

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 684**

51 Int. Cl.:

C05F 11/08

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2008** **E 08748685 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015** **EP 2154121**

54 Título: **Composición biofertilizante**

30 Prioridad:

30.04.2007 CU 20070092

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.11.2015

73 Titular/es:

**CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y
BIOTECNOLOGÍA (100.0%)
AVENIDA 31 ENTRE 158 Y 190 CUBANACÁN
PLAYA
CIUDAD DE LA HABANA 10600, CU**

72 Inventor/es:

**MENA CAMPOS, JESÚS;
PIMENTEL VÁZQUEZ, EULOGIO;
MARÍN BRUZOS, MARIETA;
HERNÁNDEZ GARCÍA, ARMANDO TOMÁS;
SÁNCHEZ ORTIZ, ILEANA;
RAMÍREZ NÚÑEZ, YAMILKA;
GONZÁLEZ BLANCO, SONIA;
GARCÍA SIVERIO, MARIANELA y
BORROTO NORDELO, CARLOS GUILLERMO**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 551 684 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición biofertilizante.

5 Campo técnico

La presente invención se relaciona con el campo de la microbiología del suelo y la aplicación de biofertilizantes microbianos capaces de favorecer y estimular el crecimiento de las plantas sin afectar el medio ambiente.

10 Técnica anterior

Los biofertilizantes se definen como productos a base de microorganismos que viven normalmente en el suelo. Al incrementar sus poblaciones por medio de inoculación artificial, la respuesta es que estos microorganismos potencian su actividad biológica y por lo tanto, suministran a las plantas importantes nutrientes que mejoran su crecimiento. Además, los microorganismos suministran a las plantas sustancias hormonales que son esenciales para su desarrollo (Martínez J. S. y otros, 1985. "Manual Práctico de Microbiología". Ed: Pueblo y Educación, Cuba).

Sobre este tema se han realizado diversos estudios, particularmente sobre un grupo de microorganismos bien conocidos que se analizan a continuación:

20 Se considera que la fijación simbiótica del nitrógeno, propia del género *Rhizobium*, es una de las alternativas más viables para recuperar nitrógeno y regresarlo al ecosistema. Se ha estimado que 175 toneladas de nitrógeno al año se fijan biológicamente; de las cuales el 70% va al suelo (Burity HA y otros, 1989. Estimation of nitrogen fixation and transfer from alfalfa to associated grasses in mixed swards under field conditions. *Plant and Soil*, 114:249-255). Cincuenta por ciento de estos proviene de asociaciones nodulares como las causadas por *Rhizobium* (Carrera My otros, 25 2004. "Nodulación natural en leguminosas silvestres del Estado de Nuevo León").

La fijación simbiótica de nitrógeno ocurre cuando la bacteria (*Rhizobium*) reconoce a su hospedero y lo infecta a través de los pelos radicales y en la matriz de las células corticales, induciendo así una meiosis y mitosis acelerada. Esto conduce a un tejido hipertrofiado: "el nódulo", una estructura típica de las raíces de las leguminosas. Dentro de este nódulo el *Rhizobium* pierde su pared celular y se transforma en un bacteroide que por la acción de su enzima nitrogenasa, fija el nitrógeno (N₂), y lo convierte en amonio (NH₃), este último es transferido al ribosoma vegetal para la síntesis de proteínas. Al mismo tiempo, la leguminosa, mediante la fotosíntesis, reduce el CO₂ en carbohidratos que servirán como una fuente de carbono y energía para *Rhizobium*, y con esto lo mantiene activo en el nódulo y cubre así las necesidades de nitrógeno de las plantas (Bauer T, 2001. "Microorganismos Fijadores de Nitrógeno: familia Rhizobiaceae". En: <http://www.microbiologia.com.ar/suelo/rhizobium.html>). Esta constituye la asociación más elaborada y eficiente entre plantas y microorganismos. Por esta razón ha sido la más estudiada hasta el momento.

Las bacterias del género *Azotobacter*, forman un grupo especial de microorganismos fijadores de nitrógeno. En tanto se trata de los únicos que son unicelulares y, aparentemente, pueden fijar nitrógeno en condiciones aerobias (Andresson AJ y otros, 1994. "Efecto de la inoculación con *Azotobacter* y MVA en vitroplantas de ñame (*Dioscorea alata*)". Cultivos Tropicales, 15 (3): 66). Desde el punto de vista histórico, es de hecho el *Azotobacter*, el microorganismo que se ha utilizado en la agricultura de una forma más amplia. Las primeras aplicaciones de estas bacterias datan de 1902, alcanzando una amplia utilización durante las décadas del 40, 50 y 60, particularmente en los países de Europa del Este (González J y Lluch C., 1992. "Biología del Nitrógeno. Interacción Planta-Microorganismo". Ed. Rueda, Madrid, España).

Otros microorganismos biofertilizantes lo constituyen varias cepas del género *Pseudomonas*, que contribuyen al aumento de la disponibilidad de fósforo asimilable (Lawrence A. R., 2002. Biofertilizers for rice cultivation. Agricultural Universities of India. En: http://www.hinduonnet.com/thehindu/seta/2002/04/04/stories/20020404001_20400.htm).

50 La aplicación combinada de tres especies de bacterias: *Bacillus pumilus* Meyer y Gotheil, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn y *Curtobacterium flaccumfaciens* (Hedges) Collins y Jones, a semillas de pepino (*Cucumis sativus*, L.), proporcionó mejores resultados en comparación con la inoculación de cada una separadamente (Raupach GS y Kloepper JVV., 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological testigo of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, 88:1158-1164).

Se ha informado sobre el efecto positivo de las cepas de hongos micorrizógenos, combinados con *Azotobacter* sp. y humus de lombriz, sobre el crecimiento de posturas de café (*Coffea arabica*). La combinación de *Glomus fasciculatum* y *Glomus peúu* con *Azotobacter* resultaron superiores a los tratamientos controls (Sánchez C. y otros, 1994. "Utilización de las Micorrizas VA y *Azotobacter* sp. en la producción de posturas de *Coffea arabica* L." *Cultivos Tropicales*, 15 (3): 69).

En los cultivos de tomate, acelga, lechuga, habichuela y rábano, estos se inocularon con *Glomus* sp. Y *Azotobacter*, con resultados positivos lo que corroboró la eficacia de esta combinación de microorganismos lo que demuestra claramente que ambos funcionaron de forma sinérgica (cuando se añadieron simultáneamente) (Terry E. y otros, 2000. "Efectividad de *Azotobacter chroococcum* y HFMA en diferentes cultivos hortícolas en condiciones de organopónico". XII Seminario Científico, Programa y Resúmenes. La Habana. INCA, 117).

La actividad nematocida de *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924, se reportó anteriormente como útil en el testigo de parásitos de animales y plantas (Mena J. y otros, Patente EP 0774906 B1 y EP 1 356 733 A2). El testigo biológico de los nemátodos es una alternativa eficaz al uso de los pesticidas químicos en la agricultura. El mecanismo de acción de este bionematicida, se ha relacionado con el efecto combinado de actividades de desulfurasa y quitinasa sobre los nemátodos y sus huevos. Hasta la fecha, no se conoce ningún otro beneficio de su aplicación a los cultivos, que no se derive de su acción directa sobre los nemátodos.

Independientemente del efecto inmediato de los fertilizantes químicos sobre el crecimiento de las plantas, estos generan trastornos nutricionales y efectos colaterales indeseados en el suelo. Es por ello que existe la necesidad de obtener nuevos biofertilizantes. Su objetivo es promover el crecimiento y desarrollo de las plantas sin causar consecuencias dañinas indeseadas, al ambiente y al hombre.

Descripción detallada de la invención

La presente invención resuelve el problema antes planteado, al proveer de una composición biofertilizante que comprende al menos una cepa de *Tsukamurella paurometabola*, o un mutante derivado de la misma, o un metabolito derivado de dicha cepa, en un portador apropiado como se especifica en las reivindicaciones. Todo esto tiene el efecto de estimular el crecimiento y el desarrollo fenológico de las plantas. Además, la mencionada composición contribuye a aumentar la fertilidad del suelo, y condiciona el mismo para un desarrollo más favorable de las plantas.

En una realización básica, la invención de composición biofertilizante comprende la bacteria conocida como *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924 (Mena J. y otros, 2003. Biotecnología Aplicada 20(4):248-252) cuya capacidad de incidir positivamente en la fenología de diversas especies de plantas cultivadas, se demuestra. En consecuencia, con los resultados obtenidos, se hace posible establecer un método para estimular el desarrollo de las plantas basado en el uso de un biofertilizante de uso agrícola que optimiza el aprovechamiento de la materia orgánica por las plantas, al favorecer así, la asimilación del nitrógeno y el fósforo, elementos relacionados con la actividad de *T. paurometabola* cepa C-924 en el suelo o en un sustrato natural o artificial. Adicionalmente, se eliminan o disminuyen las aplicaciones de fertilizantes químicos al suelo. Independientemente al efecto inmediato sobre el desarrollo de las plantas que estos fertilizantes ejercen, generan otros desórdenes nutricionales y efectos colaterales indeseados.

El efecto bioestimulador de *T. paurometabola* sobre las plantas se genera a partir de la producción de amoníaco (NH₃), asociada al crecimiento de esta bacteria sobre la materia orgánica y aminoácidos presentes en el suelo o el sustrato que soporta a las plantas, o sobre la materia orgánica y aminoácidos adicionados en cualquier mezcla, que se aplique simultáneamente o en combinaciones con esta bacteria. Al mismo tiempo, el microorganismo interviene en la solubilización del fósforo, convirtiéndolo de no asimilable a asimilable por las plantas.

La aplicación de *T. paurometabola* cepa C-924 al suelo, sobre un sustrato orgánico (artificial o natural) o en un portador de materia orgánica y/o aminoácidos, se realiza mediante una suspensión celular que posee entre $1,0 \times 10^7$ unidades formadoras de colonias (ufc)/mL y $5,0 \times 10^{12}$ ufc/mL o mediante un polvo concentrado de aproximadamente 10^{12} ufc/g de composición.

La composición que comprende *T. paurometabola* cepa C-924 (soportada por materia orgánica, aminoácidos y otros portadores orgánicos), aplicada en combinación con otros biofertilizantes y bioestimuladores, o de manera independiente, favorece el desarrollo de las plantas de igual o mejor forma que otros microorganismos promotores del crecimiento vegetal empleados en la agricultura.

Con los resultados obtenidos, se hace posible establecer un método como se define en las reivindicaciones para estimular el crecimiento de las plantas basado en el uso de un agente biofertilizante de uso agrícola que optimiza el aprovechamiento de la materia orgánica por las plantas, al favorecer la asimilación del nitrógeno y el fósforo, elementos relacionados con la actividad de *T. paurometabola* cepa C-924 en el suelo o en un sustrato natural o artificial.

En otra modalidad de la invención, el metabolito comprendido en la composición biofertilizante puede obtenerse por vía natural, recombinante o sintética. La composición biofertilizante de la presente invención puede tener varios tipos de portadores, tales como: un fertilizante orgánico, un suelo pre-empacado, un recubridor de semillas, un polvo, un granulado, un nebulizador, un líquido, una suspensión, o cualquiera de las variantes expuestas anteriormente en forma encapsulada.

En otra implementación de la invención, la cepa de *T. paurometabola*, se combina o mezcla con otros microorganismos biofertilizantes, como *Bacillus subtilis*, *Rhizobium leguminosarum*, *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Glomus fasciculatum* y *Glomus clarum*, o un mutante derivado de dichos organismos, así como cualquier principio activo o metabolito obtenido a partir de dichas cepas por vía natural, recombinante o sintética, en un portador apropiado. Es también objeto de la presente invención un método para estimular el crecimiento de las plantas, caracterizado porque comprende a) obtener un agente biofertilizante que comprende un cultivo de una cepa de una cepa de *Tsukamurella paurometabola* o un metabolito derivado de dicha cepa, obtenido por vía natural, recombinante o sintética y b) contactar el suelo o un sustrato natural o artificial con una cantidad efectiva de dicho biofertilizante o del metabolito derivado de

dicha cepa. En una modalidad de la invención, el método antes mencionado se caracteriza porque la cepa de *Tsukamurella paurometabola* es la cepa C-924. En el método para estimular el crecimiento de las plantas la cantidad efectiva del agente biofertilizante que se aplica sobre suelo o sustrato en suspensión acuosa está en una concentración de aproximadamente entre 10^6 y 10^9 ufc por mililitro de suspensión, y el agente biofertilizante es aplicado al menos una vez en el suelo o mezclado con el sustrato.

El agente biofertilizante y el método de estimular el crecimiento de las plantas de la presente invención es efectivo tanto para plantas que se emplean con el objetivo de obtener alimentos para los seres humanos, como las frutas y vegetales, como para plantas que se obtienen para alimento animal, como pastos, cereales, etc. También es aplicable a las plantas que se cultivan con propósitos ornamentales.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Cinética de formación de amoníaco durante el cultivo de *T. paurometabola* C-924 en un biorreactor de 5 L. La temperatura de trabajo fue 28°C y el pH inicial fue igual a 7,0 con una agitación de 500 rpm.

Figura 2. Correlación obtenida entre el amoníaco acumulado y el peso seco de la biomasa producida en el biorreactor de 5 L en las condiciones antes mencionadas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Amoníaco producido por la bacteria *T. paurometabola* cepa C-924, cultivada en un biorreactor de 5 L.

Una vez creadas las condiciones, se procedió al cultivo de la cepa de *T. paurometabola* C-924 en biorreactor de 5 L. La temperatura se ajustó a 28°C con una velocidad de agitación de 500 rpm. Las muestras de medio de cultivo se tomaron a diferentes intervalos de tiempo durante la fermentación (2, 4, 6, 8, 10, 12 y 13 h). Cinco mL de cada muestra (por triplicado) fueron centrifugados y filtrados a través de filtro de $0,2\ \mu\text{m}$. El filtrado resultante fue sometido al análisis de amonio por el método del reactivo de Nessler. Para la determinación espectrofotométrica, en un espectrofotómetro Pharmacia-Biotech, se utilizó una longitud de onda de 450 nm.

La producción de amoníaco durante el cultivo de *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924 se representa en la Figura 1, que muestra la cinética de formación de amoníaco en el biorreactor de 5 L (hasta las 14 horas de cultivo). La temperatura de trabajo fue 28°C , y el pH inicial fue 7,0. Se apreció una producción de amoníaco, asociado al crecimiento de C-924, lo cual demuestra la capacidad de desanimación oxidativa del microorganismo de manera constitutiva en presencia de sustrato aminoacídico. Se apreció el consecuente aumento del pH (en el tiempo) alcanzándose valores cercanos a 9,0, y concentraciones de NH_3 de hasta $934\ \mu\text{g/mL}$. Por lo que puede considerarse a *T. paurometabola* cepa C-924, como alta productora de amoníaco al compararla con otros microorganismos (Hoffmann T., 1998. Ammonification in *Bacillus subtilis* utilizing dissimilatory nitrite reductase is dependent on resDE. Journal of Bacteriology, vol. 180, 1: 186-189; Takahasi N., 2000. Metabolic Pathways for cytotoxic end product formation from glutamate and aspartate containing peptides by *Porphyromonas gingivalis*. Journal of Bacteriology, vol. 182, 17: 4704-4710).

La producción de NH_3 debe sustentarse en el proceso de desaminación oxidativa que sufren los aminoácidos componentes del medio de cultivo (Vanhook JL y otros, 1999. Phenylalanine dehydrogenase from *Rhodococcus* sp. M4: high-resolution X-ray analyses of inhibitory ternary complexes reveal key features in the oxidative deamination mechanism. *Biochemistry*, 38: 2326-2329; Paustian T., 2001. Microbiology Webbed Out. University of Wisconsin, Madison). Es importante señalar que mediante este proceso, los aminoácidos se desaminan rindiendo amoníaco y un residuo de carbono (un α -cetoácido), al necesitarse más carbono energético que nitrógeno asimilable generalmente ocurre una acumulación de amoníaco en el medio (Salle A J, 1966. Bacteriología. Edición Revolucionaria, La Habana, Cuba). Presumiblemente, este mecanismo se ajusta a lo ocurrido en el proceso de acumulación de amoníaco para *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924.

En la Figura 2 se muestra la correlación experimental obtenida entre los niveles de amoníaco en el medio extracelular y la concentración celular expresada como peso seco de la biomasa producida en el biorreactor de 5 L. Ocurre una relación lineal entre ambas variables, lo cual indica una producción de NH_3 asociada al crecimiento del microorganismo cuya velocidad es constante respecto a la concentración de biomasa.

Ejemplo 2. Solubilización de fosfatos por *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924.

El fósforo es uno de los principales nutrientes para el desarrollo de las plantas, pero en muchas ocasiones se encuentra en forma insoluble en el suelo. Un alto porcentaje de los fosfatos inorgánicos aplicados al suelo como fertilizantes son rápidamente inmovilizados luego de su aplicación y se mantienen en formas no disponibles para las plantas. Es por ello que, la liberación de estas formas insolubles de fósforo es un aspecto importante para incrementar la disponibilidad de este elemento en los suelos.

Con propósitos experimentales, se sembró la cepa C-924 en medio NBRIP (Nautiyal C., 1999. An efficient

microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 265-270), útil para determinar microorganismos solubilizadores de fosfatos. Se incubó a 30 °C por 10 días. Transcurrido este tiempo, se observó el halo transparente característico en el medio.

- 5 Se ha demostrado que muchos aislamientos que no muestran halo en medio sólido o hacen un halo muy pequeño solubilizan fosfatos insolubles en medio líquido (Leyval C y Barthelin J., 1999. *Plant Soil*, 17: 103-110). Es por ello que, se procedió a realizar el ensayo en medio líquido. Como testigo positivo, se empleó *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 25922.
- 10 Se sembraron las dos cepas separadamente en medio NBRIP líquido, y se incubaron a 30 °C con agitación de 180 rpm durante 5 días. También, se empleó medio estéril (sin inocular) para validar el ensayo. Se tomaron muestras cada 24 horas. Los cultivos de cada muestra se centrifugaron a 3000 rpm por 25 minutos y el sobrenadante se filtró en un filtro de 0,45 µm. Se determinó, en cada caso, la concentración de fosfatos solubles mediante el método de Fiske y Subbarow (Fiske H y Subbarow Y, 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375-400). Los datos se muestran en la Tabla 1. Aunque ambos microorganismos mostraron la capacidad de solubilizar fosfatos, *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924 resultó más eficiente.

Tabla 1. Resultados de las mediciones de solubilización de fosfatos por las cepas en estudio.

Tiempo (días)	Cepa C-924	Cepa ATCC 25922
0	0,0	0,00
1	26,52	25,57
2	39,34	33,22
3	75,16	38,20
5	95,19	44,40

Ejemplo 3. Efecto de una composición biofertilizante que comprende *T. paurometabola* C-924 sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas de plátano (*Musa sp.* híbrido, cultivar "Macho").

- 30 Se seleccionó un "suelo tipo Pardo Mullido Medianamente Carbonatado" (Instituto de Suelos, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministerio de la Agricultura. Editorial AGRINFOR, Cuba). El suelo se tamizó por una malla con orificios de 0,5 cm (diámetro) para eliminar partículas indeseables. Se aplicó un 5 % de humus de lombriz al suelo para elevar el contenido de materia orgánica del suelo sobre 3 % de materia orgánica lábil y 12 % de materia orgánica total.

- 35 Posteriormente, se llenaron las macetas de 15 cm de diámetro superior y 1,0 L de capacidad, para ser empleadas en los experimentos de actividad biológica. Se emplearon plántulas procedentes de cultivo *in vitro* de plátano (*Musa sp.* híbrido, cultivar "Macho") que fueron plantadas en las macetas. Se utilizaron 10 réplicas, en cada uno de los siguientes tratamientos:

- 40 1- Testigo: Medio Luria Bertani (LB) + H₂O a concentración 1/1000, aplicado a 50 mL/maceta.
 2- *Bacillus subtilis* cepa F16/95 [ajustado a 1×10^7 esporas/mL], aplicada a 50 mL/maceta.
 3- *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924 [ajustado a 1×10^7 ufc/mL], aplicada a 50 mL/maceta.

- 45 La evaluación final se efectuó a los 3 meses de iniciado el experimento, dirigida a los parámetros: peso del follaje, peso de las raíces y la suma total, en gramos.

El experimento se llevó a cabo en un invernadero con condiciones semicontroladas.

- 50 Se aplicó el Análisis de Varianza (ANOVA) a los datos obtenidos de los pesos. Para conocer entre qué tratamientos se encontraban diferencias significativas ($p < 0,05$), se aplicó La prueba de rangos múltiples de Tukey. Además, se empleó el programa SYSTAT 7.0 para Windows para la ejecución de los cálculos estadísticos. Los resultados obtenidos a los tres meses de la aplicación de los tratamientos y del trasplante, fueron los siguientes:

55 Tabla 2. Medias de las mediciones en 10 plantas.

Peso (gramos)	Testigo	C-924	F 16/95
Raíz	3.3 ^b	26.8 ^a	30 ^a
Follaje	10.9 ^b	47.9 ^a	59.4 ^a
Total	14.2 ^b	74.7 ^a	89.4 ^a

Medias con letras distintas difieren significativamente entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Tukey, para $p \leq 0,05$.

Los dos microorganismos empleados produjeron un incremento significativo en el crecimiento de las plantas de plátano. No se observaron diferencias en el crecimiento entre los tratamientos con *T. paurometabola* cepa C-924 y con *Bacillus subtilis* cepa F16/95 (bacteria que se empleó como testigo positivo). Esta última es conocida como promotor del crecimiento de las plantas (Mc Spadden B B y Fravel D R, 2002. Biological testigo of Plant Pathogens: Research, Commercialization, and Application in the USA. En: http://www.phcrnexus.com.mx/apsnet_biological_control.html).

Ejemplo 4. Efecto de *Tsukamurella paurometabola* C-924 sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas de banano (*Musa* sp. Híbrido, cultivar Cavendish,).

Se seleccionó un "suelo tipo Pardo Mullido Medianamente Carbonatado" (Instituto de Suelos, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministerio de la Agricultura. Editorial AGRINFOR, Cuba). Dicho suelo se tamizó por una malla con orificios de 0,5 cm (diámetro) para eliminar partículas indeseables. Se aplicó un 5 % de humus de lombriz al suelo para llevar el suelo a 3 % de materia orgánica lábil y 12 % de materia orgánica total. Posteriormente, se llenaron las macetas de 15 cm de diámetro superior y 1,0 L de capacidad, para ser empleadas en los experimentos de actividad biológica. Se emplearon plántulas procedentes de cultivo de tejido *in vitro* de banano (*Musa* sp. híbrido, cultivar Cavendish,) plantadas en las macetas. Se utilizaron 10 réplicas en cada uno de los siguientes tratamientos:

- 1- Testigo: Medio Luria Bertani (LB) + H₂O a concentración 1/1000, aplicado a 50 mL/maceta.
- 2- *Bacillus subtilis* cepa F16/95 [ajustada a 1×10^7 esporas/mL], aplicada a 50 mL/maceta.
- 3- *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924 [ajustada a 1×10^7 ufc/mL], aplicada a 50 mL/maceta.

La evaluación final se efectuó a los 5 meses de iniciado el experimento, dirigida a los parámetros: peso del follaje, peso de las raíces y la suma total, en gramos. El experimento se llevó a cabo en un invernadero con condiciones semicontroladas.

Se aplicó el Análisis de Varianza (ANOVA) a los datos obtenidos de los pesos. Para conocer entre qué tratamientos se encontraban las diferencias significativas ($p < 0,05$), se aplicó la prueba de rangos múltiples de Tukey. Además, se empleó el programa SYSTAT 7.0 para Windows para la ejecución de los cálculos estadísticos. Los resultados obtenidos a los 5 meses de la aplicación de los tratamientos y del trasplante, fueron los siguientes:

Tabla 3. Medias de las mediciones en 10 plantas.

Peso (gramos)	Testigo	C-924	F 16/95
Raíz	25,06 ^b	31,34 ^a	36,04 ^a
Follaje	42,48 ^b	65,12 ^a	63,32 ^a
Total de la planta	67,54 ^b	96,46 ^a	99,36 ^a

Medias con letras distintas difieren significativamente entre sí, según la prueba de rangos múltiples de Tukey, para $p \leq 0,05$.

Al igual que en el Ejemplo 3, los dos microorganismos empleados provocaron un incremento significativo en el crecimiento de las plantas de plátano. No hubo diferencias entre el tratamiento con la cepa C-924 y el tratamiento con la cepa F 16/95 empleada como control.

Ejemplo 5. Efecto de *Tsukamurella paurometabola* C-924 sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas de soya (*Glycine max*). (no es parte de la invención)

Se seleccionó un "suelo tipo Ferralítico Rojo" (Instituto de Suelos, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministerio de la Agricultura. Editorial AGRINFOR, Cuba). Dicho suelo se tamizó por una malla con orificios de 0,5 cm (diámetro) para eliminar partículas indeseables. El suelo presentaba un contenido de 2,6 % de materia orgánica lábil y 10,7 % de materia orgánica total.

Se llenaron macetas de 15 cm de diámetro superior y 1,0 L de capacidad, para ser empleadas en los experimentos de actividad biológica. Se emplearon semillas pregerminadas de soya (*Glycine max*). Las semillas se sembraron en número de tres por macetas. Se utilizaron 20 macetas con tres plantas cada una en cada uno de los siguientes tratamientos:

- 1- Testigo: Medio Luria Bertani (LB) + H₂O a concentración 1/1000, aplicado a 100 mL/maceta.
- 2- *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924 [ajustada a 1×10^6 ufc/mL], aplicada a 100 mL/maceta.

Los tratamientos se aplicaron un día antes de sembrar las semillas pregerminadas. La evaluación se efectuó a los 7 días posteriores a la siembra, se cuantificaron los siguientes parámetros: peso de las raíces, de los tallos y de las hojas así como el peso total de la planta (en gramos). Se evaluaron las plantas de 10 macetas (30 en total). El experimento se llevó a cabo en un invernadero con condiciones semicontroladas. Se aplicó el Análisis de Varianza (ANOVA) a los datos obtenidos de los pesos. Para conocer entre qué tratamientos se encontraban las diferencias significativas ($p < 0,05$), se aplicó la prueba de rangos múltiples de Tukey. Además, se empleó el programa SYSTAT 7.0 para Windows para la ejecución de los cálculos estadísticos.

Los resultados de los valores medios (por plantas) de los pesos frescos en cada evaluación y su significación se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Medias de las mediciones en 30 plantas.

Tratamiento	Peso raíces (g)	Peso tallos (g)	Peso hojas (g)	Peso planta (g)
Control	0,388	0,783	0,564	1,735
C-924	0,367	1,066	0,680	2,113

A los 7 días de crecimiento, se observaron diferencias significativas entre las plantas, tales como: incremento de los pesos frescos en tallos y hojas y en el peso total de las plantas. En consecuencia, se concluye que el tratamiento con la composición que comprende la cepa C-924, arrojó resultados satisfactorios en la estimulación del crecimiento y desarrollo de las plantas.

Ejemplo 6. Efecto de *Tsukamurella paurometabola* C-924 sobre el crecimiento de las plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. variedad FA-180) en condiciones de semillero.

Se utilizó una casa de cultivos protegidos adaptada para el desarrollo de los semilleros de hortalizas. Como sustrato para el semillero, se empleó una mezcla de humus de lombriz (50 %), turba (25 %) y zeolita (25 %).

Se emplearon dos tratamientos del sustrato, tres días antes de sembrar las semillas pregerminadas:

- Tratamiento con una suspensión concentrada ($5,0 \times 10^{11}$ ufc/mL) de *T. paurometabola* cepa C-924 a razón de 20 mL por 100 Kg de sustrato. Se usó una bomba de aspersión manual a la que se le añadió 10 L de agua para hacer homogénea la distribución de la suspensión bacteriana.
- Tratamiento testigo tratado sólo con agua.

A los 22 días de la siembra, cuando las plántulas estaban listas para el trasplante, se midió la altura de 40 plántulas de cada tratamiento. Las plantas se seleccionaron al azar, en grupos de a 10 en diferentes lugares del semillero. En la Tabla 5 se resumen los valores de las medias de las alturas por plantas. Se observan las diferencias significativas ($p \leq 0,05$, ANOVA) entre las tallas obtenidas en ambos tratamientos, y se aprecia una clara influencia de la cepa C-924. El efecto promotor del crecimiento de dicha cepa fue sustancial para las posturas de tomate sobre un sustrato con alto contenido de materia orgánica.

Tabla 5. Medias de las mediciones en 40 plantas.

Tratamiento a las posturas	Media de la altura a los 22 días (cm)
Tratadas con C-924	16,22
Testigos	13,57

Ejemplo 7. Efecto de *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924 sobre el crecimiento y otros parámetros fenológicos de las plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill, variedad FA-180) en condiciones de campo.

Se utilizó una casa de cultivos protegidos (0,09 ha de superficie) en un "suelo tipo pardo sin carbonato" (Instituto de Suelos, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministerio de la Agricultura. Editorial AGRINFOR, Cuba). Dicho suelo tenía un contenido de materia orgánica lábil del 3 % y de materia orgánica total del 12 %. Para ello, se dividió la casa en 16 parcelas donde se estableció un diseño experimental con cuatro tratamientos e igual número de réplicas. El procedimiento fue el siguiente:

- Tratamiento con una suspensión concentrada ($5,0 \times 10^{11}$ ufc/mL) de *T. paurometabola* cepa C-924 a razón 10 L/ha, aplicada por el sistema de fertirriego. Esto se hizo siete días antes del trasplante.

- Tratamiento con una suspensión concentrada ($5,0 \times 10^{11}$ ufc/mL) de *T. paurometabola* cepa C-924 en una relación 4 L/ha, aplicada por el sistema de fertirriego. Esto se hizo 7 días antes del trasplante.
- Tratamiento químico: Basamid (Dazomet) a 600 Kg/ha.
- Testigo (sin tratamiento químico ni biológico).

Los dos tratamientos con la cepa C-924 se realizaron mediante una bomba auxiliar al sistema de riego localizado por goteo, con una norma de entrega total de riego de 1 L por metro cuadrado de acuerdo a los parámetros establecidos para el fertirriego en los cultivos protegidos (Casanova A., 1999. "Guía técnica para la producción protegida de hortalizas en Casas de Cultivo tropical con efecto de sombrilla". MINAGRI, Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova", Cuba).

A los 15 días del trasplante, se realizaron mediciones y conteos (a 10 plantas por parcela) en los siguientes parámetros:

- Altura de las plantas (cm).
- Número de foliolos por planta.
- Grosor de la base del tallo (mm).
- Número de racimos florales por planta.
- Número de flores por planta.

En la Tabla 6 se muestra un resumen de los resultados. De hecho, se estableció claramente que fueron significativamente superiores la altura, el número de foliolos y el número de flores en los dos tratamientos donde se empleó la cepa C-924 (en dos dosis diferentes). Por lo tanto, las propiedades promotoras de este agente biofertilizante están más allá de cualquier duda.

Tabla 6. Valores promedio de las mediciones aplicadas a 10 plantas.

Tratamiento	Altura (cm)	Foliolos	Grosor (mm)	Racimos	Flores
C-924, 10 L/ha	36,39 ^a	8,78 ^a	10,33 ^a	1,15 ^{ab}	6,53 ^{ab}
C-924, 4L/ha	36,03 ^a	9,08 ^a	9,83 ^{ab}	1,33 ^a	8,13 ^a
Testigo	25,42 ^b	7,50 ^b	9,70 ^{ab}	1,03 ^{bc}	4,58 ^c
Bas. 600 Kg/ha	29,10 ^b	7,85 ^b	8,65 ^b	0,93 ^c	5,23 ^b

Medias con letras diferentes en cada parámetro difieren significativamente según la prueba de Tukey, ($p \leq 0,05$).

Ejemplo 8. Comparación e interacción de *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924 con *Rhizobium leguminosarum* en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Cada tratamiento constó de cinco réplicas y cuatro plantas por réplica. Las semillas se sembraron a razón de una semilla por nido, cuatro nidos por maceta y a una profundidad de 3 cm en macetas de 1 L de capacidad. Para cada unidad experimental o maceta se utilizó 1,2 kg de "suelo tipo Pardo con Carbonatos" (Instituto de Suelos, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministerio de la Agricultura. Editorial AGRINFOR, Cuba), con un contenido de materia orgánica lábil de 3,74 % y de materia orgánica total de 14,2 %, más fósforo soluble: 19,14 mg de $P_2 O_5$ /100 g de suelo.

El experimento se llevó a cabo en un invernadero con condiciones semicontroladas. Los tratamientos fueron los siguientes:

1. Testigo sin inocular.
2. *T. paurometabola* cepa C-924 se inoculó 7 días antes y 7 días después de la siembra. La dosis aplicada fue de 100 mL por maceta con una concentración de 1×10^9 ufc/mL
3. Se inoculó *R. leguminosarum* (con una concentración de $2,5 \times 10^8$ ufc/mL en solución sólida) mezclada con humus previamente tamizado. La cantidad alcanzó 1 kg de biofertilizante por 45 kg de semilla.
4. Combinación de los tratamientos 2 y 3.

A cada maceta se le aplicó la fertilización necesaria de acuerdo a los contenidos de P_2O_5 y K_2O del suelo, según las recomendaciones agroquímicas del "Instituto de Suelos" (Cuba). Los portadores utilizados fueron: Urea, Superfosfato Triple (SFT) y Cloruro de Potasio (KCl), para nitrógeno, fósforo y potasio, respectivamente. La fertilización se realizó cuatro días antes de la siembra (en el caso de fósforo y potasio) y en el caso de la urea, se aplicó a los 15 días después de la germinación. Para este cultivo, la fertilización se aplicó a razón de 217 kg/ha. Mientras que para SFT, y KCl, la fertilización llegó a 11,5 kg/ha y 60 kg/ha, respectivamente.

Las variables fenológicas evaluadas fueron el número de hojas cada siete días así como su peso seco (MINAG, 1988. Suelos. Análisis Químico. "Determinación de peso seco, materia orgánica y los índices del grado de acidez". NRAG. 892

y 878, Cuba). Las variables se evaluaron estadísticamente mediante un ANOVA (de clasificación simple). Se aplicó la prueba de comparación múltiple de Duncan para comparar las medias de los tratamientos (valores medios). Se aplicó el paquete estadístico SPSS versión 8.0 (1997) lo que dio como resultado las mediciones que se resumen en la Tabla 7.

5 Tabla 7. Resultados de la aplicación de las cepas inoculadas sobre los parámetros fenológicos en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

Tratamiento	Nº Hojas, 36 días	Materia seca (%), 43 días
Testigo	7,20 ^c	5,91 ^b
C-924	12,10 ^a	6,25 ^{ab}
<i>Rhiz. leguminosarum</i>	10,60 ^b	6,57 ^a
C-924+ <i>Rhiz.</i>	10,10 ^b	6,62 ^a

Medias con letras distintas difieren significativamente entre sí (en cada medición) según la prueba de rangos múltiples de Duncan, para $p \leq 0,05$.

Con respecto al número de hojas, a los 36 días los mejores resultados se obtuvieron con la aplicación de *T. paurometabola* cepa C-924. Existen claramente diferencias significativas con el resto de los tratamientos. En el caso en que se aplicaron ambas cepas, este parámetro fue similar al tratamiento con *R. leguminosarum*, sin embargo con respecto al testigo, los resultados fueron diferente.

En cuanto al porcentaje de materia seca, los mayores valores se observaron en la aplicación conjunta de *T. paurometabola* cepa C-924 y *R. leguminosarum*. Sin embargo, no difirió estadísticamente de los tratamientos donde se aplica el biofertilizante y en el testigo sin inocular. Este hecho se debe a la presencia de cepas nativas de *R. leguminosarum* en el suelo y su efecto positivo del sobre el crecimiento del cultivo del frijol.

Ejemplo 9. Comparación e interacción de *T. paurometabola* cepa C-924 con *Azotobacter chroococcum* y *Pseudomonas fluorescens* en el cultivo de maíz (*Zea mays*).

Cada tratamiento constó de cinco réplicas y cuatro plantas por réplica. Las semillas se sembraron a razón de una semilla por nido, a una profundidad de 3 cm. Cada maceta (de 1 L de capacidad) tiene cuatro nidos. Para cada maceta experimental, se utilizó 1,2 kg de "suelo Pardo con Carbonatos". Este contiene 3,74 % de materia orgánica lábil, (14,2 % total), fósforo soluble de 19,14 mg de P_2O_5 /100g de suelo (Instituto de Suelos, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministerio de la Agricultura. Editorial AGRINFOR, Cuba). El experimento se llevó a cabo en un invernadero con condiciones semicontroladas. Los tratamientos fueron los siguientes:

1. Testigo sin inocular.
2. *T. paurometabola* cepa C-924: se inoculó 7 días antes y 7 días después de la siembra, según se realiza la aplicación en el campo. La dosis aplicada fue de 100 mL/maceta con una concentración de 1×10^9 ufc/ml.
3. *A. chroococcum* con una concentración de $4,5 \times 10^{10}$ ufc/ml en solución sólida, mezclada con humus previamente tamizado. La dosis usada fue de 2 kg/ha.
4. *P. fluorescens* con una concentración de $2,7 \times 10^{10}$ ufc/ml en solución sólida, mezclada con humus previamente tamizado. La dosis usada fue de 2 kg/ha.
5. Combinación de los tratamientos 2 y 3.
6. Combinación de los tratamientos 2 y 4.

A cada maceta se le aplicó la fertilización necesaria de acuerdo a los contenidos de P_2O_5 y K_2O del suelo según las recomendaciones agroquímicas del "Instituto de Suelos", (Cuba). Los portadores utilizados fueron Urea, Superfosfato Triple (SFT) y Cloruro de potasio (KCl) para nitrógeno, fósforo y potasio, respectivamente. La fertilización se realizó cuatro días antes de la siembra en el caso de fósforo y potasio, y en el caso de la urea, se aplicó a los 15 días después de la etapa de germinación. Para el cultivo del maíz la fertilización se aplicó a razón de 185 kg/ha de Urea, 121 kg/ha de SFT y 45 kg/ha de KCl.

Las variables fenológicas evaluadas fueron el grosor del tallo, la altura de la planta, el número de hojas (contadas cada siete días), así como el peso seco (MINAG, 1988. Suelos. Análisis Químico. "Determinación de peso seco, materia orgánica y los índices del grado de acidez". NRAG. 892 y 878, Cuba). Los resultados de las mediciones se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados de la aplicación de las cepas inoculadas sobre los parámetros fenológicos y la materia seca en el cultivo del maíz (*Zea mays* L.).

Tratamiento	Diámetro, 36 días	No. Hojas, 36 días	Altura (cm), 36 días	Materia seca (%)
Testigo	8,56 ^b	6,30 ^b	69,79 ^b	4,80 ^b
C-924	10,71 ^a	11,70 ^a	77,70 ^a	5,08 ^a
Azotobacter	8,84 ^b	6,80 ^b	71,70 ^{ab}	5,12 ^a
Pseudomonas	8,69 ^b	6,30 ^b	75,15 ^{ab}	5,25 ^a
C-924+Azot	10,09 ^a	7,10 ^b	77,05 ^a	5,10 ^a
C-924+Pseud	10,70 ^a	7,20 ^b	69,20 ^b	5,16 ^a

Medias con letras distintas difieren significativamente entre sí según la prueba de rangos múltiples de Duncan, para $p \leq 0,05$.

Los mejores valores para cada uno de los parámetros fenológicos estudiados se obtuvieron en los tratamientos donde se aplicó *T. paurometabola* cepa C-924, tanto solo como combinado con los otros promotores del crecimiento. Respecto al número de hojas, los resultados de la aplicación de C-924 solo fueron superiores, de manera estadísticamente significativa (prueba de Duncan, $p \leq 0,05$), al resto de los tratamientos.

Los mejores resultados en el desarrollo de los cultivos durante la aplicación de *T. paurometabola* cepa C-924 evidencian que existe un aporte de elementos adicionales al crecimiento de las plantas que está dado por los compuestos nitrogenados que se liberan durante la degradación de la materia orgánica.

En cuanto al porcentaje de materia seca de las plantas de maíz, una vez finalizado el estudio, se observó que todas las variantes inoculadas con uno u otro microorganismo muestran valores similares, pero siempre superiores respecto al testigo sin inocular. Esto demuestra la eficacia de los biofertilizantes estudiados en el crecimiento del cultivo (Haggag W. M., 2002. Sustainable Agriculture Management of Plant Diseases. *Online Journal of Biological Science*, 2: 280-284).

Ejemplo 10. Interacción de *T. paurometabola* cepa C-924 con micorrizas arbuscular en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*).

Se utilizó un "suelo Ferrítico Rojo Púrpura" (Instituto de Suelos, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministerio de la Agricultura. Editorial AGRINFOR, Cuba) para este experimento. Dicho suelo contenía 2,9 % de materia orgánica lábil y 11,8 % de materia orgánica total, dispensado en macetas de 1 L de capacidad. Se emplearon semillas pregerminadas de lechuga (*Lactuca sativa*) variedad Black Simpson.

La cepa C-924 se utilizó en forma de un polvo humedecible concentrado a 2×10^{12} ufc/mL. La misma se inoculó siete días antes de la siembra de las semillas, en una suspensión acuosa a una concentración de 3×10^7 ufc/mL. Se aplicó riego diario en las proporciones adecuadas para no sobrepasar la capacidad de retención de humedad del suelo.

Las micorrizas arbusculares (MA) *Glomus fasciculatum* y *Glomus clarum* previamente formuladas en el "Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de Cuba", se aplicaron en el momento de la siembra, en dosis de 200 g/m² (20 g por maceta). Se empleó un diseño experimental de seis tratamientos con cuatro réplicas, cada una de ellas con cuatro plantas de lechuga. Las plantas se mantuvieron (durante 30 días) bajo las condiciones semicontroladas de una casa de cultivos. Los tratamientos fueron los siguientes:

- Tratamiento 1: suelo sin inoculación (control).
- Tratamiento 2: suelo inoculado con C-924.
- Tratamiento 3: suelo inoculado con *Glomus fasciculatum* y C-924.
- Tratamiento 4: suelo inoculado con *Glomus fasciculatum*.
- Tratamiento 5: suelo inoculado con *Glomus clarum* y C-924.
- Tratamiento 6: suelo inoculado con *Glomus clarum*.

A los 30 días de la siembra, se determinó el peso fresco del follaje de cada planta en todos los tratamientos. En la Tabla 9 se resumen los resultados. Los tratamientos en los que se aplicó *T. paurometabola* cepa C-924 fueron significativamente mejores que el testigo (suelo sin inocular). En ambos casos, las combinaciones de *T. paurometabola* cepa C-924 + *G. clarum* y *T. paurometabola* cepa C-924 + *G. fasciculatum* tuvieron resultados superiores a los tratamientos donde se empleó por separado la misma MA. Esto fue en cuanto al incremento del peso del follaje de las plantas.

Tabla 9. Comparación de los valores promedios del peso de la parte aérea de planta de lechuga en cada tratamiento.

Tratamiento	Peso de la parte aérea (g)
Testigo	0,9835 ^a
C-924	13,56425 ^b
C-924 + <i>G. fasciculatum</i>	23,0545 ^c
<i>G. fasciculatum</i>	17,2235 ^b
C-924 + <i>G. clarum</i>	29,503 ^d
<i>G. clarum</i>	25,30975 ^c

Medias con letras diferentes presentaron diferencias significativas, $p \leq 0,05$ (Tukey).

Ejemplo 11. Ensayos de compatibilidad entre *T. paurometabola* cepa C-924 y *Glomus fasciculatum* en pepino (*Cucumis sativus* var. Poinset) cultivados en invernadero.

Se dispuso de dos casas de cultivo en un "suelo tipo pardo sin carbonato" (Instituto de Suelos, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministerio de la Agricultura. Editorial AGRINFOR, Cuba). Dicho suelo tenía un contenido de materia orgánica lábil del 3,1 % y materia orgánica total del 12,3 %. Se realizó un diseño experimental por parcelas de igual tamaño (30 m²) de cuatro tratamientos con cuatro réplicas; consistentes en los siguientes tratamientos:

Tratamiento 1: suelo inoculado con *Glomus fasciculatum* y C-924.

Tratamiento 2: suelo inoculado con *Glomus fasciculatum*.

Tratamiento 3: suelo inoculado con C-924.

Tratamiento 4: suelo sin inoculación (control).

Se aplicó la cepa C-924 y la MA siete días antes de la siembra y en otros dos momentos a intervalos de 21 días después de la primera aplicación, de acuerdo a las dosis equivalentes por m², que fueron empleadas en el Ejemplo 10. Se evaluaron los rendimientos (expresados en el peso) de los frutos comerciales cosechados durante el ciclo del cultivo (98 días) para cada tratamiento. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Se produjo un incremento significativo del peso de los frutos, respecto al grupo control, en las plantas que recibieron el tratamiento con *T. paurometabola* cepa C-924, al igual que con *Glomus fasciculatum*. Además, al aplicar los dos microorganismos de manera combinada, el peso de los frutos aumentó en comparación a las aplicaciones de los microorganismos por separado. Esta diferencia fue estadísticamente significativa.

Tabla 10. Comportamiento del rendimiento en invernadero con aplicación combinada de C-924 y del hongo micorrizógeno *G. fasciculatum*.

Tratamientos	Media del peso de los frutos por parcela (Kg)
<i>G. fasciculatum</i> + C-924	501.5 ^a
<i>Glomus fasciculatum</i>	448.5 ^b
<i>T. paurometabola</i> cepa C-924	443.0 ^b
Testigo	303.5 ^c

Medias con letras diferentes presentaron diferencias significativas, $p \leq 0,05$ (Tukey).

REIVINDICACIONES

1. Composición biofertilizante para estimular el crecimiento y el desarrollo fenológico de las plantas, caracterizada porque comprende al menos una cepa de *Tsukamurella paurometabola*, un mutante derivado de la misma o un metabolito derivado de dicha cepa en un portador apropiado, dicha composición caracterizada porque comprende una cantidad efectiva en el rango de 10^7 a $5,0 \times 10^{12}$ unidades formadoras de colonias (ufc) de *Tsukamurella paurometabola* por mililitro o gramo de medio de cultivo.
2. Composición biofertilizante según la reivindicación 1, en donde dicha cepa de *Tsukamurella paurometabola* es la cepa C-924.
3. Composición biofertilizante según la reivindicación 2, en donde la cantidad efectiva de la cepa C-924 de *Tsukamurella paurometabola* en la composición está en el intervalo de 10^9 a 10^{12} unidades formadoras de colonias (ufc) por mililitro o gramo de medio de cultivo.
4. Composición biofertilizante según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el metabolito puede ser obtenido por vía natural, recombinante o sintética.
5. Composición biofertilizante según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el portador es un fertilizante orgánico, un suelo pre-empacado, un recubridor de semillas, un polvo, un granulado, un nebulizador, una suspensión o un líquido o cualquiera de las variantes expuestas en forma encapsulada.
6. Composición biofertilizante según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la cepa de *Tsukamurella paurometabola* se combina o mezcla con otros microorganismos biofertilizantes, como *Bacillus subtilis*, *Rhizobium leguminosarum*, *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Glomus fasciculatum* y *Glomus clarum*, o un mutante derivado de dichos organismos, así como cualquier principio activo o metabolito obtenido a partir de dichas cepas por vía natural, recombinante o sintética, en un portador apropiado.
7. Un método para estimular el crecimiento de las plantas, que comprende:
 - a) proporcionar un agente biofertilizante que comprende un cultivo de una cepa de *Tsukamurella paurometabola* o un metabolito derivado de dicha cepa obtenido por vía natural, recombinante o sintética.
 - b) contactar el suelo, o un sustrato natural o artificial con una cantidad efectiva de dicho agente biofertilizante o de metabolito derivado de dicha cepa, en donde dicha cantidad efectiva está en el intervalo de 10^6 a $5,0 \times 10^{12}$ unidades formadoras de colonias (ufc) de *Tsukamurella paurometabola* por mililitro o gramo de medio de cultivo.
8. Método para estimular el crecimiento de las plantas según la reivindicación 7, caracterizado porque la cepa de *Tsukamurella paurometabola* es la cepa C-924.
9. Método para estimular el crecimiento de las plantas según la reivindicación 7 u 8, caracterizado porque la cantidad efectiva del agente biofertilizante que se aplica sobre suelo, o sustrato en una suspensión acuosa está en una concentración de aproximadamente entre 10^6 y 10^9 ufc por mililitro de suspensión.
10. Método para estimular el crecimiento de las plantas según la reivindicación 9, caracterizado porque el agente biofertilizante se aplica al menos una vez en el suelo, o mezclado con el sustrato.

Figura 1

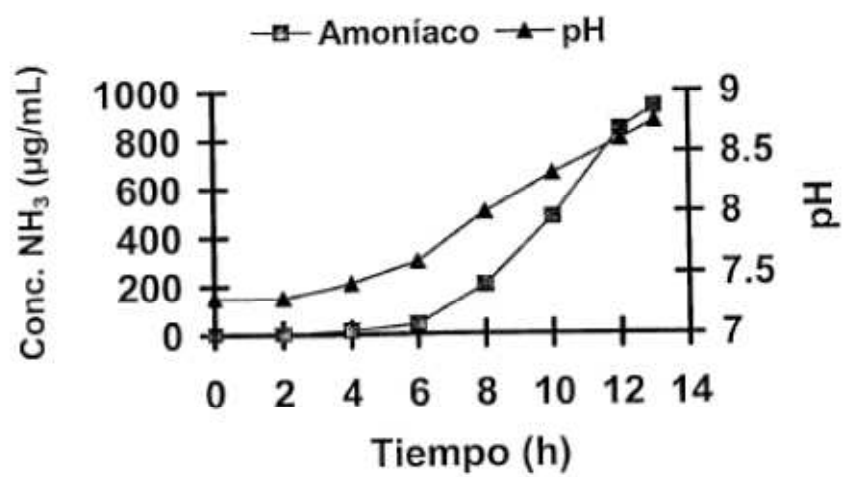


Figura 2

