depositada también como NRRL B-50493), *B. japonicum* NRRL B-50726, *B. japonicum* NRRL B-50727, *B. japonicum* NRRL B-50728, *B. japonicum* NRRL B-50729, *B. japonicum* NRRL B-50730, y combinaciones de las mismas.

Fungicida(s):

[0089] En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender además uno o más fungicidas. Los fungicidas útiles para las composiciones descritas en la presente pueden ser fungicidas biológicos, fungicidas químicos o combinaciones de los mismos. Los fungicidas se pueden seleccionar para proporcionar un control eficaz contra un amplio espectro de hongos fitopatógenos, incluidos hongos transmitidos por el suelo, que derivan especialmente de las clases de los Plasmodiophoromycetes, Peronosporomycetes (sin. Oomycetes), Chytridiomycetes, Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes y Deuteromycetes (sin. hongos imperfectos). Los patógenos fúngicos más comunes contra los que se pueden dirigir eficazmente incluyen *Pytophthora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phomopsis* o *Sclerotinia* y *Phakopsora* y combinaciones de los mismos.

[0090] En ciertas formas de realización, el fungicida biológico puede ser una bacteria del género *Actinomycetes*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Aureobacterium*, *Azobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Brevibacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Clavibacter*, *Comomonas*, *Corynebacterium*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Gluconobacter*, *Hydrogenophage*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*, *Paenibacillus*, *Pasteuria*, *Phingobacterium*, *Photorhabdus*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Variovorax* y *Xenorhabdus*. En formas de realización particulares, la bacteria se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Chromobacterium suttsuga*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria usage* y *Pseudomona fluorescens*.

[0091] En ciertas formas de realización, el fungicida biológico puede ser un hongo del género *Alternaria*, *Ampelomyces*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Beauveria*, *Colletotrichum*, *Coniothyrium*, *Gliocladium*, *Metarhizium*, *Muscodor*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Typhula*, *Ulocladium* y *Verticillium*. En formas de realización particulares, el hongo es *Beauveria bassiana*, *Coniothyrium minitans*, *Gliocladium virens*, *Metarhizium anisopliae*, *Muscodor albus*, *Paecilomyces lilacinus* o *Trichoderma polysporum*.

[0092] Los ejemplos no limitativos de fungicidas biológicos que pueden ser adecuados para usar en la presente descripción incluyen *Ampelomyces quisqualis* (por ejemplo, AQ 10® de Intrachem Bio GmbH & Co. KG, Alemania), *Aspergillus flavus* (por ejemplo, AFLAGUARD® de Syngenta, CH), *Aureobasidium pullulans* (por ejemplo, BOTECTOR® de bio-ferm GmbH, Alemania), *Bacillus pumilus* (por ejemplo, aislado NRRL-Nr. B-21661 en RHAPSODY®, SERENADE® MAX y SERENADE® ASO de Fa. AgraQuest Inc., EE. UU.), *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24 (por ejemplo, TAEGRO® de Novozymes Biologicals, Inc., EE. UU.), *Bacillus amyloliquefaciens* TJ1000 (por ejemplo, también conocido como 1BE, aislado ATCC BAA-390), *Candida oleophila*, *Candida oleophila* I-82 (por ejemplo, ASPIRE® de Ecogen Inc., EE. UU.), *Candida saitoana* (por ejemplo, BIOCURE® (en mezcla con lisozima) y BIOCOAT® de Micro Flo Company, EE. UU. (BASF SE) y Arysta), *Clonostachys rosea* f. *catenulata*, también denominada *Gliocladium catenulatum* (por ejemplo, aislado J1446: PRESTOP® de Verdera, Finlandia), *Coniothyrium minitans* (por ejemplo, CONTANS® de Prophyta, Alemania), *Cryphonectria parasitica* (por ejemplo, *Endothia parasitica* de CNICM, Francia), *Cryptococcus albidus* (por ejemplo, YIELD PLUS® de Anchor Bio-Technologies, Sudáfrica), *Fusarium oxysporum* (por ejemplo,

BIOFOX® de S.I.A.P.A., Italia, FUSACLEAN® de Natural Plant Protection, Francia), *Metschnikowia fructicola* (por ejemplo, SHEMER® de Agrogreen, Israel), *Microdochium dimerum* (por ejemplo, ANTIBOT® de Agrauxine, Francia), *Phlebiopsis gigantea* (por ejemplo, ROTSOP® de Verdera, Finlandia), *Pseudozyma flocculosa* (por ejemplo, SPORODEX® de Plant Products Co. Ltd., Canadá), *Pythium oligandrum*, *Pythium oligandrum* DV74 (por ejemplo, POLYVERSUM® de Remeslo SSRO, Biopreparaty, Rep. Checa), *Reynoutria sachalinensis* (por ejemplo, REGALIA® de Marrone BioInnovations, EE. UU.), *Talaromyces flavus*, *Talaromyces flavus* V117b (por ejemplo, PROTUS® de Prophyta, Alemania), *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma asperellum* SKT-1 (por ejemplo, ECO-HOPE® de Kumiai Chemical Industry Co., Ltd., Japón), *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma atroviride* LC52 (por ejemplo, SENTINEL® de Agrimm Technologies Ltd, NZ), *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma harzianum* T-22 (por ejemplo, PLANTSHIELD® de la empresa BioWorks Inc., EE. UU.), *Trichoderma harzianum* TH 35 (por ejemplo, ROOT PRO® de Mycontrol Ltd., Israel), *Trichoderma harzianum* T-39 (por ejemplo, TRICHODEX® y TRICHODERMA 2000® de Mycontrol Ltd., Israel y Makhteshim Ltd., Israel), *T. harzianum* ICC012, *T. harzianum* y *T. viride* (por ejemplo, TRICHOPEL de Agrimm Technologies Ltd, NZ), *T. harzianum* ICC012 y *T. viride* ICC080 (por ejemplo, REMEDIER® de Isagro Ricerca, Italia), *T. polysporum* y *T. harzianum* (por ejemplo, BINAB® de BINAB Bio-Innovation AB, Suecia), *Trichoderma stromaticum* (por ejemplo, TRICOVAB® de C.E.P.L.A.C., Brasil), *Trichoderma virens*, *T. virens* GL-21 (por ejemplo, SOILGARD® de Certis LLC, EE. UU.), *T. virens* G1-3 (por ejemplo, ATCC 58678, de Novozymes BioAg, Inc.), *T. virens* G1-21 (por ejemplo, disponible comercialmente de Thermo Trilogy Corporation), *Trichoderma viride* (por ejemplo, TRIECO® de Ecosense Labs. (India) Pvt. Ltd., India, BIO-CURE® F de T. Stanes & Co. Ltd., India), *T. viride* TV1 (por ejemplo, *T. viride* TV1 de Agribiotec srl, Italia), *T. viride* ICC080, *Streptomyces lydicus*, *Streptomyces lydicus* WYEC 108 (por ejemplo, aislado ATCC 55445 en ACTINOVATE®, ACTINOVATE AG®, ACTINOVATE STP®, ACTI NO-IRON®, ACTINOVATE L&G® y ACTINOGROW® de Idaho Research Foundation, EE. UU.), *Streptomyces violaceusniger*, *Streptomyces violaceusniger* YCED 9 (por ejemplo, aislado ATCC 55660 en DE-THATCH-9®, DECOMP-9® y THATCH CONTROL® de Idaho Research Foundation, EE. UU.), *Streptomyces* WYE 53 (por ejemplo, aislado ATCC 55750 en DE-THATCH-9®, DECOMP-9® y THATCH CONTROL® de Idaho Research Foundation, EE. UU.) y *Ulocladium oudemansii*, *Ulocladium oudemansii* HRU3 (por ejemplo, BOTRY-ZEN® de Botry-Zen Ltd, NZ).

[0093] En una forma de realización particular, el biofungicida es *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24. En otra forma de realización particular, el biofungicida es *Bacillus amyloliquefaciens* TJ1000. En otra forma de realización particular, el biofungicida es *Streptomyces lydicus* WYEC 108. En todavía otra forma de realización particular, el biofungicida es *Streptomyces violaceusniger* YCED 9. En otra forma de realización particular, el biofungicida es *Streptomyces* WYE 53. En otra forma de realización particular, el biofungicida es *Trichoderma virens* G1-3. En otra forma de realización particular, el biofungicida es *Trichoderma virens* G1-21.

[0094] En todavía otra forma de realización particular, el biofungicida es una combinación de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24, *Bacillus amyloliquefaciens* TJ1000, *Streptomyces lydicus* WYEC 108, *Streptomyces violaceusniger* YCED 9, *Streptomyces* WYE 53, *Trichoderma virens* G1-3, *Trichoderma virens* G1-21, o combinaciones de los mismos (por ejemplo, al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, hasta e incluyendo todas las cepas en combinación).

[0095] En formas de realización adicionales, el fungicida biológico pueden ser activadores del crecimiento de las plantas o agentes de defensa de las plantas incluyendo, pero de forma no limitativa, harpina, *Reynoutria sachalinensis*, etc.

[0096] Los ejemplos representativos de fungicidas químicos útiles que pueden ser adecuados para usar en la presente descripción incluyen hidrocarburos aromáticos, bencimidazoles, benzotiadiazol, carboxamidas, amidas de ácido carboxílico, morfolin, fenilamidas, fosfonatos, inhibidores externos de la quinona (por ejemplo estrobilurinas), tiazolidinas, tiofanatos, tiofenocarboxamidas y triazoles:

45 A) estrobilurinas:

azoxistrobina, coumetoxistrobina, coumoxistrobina, dimoxistrobina, enestroburina, fluoxastrobina, cresoxim-metilo, metominostrobina, orisastrobina, picoxistrobina, piraclostrobina, pirametostrobina, piraoxistrobina, piribencarb, trifloxistrobina, éster metílico del ácido 2-[2-(2,5-dimetil-fenoximetil)-fenil]-3-metoxi-acrílico y 2-(2-(3-(2,6-diclorofenil)-1-metil-alilidenaminoximetil)-fenil)-2-metoxiimino-N-metil-acetamida;

50 B) carboxamidas:

carboxanilidas: benalaxil, benalaxil-M, benodanil, bixafeno, boscalid, carboxina, fenfuram, fenhexamid, flutolanil, fluxapiroxad, furametpir, isopirazam, isotianil, kiralaxil, mepronil, metalaxil, metalaxil-M (mefenoxam), ofurace, oxadixil, oxicarboxina, penflufeno, pentiopirad, sedaxano, tecloftalam, tifluzamida, tiadinil, 2-amino-4-metil-tiazol-5-carboxanilida, N-(4'-trifluorometiltiobifenil-2-il)-3-difluorometil-1-metil-1 H-pirazol-4-carboxamida y N-(2-(1,3,3-trimetilbutil)-fenil)-1,3-dimetil-5-fluoro-1 H-pirazol-4-carboxamida;

morfolidas carboxílicas: dimetomorfo, flumorfo, pirimorfo;
 amidas de ácido benzoico: flumetover, fluopicolida, fluopiram, zoxamida;
 otras carboxamidas: carpropamid, diciclotmet, mandiproamid, oxitetraciclina, siltiofam y amida de ácido N-(6-metoxi-piridin-3-il) ciclopropanocarboxílico;

5 C) azoles:

10 triazoles: azaconazol, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, fenbuconazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, hexaconazol, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanil, oxpoconazol, paclobutrazol, penconazol, propiconazol, protioconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triadimefón, triadimenol, triticonazol, uniconazol;
 15 imidazoles: ciazofamid, imazalil, pefurazoato, procloraz, triflumizol;

D) compuestos heterocíclicos:

15 piridinas: fluazinam, pirifenox, 3-[5-(4-cloro-fenil)-2,3-dimetil-isoxazolidin-3-il]-piridina, 3-[5-(4-metil-fenil)-2,3-dimetil-isoxazolidin-3-il]-piridina;
 pirimidinas: bupirimato, ciprodinil, diflumetorim, fenarimol, ferimzona, mepanipirim, nitrapirina, nuarimol, pirimetanil;
 piperazinas: triforina;
 pirroles: fenciclonil, fludioxonil;
 morfolinás: aldimorfo, dodemorfo, dodemorfo-acetato, fenpropimorfo, tridemorfo;
 20 piperidinas: fenpropidina;
 dicarboximidas: fluoroimid, iprodiona, procimidona, vinclozolina;
 heterociclos de 5 miembros no aromáticos: famoxadona, fenamidona, flutianil, octilinona, probenazol, éster S-alílico del ácido 5-amino-2-isopropil-3-oxo-4-orto-tolil-2,3-dihidro-pirazol-1-carbotioico;
 otros: acibenzolar-S-metilo, ametocradina, amisulbrom, anilazina, blasticidina-S, captafol, captan, quinometionato, dazomet, debacarb, diclomezina, difenzoquat, metilsulfato de difenzoquat, fenoxanil,
 25 Folpet, ácido oxolínico, piperalina, proquinazid, piroquilona, quinoxifeno, triazóxido, triciclazol, 2-butoxi-6-yodo-3-propilcromen-4-ona, 5-cloro-1-(4,6-dimetoxi-pirimidin-2-il)-2-metil-1H-benzoimidazol y 5-cloro-7-(4-metilpiperidin-1-il)-6-(2,4,6-trifluorofenil)-[1,2,4]triazol-[1,5-a]pirimidina;

E) benzamidazoles:
 carbendazim.

30 F) otras sustancias activas:

guanidinas: guanidina, dodina, base libre de dodina, guazatina, acetato de guazatina, iminoctadina, triacetato de iminoctadina, tris(albesilato) de iminoctadina;
 antibióticos: kasugamicina, kasugamicina hidrocloreuro hidrato, estreptomycin, polioxina, validamicina A;
 35 derivados de nitrofenilo: binapacril, diclorán, dinobutón, dinocap, nitrotal-isopropil, tecnazeno, compuestos organometálicos: sales de fentina, tales como acetato de fentina, cloruro de fentina o hidróxido de fentina;
 compuestos de heterociclilo que contienen azufre: ditanona, isoprotiolano;
 40 compuestos organofosforados: edifenfos, fosetil, fosetil-aluminio, iprobenfos, ácido de fósforo y sus sales, pirazofos, tolclofos-metilo;
 compuestos organoclorados: clorotalonil, diclofluanida, diclorofeno, flusulfamida, hexaclorobenceno, pencicurón, pentaclorofenol y sus sales, ftalida, quintoceno, tiofanato-metil, tiofanato, toliifluanida, N-(4-cloro-2-nitro-fenil)-N-etil-4-metil-bencenosulfonamida;
 45 sustancias activas inorgánicas: mezcla de Burdeos, acetato de cobre, hidróxido de cobre, oxiclóruo de cobre, sulfato cúprico básico y azufre.
 Los fungicidas comerciales se utilizan más adecuadamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante en las concentraciones recomendadas.

Herbicida(s):

50 [0097] En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender además uno o más herbicidas. Los ejemplos no limitativos de herbicidas incluyen inhibidores de ACCasa, acetanilidas, inhibidores de AHAS, inhibidores de la biosíntesis de carotenoides, inhibidores de EPSPS, inhibidores de glutamina sintetasa, inhibidores de PPO, inhibidores de PS II y auxinas sintéticas. En una forma de realización particular, el herbicida puede ser un herbicida preemergente, un herbicida postemergente o una combinación de los mismos.

[0098] Los herbicidas adecuados incluyen herbicidas químicos, herbicidas naturales (por ejemplo, bioherbicidas, herbicidas orgánicos, etc.) o combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitativos de herbicidas adecuados incluyen acetocloro, dicamba, bentazona, acifluorfenó, clorimurón, lactofeno, clomazona, fluazifop, flumioxazina, glufosinato, glifosato, setoxidim, imazetapir, imazamox, fomesafe, fomesafén, flumiclorac, imazaquín, mesotriona, quinalofop, saflufenacil, sulcotriona, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), taxtomina (por ejemplo, las taxtominas descritas en la patente estadounidense n.º: 7,989,393) y cletodim. Productos comerciales que contienen cada uno de estos compuestos están fácilmente disponibles. La concentración de herbicida en la composición corresponderá generalmente al índice de uso marcado para un herbicida particular.

10 Insecticida(s), acaricida(s), nematocida(s):

[0099] En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender además uno o más insecticidas, acaricidas, nematocidas o combinaciones de los mismos. Los insecticidas útiles para las composiciones descritas en la presente presentarán adecuadamente actividad contra una amplia variedad de insectos, incluidos, pero de forma no limitativa, gusanos de alambre, gusanos cortadores, larvas, gusano de la raíz del maíz, moscas del maíz, escarabajos pulga, chinches de los cereales, pulgones, crisomélidos, chinches apestosas y combinaciones de los mismos. Los insecticidas, acaricidas y nematocidas descritos en la presente pueden ser químicos o naturales (por ejemplo, soluciones biológicas, tales como pesticidas fúngicos, etc.).

[0100] Los ejemplos no limitativos de insecticidas, acaricidas y nematocidas que pueden ser útiles para las composiciones descritas en la presente incluyen carbamatos, diamidas, lactonas macrocíclicas, neonicotinoides, organofosfatos, fenilpirazoles, piretrinas, espinosinas, piretroides sintéticos, ácidos tetrónicos y tetrámicos.

[0101] En formas de realización particulares, los insecticidas, acaricidas y nematocidas incluyen acrinatrina, alfa-cipermetrina, beta-ciflutrina, cihalotrina, cipermetrina, csevalcrato de deltametrina, etofenprox, fenpropatrina, fenvalerato, flucitrinato, fostiazato, lambda-cihalotrina, gamma-cihalotrina, permetrina, tau-fluvalinato, transflutrina, zeta-cipermetrina, ciflutrina, bifentrina, teflutrina, eflusilanato, fubfenprox, piretrina, resmetrina, imidacloprid, acetamiprid, tiametoxam, nitenpiram, tiacloprid, dinotefurán, clotianidina, imidaclozot, clorfluazurón, diflubenzurón, lufenurón, teflubenzurón, triflumurón, novalurón, flufenoxurón, hexaflumurón, bistrifluorón, noviflumurón, buprofezin, ctiromazina, metoxifenozida, tebufenozida, halofenozida, cromafenozida, endosulfán, fipronil, etiprol, pirafuprol, piriprol, flubendiamida, clorantraniliprol (*Rynaxypyr*), clotianidina, Cyazypyr, emamectina, benzoato de emamectina, abamectina, ivermectina, milbemectina, lepimectina, tebufenpirad, fenpiroximato, piridabeno, fenazaquina, pirimidifeno, tolfenpirad, dicofol, cienopirafeno, ciflumetofeno, acequinocilo, fluacipirina, bifenazato, diafenturón, etoxazol, clofentezina, espinosad, triaratenó, tetradifón, propargita, hexitiazox, bromopropilato, quinometionato, amitraz, pirifluquinazón, pimetrozina, flonicamid, piriproxifeno, diofenolán, clorfenapir, metaflumizona, indoxacarb, clorpirifos, espirodiclofeno, espiromesifeno, espirotetramato, piridalil, espinctoram, acefato, triazofos, profenofos, oxamil, espinetoram, fenamifos, fenamipclotiahos, 4-[[[6-cloropirid-3-il)metil](2,2-difluoroetil)amino]furan-2(5H)-ona, cadusafos, carbaril, carbofurano, etoprofos, tiodicarb, aldicarb, aldoxicarb, metamidofos, metiocarb, sulfoxaflor, ciantraniliprol y también productos a base de *Bacillus firmus* (I-1582, BioNeem, *Votivo*), y combinaciones de los mismos.

[0102] En una forma de realización particular, el insecticida es un insecticida microbiano. En una forma de realización más particular, el insecticida microbiano es un insecticida fúngico. Se describen ejemplos no limitativos de insecticidas fúngicos que se pueden usar en las composiciones descritas en la presente en McCoy, C. W., Samson, R. A. y Coucias, D. G. "Entomogenous fungi". En "CRC Handbook of Natural Pesticides. Microbial Pesticides, Part A. Entomogenous Protozoa and Fungi". (C. M. Inoffo, ed.), (1988): Vol. 5, 151-236; Samson, R. A., Evans, H.C. y Latge', J. P. "Atlas of Entomopathogenic Fungi". (Springer-Verlag, Berlín) (1988); y deFaria, M.R. y Wraight, S. P. "Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types". *Biol. Control* (2007), doi: 10.1016/j.biocontrol.2007.08.001.

[0103] En una forma de realización, los ejemplos no limitativos de insecticidas fúngicos que se pueden usar en las composiciones descritas en la presente incluyen especies de *Coelomycidium*, *Myiophagus*, *Coelemomyces*, *Lagenidium*, *Leptolegnia*, *Couchia*, *Sporodiniella*, *Conidiobolus*, *Entomophaga*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Massospora*, *Meristacrum*, *Neozygites*, *Pandora*, *Zoophthora*, *Blastodendron*, *Metschnikowia*, *Mycoderma*, *Ascophaera*, *Cordyceps*, *Torrubiella*, *Nectria*, *Hypocrella*, *Calonectria*, *Filariomyces*, *Hesperomyces*, *Trenomyces*, *Myriangium*, *Podonectria*, *Akanthomyces*, *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Culicinomyces*, *Engyodontium*, *Fusarium*, *Gibellula*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Isaria*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces*, *Paraisaria*, *Pleurodesmospora*, *Polycephalomyces*, *Pseudogibellula*, *Sorospora*, *Stillbella*, *Tetranacrium*, *Tilachlidium*, *Tolypocladium*, *Verticillium*, *Aegerita*, *Filobasidiella*, *Septobasidium*, *Uredinella* y combinaciones de las mismas.

[0104] Los ejemplos no limitativos de especies particulares que pueden ser útiles como insecticida fúngico en las composiciones descritas en la presente incluyen *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma hazarium*, *Alternaria*

cassiae, *Fusarium lateritum*, *Fusarium solani*, *Lecanicillium lecanii*, *Aspergillus parasiticus*, *Verticillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden incluir cualquiera de los insecticidas fúngicos provistos anteriormente, incluyendo cualquier combinación de los mismos.

5 [0105] En una forma de realización, la composición comprende al menos un insecticida fúngico del género *Metarhizium spp.*, tal como *Metarhizium anisopliae* (al que también se puede hacer referencia en la técnica como *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium brunneum* o "muscadina verde"). En al menos una forma de realización, el insecticida fúngico comprende la cepa *Metarhizium anisopliae*. En otra forma de realización, la composición
10 comprende esporas de la cepa *Metarhizium anisopliae*. En una forma de realización particular, la composición comprende al menos un pesticida fúngico que comprende *Metarhizium anisopliae* cepa F52 (también conocida como *Metarhizium anisopliae* cepa 52, *Metarhizium anisopliae* cepa 7, *Metarhizium anisopliae* cepa 43, *Metarhizium anisopliae* BIO-1020, TAE-001 y depositada como DSM 3884, DSM 3885, ATCC 90448, SD 170 y ARSEF 7711) (disponible de Novozymes Biologicals, Inc., EE. UU.). En todavía otra forma de realización particular,
15 la composición comprende al menos un insecticida fúngico que comprende esporas de *Metarhizium anisopliae* cepa F52.

[0106] En otra forma de realización, la composición puede comprender además al menos un insecticida fúngico del género *Beauveria spp.*, tal como, por ejemplo, *Beauveria bassiana*. En al menos una forma de realización, el insecticida fúngico comprende además la cepa *Beauveria bassiana*. En otra forma de realización, la composición comprende además esporas de la cepa *Beauveria bassiana*.

20 [0107] En una forma de realización particular, la composición comprende además al menos un insecticida fúngico que comprende *Beauveria bassiana* cepa ATCC-74040. En otra forma de realización, la composición comprende además al menos un insecticida fúngico que comprende esporas de *Beauveria bassiana* cepa ATCC-74040. En otra forma de realización particular, la composición comprende además al menos un insecticida fúngico que
25 comprende *Beauveria bassiana* cepa ATCC-74250. En todavía otra forma de realización particular, la composición comprende además al menos un insecticida fúngico que comprende esporas de *Beauveria bassiana* cepa ATCC-74250. En otra forma de realización particular, la composición comprende además al menos un insecticida fúngico que comprende una mezcla de *Beauveria bassiana* cepa ATCC-74040 y *Beauveria bassiana* cepa ATCC-74250. En todavía otra forma de realización, la composición comprende además al menos un insecticida fúngico que
30 comprende una mezcla de esporas de *Beauveria bassiana* cepa ATCC-74040 y *Beauveria bassiana* cepa ATCC-74250.

[0108] En todavía otra forma de realización particular, la composición descrita en la presente puede comprender una combinación de hongos. En una forma de realización, la composición puede comprender dos o más insecticidas fúngicos que sean diferentes cepas de la misma especie. En otra forma de realización, la composición
35 comprende al menos dos insecticidas fúngicos diferentes que son cepas de diferentes especies. En una forma de realización, la composición comprende al menos un insecticida fúngico del género *Metarhizium spp.* y al menos un insecticida fúngico del género *Beauveria spp.* En otra forma de realización, la composición comprende esporas de *Metarhizium spp.* y *Beauveria spp.*

[0109] En una forma de realización particular, la composición comprende al menos un insecticida fúngico, donde al menos un insecticida fúngico es una cepa de *Metarhizium anisopliae* y al menos un insecticida fúngico es una
40 cepa de *Beauveria bassiana*. En otra forma de realización, la composición comprende al menos un insecticida fúngico donde el insecticida fúngico comprende esporas de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*.

[0110] En una forma de realización más particular, la composición comprende al menos un insecticida fúngico, donde al menos un insecticida fúngico es una cepa de *Metarhizium anisopliae* F52 y al menos un insecticida fúngico es una cepa de la cepa *Beauveria bassiana* ATCC-74040. En otra forma de realización, la composición comprende
45 al menos un insecticida fúngico donde el insecticida fúngico comprende esporas de la cepa *Metarhizium anisopliae* F52 y la cepa *Beauveria bassiana* ATCC-74040.

[0111] En todavía otra forma de realización particular, la composición comprende al menos un insecticida fúngico, donde al menos un insecticida fúngico es una cepa de *Metarhizium anisopliae* F52 y al menos un insecticida fúngico es una cepa de la cepa *Beauveria bassiana* ATCC-74250. En otra forma de realización, la composición comprende
50 al menos un insecticida fúngico donde el insecticida fúngico comprende esporas de la cepa *Metarhizium anisopliae* F52 y la cepa *Beauveria bassiana* ATCC-74250.

[0112] En todavía otra forma de realización particular, la composición comprende al menos un insecticida fúngico, donde al menos un insecticida fúngico es una cepa de *Metarhizium anisopliae* F52, al menos un insecticida fúngico es una cepa de la cepa *Beauveria bassiana* ATCC-74040 y al menos un insecticida fúngico es una cepa de la cepa
55 *Beauveria bassiana* ATCC-74250. En otra forma de realización, la composición comprende al menos un insecticida

fúngico donde el insecticida fúngico comprende esporas de la cepa *Metarhizium anisopliae* F52, la cepa *Beauveria bassiana* ATCC-74040 y la cepa *Beauveria bassiana* ATCC-74250.

[0113] En otra forma de realización, la composición comprende al menos un insecticida fúngico, donde al menos un insecticida fúngico es una cepa de *Paecilomyces fumosoroseus*. En otra forma de realización, la composición comprende al menos un insecticida fúngico, donde al menos un insecticida fúngico es una cepa de *Paecilomyces fumosoroseus* FE991 (en NOFLY® de FuturEco BioScience S.L., Barcelona, España). En todavía otra forma de realización, la composición comprende al menos un insecticida fúngico, donde al menos un insecticida fúngico es una cepa de *Paecilomyces fumosoroseus* FE991, al menos un insecticida fúngico es una cepa de *Metarhizium anisopliae* F52, al menos un insecticida fúngico es una cepa de la cepa *Beauveria bassiana* ATCC-74040 y al menos un insecticida fúngico es una cepa de la cepa *Beauveria bassiana* ATCC-74250, y combinaciones de los mismos.

[0114] En otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente comprenden un nematocida. En una forma de realización más particular, el nematocida es un nematocida microbiano, más preferiblemente un hongo nematófago y/o bacterias nematófagas. En una forma de realización particular, el nematocida microbiano es un hongo nematófago seleccionado del grupo que consiste en *Arthrobotrys spp.*, *Dactylaria spp.*, *Harposporium spp.*, *Hirsutella spp.*, *Monacrosporium spp.*, *Nematocionus spp.*, *Meristacrum spp.*, *Myrothecium spp.*, *Paecilomyces spp.*, *Pasteuria spp.*, *Pochonia spp.*, *Trichoderma spp.*, *Verticillium spp.*, y combinaciones de los mismos. En todavía una forma de realización más particular, el hongo nematófago se selecciona del grupo que consiste en *Arthrobotrys dactyloides*, *Arthrobotrys oligospora*, *Arthrobotrys superb*, *Arthrobotrys dactyloides*, *Dactylaria candida*, *Harposporium anguillulae*, *Hirsutella rhossiliensis*, *Hirsutella minnesotensis*, *Monacrosporium cionopagum*, *Nematocionus geogenius*, *Nematocionus leiosporus*, *Meristacrum asterospermum*, *Myrothecium verrucaria*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria usgae*, *Pochonia chlamydopora*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens*, *Verticillium chlamydosporum* y combinaciones de los mismos.

[0115] En una forma de realización más particular, el nematocida microbiano es una bacteria nematófaga seleccionada del grupo que consiste en *Actinomycetes spp.*, *Agrobacterium spp.*, *Arthrobacter spp.*, *Alcaligenes spp.*, *Aureobacterium spp.*, *Azobacter spp.*, *Beijerinckia spp.*, *Burkholderia spp.*, *Chromobacterium spp.*, *Clavibacter spp.*, *Clostridium spp.*, *Comomonas spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Curtobacterium spp.*, *Desulfuribitio spp.*, *Enterobacter spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Gluconobacter spp.*, *Hydrogenophage spp.*, *Klebsiella spp.*, *Methylobacterium spp.*, *Phyllobacterium spp.*, *Phingobacterium spp.*, *Photorhabdus spp.*, *Serratia spp.*, *Stenotrophomonas spp.*, *Xenorhabdus spp.*, *Variovorax spp.*, *Streptomyces spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Paenibacillus spp.* y combinaciones de las mismas.

[0116] En todavía una forma de realización más particular, el nematocida microbiano es una bacteria nematófaga seleccionada del grupo que consiste en *Chromobacterium subtsugae*, *Chromobacterium violaceum*, *Streptomyces lydicus*, *Streptomyces violaceusniger* y combinaciones de las mismas. En una forma de realización particular, la cepa de *Chromobacterium subtsugae* es una cepa de *Chromobacterium subtsugae* sp. nov., más particularmente, la cepa de *Chromobacterium subtsugae* sp. nov. tiene el número de registro de depósito NRRL B-30655. En todavía otra forma de realización particular, la cepa de *Streptomyces* es una cepa de *Streptomyces lydicus* WYEC 108, una cepa de *Streptomyces violaceusniger* YCED 9, *Streptomyces* WYE53 o una combinación de las mismas.

40 Nutriente(s):

[0117] En todavía otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender además uno o más nutrientes beneficiosos. Los ejemplos no limitativos de nutrientes para usar en las composiciones descritas en la presente incluyen vitaminas (por ejemplo, vitamina A, complejo de vitaminas B (es decir, vitamina B₁, vitamina B₂, vitamina B₃, vitamina B₅, vitamina B₆, vitamina B₇, vitamina B₈, vitamina B₉, vitamina B₁₂, colina), vitamina C, vitamina D, vitamina E, vitamina K, carotenoides (α-caroteno, β-caroteno, criptoxantina, luteína, licopeno, zeaxantina, etc.), macrominerales (por ejemplo, fósforo, calcio, magnesio, potasio, sodio, hierro, etc.), oligoelementos (por ejemplo, boro, cobalto, cloruro, cromo, cobre, fluoruro, yodo, hierro, manganeso, molibdeno, selenio, zinc, etc.), ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico, taurina, etc.) y combinaciones de los mismos. En una forma de realización particular, las composiciones pueden comprender fósforo, boro, cloro, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc o combinaciones de los mismos.

[0118] En otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender además fósforo. En una forma de realización, el fósforo puede derivar de una fuente. En otra forma de realización, las fuentes adecuadas de fósforo incluyen fuentes de fósforo capaces de ser solubilizadas por uno o más microorganismos (por ejemplo, *Penicillium bilaiae*, etc.).

[0119] En una forma de realización, el fósforo puede derivar de una fuente de fosfato de roca. En otra forma de realización el fósforo se puede derivar de fertilizantes que comprenden una o más fuentes de fósforo. Los fertilizantes de fosfato fabricados disponibles comercialmente son de muchos tipos. Algunos de los comunes son aquellos que contienen fosfato de roca, fosfato monoamónico, fosfato diamónico, fosfato monocálcico, superfosfato, superfosfato triple y/o polifosfato amónico. Todos estos fertilizantes son producidos por procesamiento químico de fosfatos de roca naturales insolubles en instalaciones de fabricación de fertilizantes a gran escala y el producto es costoso. Por medio de la presente descripción es posible reducir la cantidad de estos fertilizantes aplicados al suelo a la vez que se mantiene la misma cantidad de absorción de fósforo del suelo.

[0120] En todavía otra forma de realización, el fósforo puede derivar de una fuente de fósforo orgánico. En otra forma de realización particular, la fuente de fósforo puede incluir un fertilizante orgánico. Un fertilizante orgánico se refiere a una enmienda de suelo derivada de fuentes naturales que garantiza, al menos, los porcentajes mínimos de nitrógeno, fosfato y potasa. Los ejemplos no limitativos de fertilizantes orgánicos incluyen productos derivados vegetales y animales, polvos de roca, algas, inoculantes y acondicionadores. Estos están a menudo disponibles en centros de jardinería y a través de empresas de suministros hortícolas. En particular la fuente orgánica de fósforo es de harina de huesos, harina de carne, estiércol animal, compost, lodo de depuradora o guano, o combinaciones de los mismos.

[0121] En todavía otra forma de realización, el fósforo puede derivar de una combinación de fuentes de fósforo que incluyen, pero de forma no limitativa, fosfato de roca, fertilizantes que comprenden una o más fuentes de fósforo (por ejemplo, fosfato monoamónico, fosfato diamónico, fosfato monocálcico, superfosfato, superfosfato triple, polifosfato amónico, etc.), una o más fuentes de fósforo orgánico, y combinaciones de las mismas.

Bioestimulante(s):

[0122] En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender además uno o más bioestimulantes beneficiosos. Los bioestimulantes pueden mejorar procesos metabólicos o fisiológicos tales como la respiración, la fotosíntesis, la absorción de ácidos nucleicos, la absorción de iones, el suministro de nutrientes o una combinación de los mismos. Los ejemplos no limitativos de bioestimulantes incluyen extractos de algas (por ejemplo, *Ascophyllum nodosum*), ácidos húmicos (por ejemplo, humato de potasio), ácidos fúlvicos, mioinositol, glicina y combinaciones de los mismos. En otra forma de realización, las composiciones comprenden extractos de algas, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, mioinositol, glicina y combinaciones de los mismos.

Polímero(s):

[0123] En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender además uno o más polímeros. Los usos no limitativos de polímeros en la industria agrícola incluyen el suministro agroquímico, la eliminación de metales pesados, la retención de agua y/o el suministro de agua, y combinaciones de los mismos. Pouci, et al., Am. J. Agri. & Biol. Sci., 3(1):299-314 (2008). En una forma de realización, el uno o más polímeros es un polímero natural (por ejemplo, agar, almidón, alginato, pectina, celulosa, etc.), un polímero sintético, un polímero biodegradable (por ejemplo, policaprolactona, polilactida, poli(alcohol de vinilo), etc.) o una combinación de los mismos.

[0124] Para una lista no limitativa de polímeros útiles para las composiciones descritas en la presente, véase Pouci, et al., Am. J. Agri. & Biol. Sci., 3(1):299-314 (2008). En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente comprenden celulosa, derivados de celulosa, metilcelulosa, derivados de metilcelulosa, almidón, agar, alginato, pectina, polivinilpirrolidona y combinaciones de los mismos.

Agente(s) humectante(s):

[0125] En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender además uno o más agentes humectantes. Los agentes humectantes se usan comúnmente en suelos, particularmente suelos hidrófobos, para mejorar la infiltración y/o la penetración de agua en un suelo. El agente humectante puede ser un adyuvante, un aceite, un tensioactivo, un tampón, un acidificante o una combinación de los mismos. En una forma de realización, el agente humectante es un tensioactivo. En una forma de realización, el agente humectante es uno o más tensioactivos no iónicos, uno o más tensioactivos aniónicos o una combinación de los mismos. En otra forma de realización, el agente humectante es uno o más tensioactivos no iónicos.

[0126] Tensioactivos adecuados para las composiciones descritas en la presente se proporcionan en la sección "tensioactivos".

Tensioactivo(s):

[0127] Los tensioactivos adecuados para las composiciones descritas en la presente pueden ser tensioactivos no iónicos (por ejemplo, semipolares y/o aniónicos y/o catiónicos y/o zwitteriónicos). Los tensioactivos pueden humectar y emulsionar suelo(s) y/o tierra(s). Se prevé que los tensioactivos usados en la composición descrita tengan una toxicidad baja para cualquiera de los microorganismos contenidos en la formulación. Se prevé además que los tensioactivos usados en la composición descrita tengan una baja fitotoxicidad (es decir, el grado de toxicidad que tiene una sustancia o una combinación de sustancias sobre una planta). Se puede usar un único tensioactivo o una mezcla de varios tensioactivos.

Tensioactivos aniónicos:

[0128] También se pueden usar tensioactivos aniónicos o mezclas de tensioactivos aniónicos y no iónicos en las composiciones. Los tensioactivos aniónicos son tensioactivos que tienen una fracción hidrófila en un estado aniónico o cargado negativamente en la solución acuosa. Las composiciones descritas en la presente pueden comprender uno o más tensioactivos aniónicos. El/Los tensioactivo(s) aniónico(s) puede(n) ser o tensioactivos aniónicos hidrosolubles, tensioactivos aniónicos insolubles en agua o una combinación de tensioactivos aniónicos hidrosolubles y tensioactivos aniónicos insolubles en agua. Los ejemplos no limitativos de tensioactivos aniónicos incluyen ácidos sulfónicos, ésteres de ácidos sulfúricos, ácidos carboxílicos y sales derivadas. Los ejemplos no limitativos de tensioactivos aniónicos hidrosolubles incluyen alquilsulfatos, alquil éter sulfatos, alquil amido éter sulfatos, alquil aril poliéter sulfatos, alquil aril sulfatos, alquil aril sulfonatos, sulfatos de monoglicéridos, sulfonatos de alquilo, alquil amida sulfonatos, alquil aril sulfonatos, bencenosulfonatos, toluenosulfonatos, xilenosulfonatos, cumenosulfonatos, alquilbencenosulfonatos, alquildifenilóxidosulfonato, sulfonatos de alfa-olefina, alquilnaftalenosulfonatos, sulfonatos de parafina, sulfonatos de lignina, alquilsulfosuccinatos, sulfosuccinatos etoxilados, alquilétersulfosuccinatos, alquilamidassulfosuccinatos, alquilsulfosuccinamato, alquilsulfoacetatos, alquilsulfatos, éster de fosfato, alquiléterfosfatos, acilsarconinatos, isetionatos de acilo, N-aciltauratos, N-acil-N-alquiltauratos, carboxilatos de alquilo o una combinación de los mismos.

Tensioactivos no iónicos:

[0129] Los tensioactivos no iónicos son tensioactivos que no tienen carga eléctrica cuando se disuelven o se dispersan en un medio acuoso. En al menos una forma de realización de la composición descrita en la presente, se usan uno o más tensioactivos no iónicos, debido a que proporcionan las acciones humectantes y emulsionantes deseadas y no inhiben significativamente la estabilidad y la actividad de las esporas. El/Los tensioactivo(s) no iónico(s) puede(n) ser tensioactivos no iónicos hidrosolubles, tensioactivos no iónicos insolubles en agua o una combinación de tensioactivos no iónicos hidrosolubles y tensioactivos no iónicos insolubles en agua.

Tensioactivos no iónicos insolubles en agua:

[0130] Los ejemplos no limitativos de tensioactivos no iónicos insolubles en agua incluyen alquilo y arilo: éteres de glicerol, éteres de glicol, etanolamidas, sulfoanilamidas, alcoholes, amidas, alcohol etoxilatos, ésteres de glicerol, ésteres de glicol, etoxilatos de éster de glicerol y ésteres de glicol, poliglicósidos de alquilo a base de azúcar, ácidos grasos polioxietilenados, condensados de alcanolamina, alcanolamidas, glicoles acetilénicos terciarios, mercaptanos polioxietilenados, ésteres de ácido carboxílico, glicoles de polioxipropileno polioxietilenado, ésteres grasos de sorbitán o combinaciones de los mismos. También se incluyen copolímeros en bloque EO/PO (EO es óxido de etileno, PO es óxido de propileno), polímeros y copolímeros de EO, poliaminas y polivinilpinolidonas.

Tensioactivos no iónicos hidrosolubles:

[0131] Los ejemplos no limitativos de tensioactivos no iónicos hidrosolubles incluyen alcohol etoxilatos de ácidos grasos de sorbitán y etoxilatos de ésteres de ácidos grasos de sorbitán.

Combinación de tensioactivos no iónicos:

[0132] En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente comprenden al menos uno o más tensioactivos no iónicos. En una forma de realización, las composiciones comprenden al menos un tensioactivo no iónico insoluble en agua y al menos un tensioactivo no iónico hidrosoluble. En todavía otra forma de realización, las composiciones comprenden una combinación de tensioactivos no iónicos que tienen cadenas de hidrocarburos sustancialmente de la misma longitud.

Otros tensioactivos:

[0133] En otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente también pueden comprender tensioactivos de organosilicona, antiespumantes a base de silicona usados como tensioactivos en antiespumantes

a base de silicona y a base de aceite mineral. En otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente también pueden comprender sales de metales alcalinos de ácidos grasos (por ejemplo, sales de metales alcalinos hidrosolubles de ácidos grasos y/o sales de metales alcalinos insolubles en agua de ácidos grasos).

Agente(s) anticongelante(s)

- 5 [0134] En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender además uno o más agentes anticongelantes. Los ejemplos no limitativos de agentes anticongelantes incluyen etilenglicol, propilenglicol, urea, glicerina y combinaciones de los mismos.

MÉTODOS

- 10 [0135] Se describen métodos de uso de uno o más compuestos de estabilización microbiana para aumentar la supervivencia de uno o más microorganismos fijadores de nitrógeno. En una forma de realización particular, el método incluye la adición de uno o más compuestos de estabilización microbiana como se describe en la presente a una mezcla que comprende bencilhemiformal para inhibir la actividad antimicrobiana del bencilhemiformal. En una forma de realización particular, la mezcla es una composición de tratamiento de semillas.

- 15 [0136] Además, el método de uso de uno o más compuestos de estabilización microbiana para aumentar la supervivencia de uno o más microorganismos fijadores de nitrógeno comprende además el paso de adición de uno o más ingredientes beneficiosos para la agricultura como se describe en la presente. En una forma de realización, el paso de adición de uno o más ingredientes beneficiosos para la agricultura puede ocurrir antes, después o simultáneamente con el paso de adición de uno o más compuestos de estabilización microbiana a una mezcla. En todavía otra forma de realización, el paso de adición de uno o más ingredientes beneficiosos para la agricultura puede ocurrir antes, después o simultáneamente con el paso de adición de uno o más microbios a la mezcla.
- 20

EJEMPLOS

- [0137] Los ejemplos siguientes se proporcionan con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de las formas de realización reivindicadas en la presente. Se pretende que cualquiera de las variaciones en los ejemplos ejemplificados que se le ocurran a la persona experta en la materia caigan dentro del alcance de la presente descripción.
- 25

Materiales

[0138]

Agar YEM (g.l⁻¹)
Manitol (10,0)
K ₂ HPO ₄ (0,5)
Extracto de levadura (0,5)
MgSO ₄ .7H ₂ O, (0,2)
NaCl (0,007)
Agar YEM-PCNB - Rojo Congo - vancomicina (g.l⁻¹)
Manitol (10,0)
K ₂ HPO ₄ (0,5)
Extracto de levadura (0,5)
MgSO ₄ .7H ₂ O, (0,2)
NaCl (0,007)
Rojo Congo (0,04)
PCNB (0,2)
Vancomicina (0,001)
Solución salina*
NaCl 8,5 g

H ₂ O destilada
*Esterilizada mediante autoclave

Microbios
<i>Bradyrhizobium elkani</i> SEMIA 587
<i>Bradyrhizobium elkani</i> SEMIA 5019
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 5079
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 5080

Ejemplo 1

5 [0139] La actividad de un compuesto de estabilización microbiana, extracto de levadura, se evaluó para reducir los efectos del conservante bencil hemiformal (a una concentración que refleja la proporcionada por la recomendación actual para un insecticida comercial que incluye ese conservante).

10 [0140] Usando técnicas asépticas convencionales, se transfirieron 10 ml de un inoculante líquido comercial que contiene *B. elkani* SEMIA 587 y *B. elkani* SEMIA 5019 (Nitragin Optimize II, disponible comercialmente de Novozymes) a una serie de tubos de ensayo estériles, a los que se les añadió 0,7 ml de una solución al 2 % que contenía bencil hemiformal y, en los tubos correspondientes, se incorporó 0,3 g de extracto de levadura (disponible comercialmente de Merck). Un control de supervivencia bacteriana consistente en los inoculantes sin un compuesto estabilizante microbiano se evaluó para comparar. Los tratamientos se proporcionan en la tabla 1.

Tabla 1: Tratamientos

Tratamiento	Inoculante	Bencil hemiformal (concentración final)	Extracto de levadura (concentración final)
1	10 ml	0,14 % p/v	
2	10 ml	0,14 % p/v	0,03 % p/v
3	10 ml		

15 [0141] Los tubos se mezclaron usando un agitador vórtex, se transfirieron a un agitador orbital a 30 °C. Después de 20 minutos de incubación (tiempo 0), se tomaron muestras de 0,1 ml y se diluyeron 1/10 de forma convencional en una serie de tubos que contenían 0,9 ml de solución salina estéril (NaCl al 0,85 % en agua destilada). Se transfirieron a placas por triplicado 0,1 ml de las diluciones 10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷ en agar de extracto de levadura-manitol (YEM). Las placas se incubaron a 30 °C. Las colonias se contaron después de siete días de incubación. El número de unidades formadoras de colonias por ml (UFC ml⁻¹) se calculó teniendo en cuenta las diluciones transferidas a las placas y el volumen transferido a las placas. Las muestras se obtuvieron y se procesaron como antes en intervalos de dos horas. Los resultados se indican en la tabla 2.

Tabla 2: Efecto del extracto de levadura sobre la supervivencia del inoculante en presencia de bencil hemiformal a lo largo del tiempo

Tratamiento	0 h	2 h	4 h
1	3,00E+09	1,00E+08	ILD*
2	4,00E+09	3,50E+09	7,00E+08
3	3,40E+09	3,50E+09	3,00E+09

* ILD: inferior a los límites de detección (10⁶ CFU/ml)

[0142] Como se muestra en la tabla 2, el extracto de levadura reduce los efectos deletéreos inducidos por la presencia de bencil hemiformal a la concentración evaluada.

25 **Ejemplo 2**

[0143] El protocolo general descrito en el ejemplo 1 se modificó para procesar muestras más grandes. Se evaluó un insecticida comercial que contiene bencil hemiformal a concentraciones que emularían las dosis recomendadas tanto para el inoculante como para el insecticida.

[0144] En vez de tubos de ensayo se usaron erlenmeyers estériles de 250 ml que contenían agitadores magnéticos estériles. Los volúmenes de cada solución se proporcionan en la tabla 3. El insecticida comercial se transfirió a una serie de erlenmeyers y las cantidades declaradas de compuestos estabilizantes microbianos (extracto de levadura y peptona de harina de soja de Merck y triptófano de Ajinomoto) se premezclaron a 250 rpm durante 6 horas.

5

Tabla 3: Tratamientos

Tratamiento	Inoculante (30 ml)	Insecticida (30 ml)	Extracto de levadura (3 g)	Peptona de harina de soja (3 g)	Triptófano (1 g)
1	X	X			
2	X	X	X		
3	X	X		X	
4	X	X			X
5	X				

[0145] A cada uno de los matraces erlenmeyer correspondientes, se añadieron 30 ml de los inoculantes (como se describe en el ejemplo 1), se mezclaron y se obtuvieron muestras inmediatamente y en intervalos de 2 horas. Las muestras se procesaron como se describe en el ejemplo 1. Los resultados se proporcionan en la tabla 4.

10 Tabla 4: Efecto del extracto de levadura y la peptona de harina de soja sobre la supervivencia del inoculante en presencia de insecticida que contiene bencil hemiformal a lo largo del tiempo

Tratamiento	UFC/ml			
	0 h	2 h	4 h	6 h
1	2,00E+09	1,00E+08	ILD*	ILD*
2	3,30E+09	3,50E+09	2,00E+09	1,00E+09
3	3,40E+09	2,20E+09	3,00E+09	1,10E+09
4	4,00E+09	3,50E+09	4,20E+09	3,90E+09
5	3,40E+09	4,00E+09	3,33E+09	3,30E+09

*ILD: inferior a los límites de detección (10⁶ UFC/ml)

Como se muestra en la tabla 4, el extracto de levadura, la peptona de harina de soja y el triptófano reducen los efectos deletéreos inducidos por la presencia de un producto agroquímico que contiene bencil hemiformal sobre una población microbiana.

15 **Ejemplo 3**

[0146] Se usó extracto de levadura en un sistema de preinoculación a base de turba que contenía *B. elkani* SEMIA 587 y *B. elkani* SEMIA 5019 (Nitragin CTS200, disponible de Novozymes) y se evaluó la compatibilidad con productos agroquímicos que contienen bencil hemiformal para la estabilidad sobre las semillas. El tratamiento de semillas se realiza siguiendo el protocolo descrito en la presente.

20 [0147] Se premezcló extracto de levadura utilizando los agitadores magnéticos durante 6 horas con el producto agroquímico que contiene bencil hemiformal. Después de 6 horas, las semillas fueron tratadas. La tabla 5 describe los tratamientos de semillas correspondientes a 1 kg de semillas.

Tabla 5: Tratamientos

	Número de tratamiento	
	1	2
Nitragin CTS200	8,5 g	8,5 g
Insecticida que contiene bencil hemiformal	3 ml	3 ml
Extracto de levadura		0,3 g

[0148] Para los tratamientos que combinan inoculantes líquidos y otros productos (fungicidas, insecticidas, etc.), el tratamiento se preparó según las instrucciones y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante media hora antes de inocular las semillas.

5 [0149] Las semillas se colocaron dentro de una bolsa de polietileno y se añadió el tratamiento. Las semillas deben ocupar 1/3 del volumen total de la bolsa (inflada y cerrada). El contenido de la bolsa se mezcló enérgicamente con movimientos de rotación para una distribución apropiada de los productos de su interior.

10 [0150] La bolsa con las semillas inoculadas se abrió y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 4 horas y se realizaron recuentos de rizobios sobre las semillas. Para esto, se colocaron 100 semillas en un erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de solución salina y se sometieron a agitación durante 15 min usando un agitador magnético a aproximadamente 300 rpm. El sobrenadante se denomina dilución 10⁰. Se tomaron muestras de 1 ml y se diluyeron 1/10 de forma convencional en una serie de tubos que contenían 9 ml de solución salina estéril (NaCl al 0,85 % en agua destilada). Se transfirieron a placas por triplicado 0,1 ml de las diluciones 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴ sobre agar de extracto de levadura-manitol (YEM).

15 [0151] Luego se colocaron las semillas en bolsas de papel y se mantuvieron en una cámara a 30 °C hasta el final de la prueba. Se repitieron las determinaciones a las 24 y 48 horas después de la inoculación. Las placas se leyeron después de siete días y se comprobaron el día diez. Se contaron las placas que tenían entre 30 y 300 colonias y se comprobó la proporción entre diluciones. Se calculó el UFC.semilla⁻¹ según la fórmula (I). Los resultados se proporcionan en la tabla 6.

Fórmula (I):

$$\text{UFC.semilla}^{-1} = \text{N}^{\circ} \text{ de colonias contadas} \times 10 \times \text{factor de dilución}$$

20 Tabla 6: Efecto del extracto de levadura sobre la supervivencia microbiana sobre las semillas cuando se usan productos agroquímicos que contienen bencil hemiformal a lo largo del tiempo

Tratamiento	Días después del tratamiento (30 °C)		
	0	2	5
1	1,00E+05	1,60E+03	ILD*
2	5,40E+05	3,50E+05	2,30E+04

ILD *: inferior a los límites de detección (10² UFC/semilla)

[0152] Como se muestra en la tabla 6, la presencia de extracto de levadura mejora la recuperación microbiana en las semillas tratadas con productos agroquímicos que contienen bencil hemiformal.

Ejemplo 4

25 [0153] La actividad de un compuesto de estabilización microbiana, extracto de levadura, se evaluó para reducir los efectos del conservante bencil hemiformal (a una concentración que refleja la proporcionada por la recomendación actual para un insecticida comercial que incluye ese conservante).

30 [0154] Usando técnicas asépticas convencionales, se transfirieron 10 ml de un inoculante líquido comercial que contiene *B. japonicum* SEMIA 5079 y *B. japonicum* SEMIA 5080 (Nitragin CellTech HC, disponible comercialmente de Novozymes) a una serie de tubos de ensayo estériles, a los que se les añadió 0,7 ml de una solución al 2 % que contenía bencil hemiformal y, en los tubos correspondientes, se incorporó 0,3 g de extracto de levadura (disponible comercialmente de Merck). Un control de supervivencia bacteriana consistente en los inoculantes sin un compuesto estabilizante microbiano se evaluó para comparar. Los tratamientos se proporcionan en la tabla 7.

Tabla 7: Tratamientos

Tratamiento	Inoculante	Bencil hemiformal (concentración final)	Extracto de levadura (concentración final)
1	10 ml	0,14 % p/v	
2	10 ml	0,14 % p/v	0,03 % p/v
3	10 ml		

[0155] Los tubos se mezclaron usando un agitador vórtex, se transfirieron a un agitador orbital a 30 °C. Después de 20 minutos de incubación (tiempo 0), se tomaron muestras de 0,1 ml y se diluyeron 1/10 de forma convencional en una serie de tubos que contenían 0,9 ml de solución salina estéril (NaCl al 0,85 % en agua destilada). Se transfirieron a placas por triplicado 0,1 ml de las diluciones 10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷ en agar de extracto de levadura-manitol (YEM). Las placas se incubaron a 30 °C. Las colonias se contaron después de siete días de incubación. El número de unidades formadoras de colonias por ml (UFC ml⁻¹) se calculó teniendo en cuenta las diluciones transferidas a las placas y el volumen transferido a las placas. Las muestras se obtuvieron y se procesaron como antes en intervalos de dos horas. Los resultados se indican en la tabla 8.

Tabla 8: Efecto del extracto de levadura sobre la supervivencia del inoculante en presencia de bencil hemiformal a lo largo del tiempo

Tratamiento	0 h	2 h	4 h	6 h
1	3,10E+09	1,30E+08	ILD*	ILD*
2	3,80E+09	3,30E+09	5,00E+08	3,10E+08
4	3,40E+09	3,10E+09	3,00E+09	3,30E+09

* ILD: inferior a los límites de detección (10⁶ UFC/ml)

[0156] Como se muestra en la tabla 8, el extracto de levadura reduce los efectos deletéreos inducidos por la presencia de bencil hemiformal a la concentración evaluada.

Ejemplo 5

[0157] El protocolo general descrito en el ejemplo 4 se modificó para procesar muestras más grandes. Se evaluó un insecticida comercial que contiene bencil hemiformal a concentraciones que emularían las dosis recomendadas tanto para el inoculante como para el insecticida.

[0158] En vez de tubos de ensayo se usaron erlenmeyers estériles de 250 ml que contenían agitadores magnéticos estériles. Los volúmenes de cada solución se proporcionan en la tabla 9. El insecticida comercial se transfirió a una serie de erlenmeyers y las cantidades declaradas de compuestos estabilizantes microbianos (extracto de levadura y peptona de harina de soja de Merck y triptófano de Ajinomoto) se premezclaron a 250 rpm durante 6 horas.

Tabla 9: Tratamientos

Tratamiento	Inoculante (30 ml)	Insecticida (30 ml)	Extracto de levadura (3 g)	Peptona de harina de soja (3 g)	Triptófano (1 g)
1	X	X			
2	X	X	X		
3	X	X		X	
4	X	X			X
5	X				

[0159] A cada uno de los matraces erlenmeyer correspondientes, se añadieron 30 ml de inoculante (como se describe en el ejemplo 4), se mezclaron y se obtuvieron muestras inmediatamente y en intervalos de 2 horas. Las muestras se procesaron como se describe en el ejemplo 4. Los resultados se proporcionan en la tabla 10.

Tabla 10: Efecto del extracto de levadura y la peptona de harina de soja sobre la supervivencia del inoculante en presencia de insecticida que contiene bencil hemiformal a lo largo del tiempo

Tratamiento	UFC/ml			
	0 h	2 h	4 h	6 h
1	1,00E+09	1,00E+08	ILD*	ILD*
2	4,30E+09	3,50E+09	2,10E+09	1,00E+09
3	3,30E+09	2,60E+09	3,00E+09	1,30E+09
4	4,30E+09	3,70E+09	3,20E+09	3,30E+09
5	3,40E+09	3,10E+09	3,30E+09	3,30E+09

*ILD: inferior a los límites de detección (10⁶ UFC/ml)

[0160] Como se muestra en la tabla 10, el extracto de levadura, la peptona de harina de soja y el triptófano reducen los efectos deletéreos inducidos por la presencia de un producto agroquímico que contiene bencil hemiformal sobre una población microbiana.

Ejemplo 6

5 [0161] Se usó extracto de levadura en un sistema de preinoculación a base de turba que contiene *B. japonicum* SEMIA 5079 y *B. japonicum* SEMIA 5080 (disponible de Novozymes) y se evaluó la compatibilidad con productos agroquímicos que contienen bencil hemiformal para la estabilidad sobre las semillas. El tratamiento de semillas se realiza siguiendo el protocolo descrito en la presente.

10 [0162] El extracto de levadura se premezcló utilizando agitadores magnéticos durante 6 horas con el producto agroquímico que contiene bencil hemiformal. Después de 6 horas, las semillas fueron tratadas. La tabla 11 describe los tratamientos de semillas correspondientes a 1 kg de semillas.

Tabla 11: Tratamientos

	Número de tratamiento	
	1	2
Sistema de preinoculación a base de turba que contiene <i>B. japonicum</i> SEMIA 5079 y <i>B. japonicum</i> SEMIA 5080	8,5 g	8,5 g
Insecticida que contiene bencil hemiformal	3 ml	3 ml
Extracto de levadura		0,3 g

15 [0163] Para los tratamientos que combinan inoculantes líquidos y otros productos (fungicidas, insecticidas, etc.), el tratamiento se preparó según las instrucciones y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante media hora antes de inocular las semillas.

[0164] Las semillas se colocaron dentro de una bolsa de polietileno y se añadió el tratamiento. Las semillas deben ocupar 1/3 del volumen total de la bolsa (inflada y cerrada). El contenido de la bolsa se mezcló enérgicamente con movimientos de rotación para una distribución apropiada de los productos de su interior.

20 [0165] La bolsa con las semillas inoculadas se abrió y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 4 horas y se realizaron recuentos de rizobios sobre las semillas. Para esto, se colocaron 100 semillas en un erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de solución salina y se sometieron a agitación durante 15 min usando un agitador magnético a aproximadamente 300 rpm. El sobrenadante se denomina dilución 10°. Se tomaron muestras de 1 ml y se diluyeron 1/10 de forma convencional en una serie de tubos que contenían 9 ml de solución salina estéril (NaCl al 0,85 % en agua destilada). Se transfirieron a placas por triplicado 0,1 ml de las diluciones 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴ sobre agar de extracto de levadura-manitol (YEM).

30 [0166] Luego se colocaron las semillas en bolsas de papel y se mantuvieron en una cámara a 30 °C hasta el final de la prueba. Se repitieron las determinaciones a las 24 y 48 horas después de la inoculación. Las placas se leyeron después de siete días y se comprobaron el día diez. Se contaron las placas que tenían entre 30 y 300 colonias y se comprobó la proporción entre diluciones. Se calculó el UFC.semilla⁻¹ según la fórmula (I) proporcionada anteriormente. Los resultados se proporcionan en la tabla 12.

Tabla 12: Efecto del extracto de levadura sobre la supervivencia microbiana sobre las semillas cuando se usan productos agroquímicos que contienen bencil hemiformal a lo largo del tiempo.

Tratamientos	Días después del tratamiento (30 °C)		
	0	2	5
1	1,50E+05	6,60E+03	ILD*
2	3,40E+05	3,10E+05	2,50E+04
ILD *: inferior a los límites de detección (10 ² UFC/semilla)			

[0167] Como se muestra en la tabla 12, la presencia de extracto de levadura mejora la recuperación microbiana en las semillas tratadas con productos agroquímicos que contienen bencil hemiformal.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para aumentar la supervivencia de uno o más microorganismos fijadores de nitrógeno en una composición de tratamiento de semillas, donde el método comprende la adición de uno o más compuestos de estabilización microbiana seleccionados del grupo que consiste en extracto de levadura, peptonas y aminoácidos para inhibir la actividad antimicrobiana del bencilhemiformal.
2. Método según la reivindicación 1, donde el uno o más microorganismos fijadores de nitrógeno son diazótrofos bacterianos seleccionados de entre los géneros *Rhizobium spp.*, *Bradyrhizobium spp.*, *Azorhizobium spp.*, *Sinorhizobium spp.*, *Mesorhizobium spp.*, *Azospirillum spp.*, y combinaciones de los mismos.
- 10 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el uno o más microorganismos fijadores de nitrógenos es el diazótrofo bacteriano *Bradyrhizobium japonicum*.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde las peptonas son peptonas de soja.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el aminoácido es triptófano.