

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
6 de Noviembre de 2008 (06.11.2008)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2008/131699 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CU2008/000002

(22) Fecha de presentación internacional:
29 de Abril de 2008 (29.04.2008)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
2007-0092 30 de Abril de 2007 (30.04.2007) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): **CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y
BIOTECNOLOGÍA** [CU/CU]; Avenida 31 entre 158 y
190, Cubanacán, Playa, Ciudad De La Habana 10 600
(CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **MENA
CAMPOS, Jesús** [CU/CU]; Avenida Principal No. 17,
Reperto Lenin, Camagüey 70 500 (CU). **PIMENTEL
VÁZQUEZ, Eulogio** [CU/CU]; Calle B No. 19 entre
Primera y Segunda., Comunidad Científica, Camagüey
70 800 (CU). **MARÍN BRUZOS, Marieta** [CU/CU];
Calle Segunda No. 6 entre B y C, Comunidad Científica,
Camagüey 70 800 (CU). **HERNÁNDEZ GARCÍA,
Armando, Tomás** [CU/CU]; Edif 16, Apto 16, Puerto
Príncipe, Camagüey 70 100 (CU). **SÁNCHEZ ORTIZ,
Ileana** [CU/CU]; Calle B No. 39 entre Segunda y Ter-
cera, Comunidad Científica, Camagüey 70 800 (CU).
RAMÍREZ NÚÑEZ, Yamilka [CU/CU]; Calle B No.
5, entre Martí y Ira, Reperto SánchezSoto, Camagüey
70 300 (CU). **GONZÁLEZ BLANCO, Sonia** [CU/CU];

Calle 184 No. 3112, Apto 42, entre 31 y 33-A, Playa,
Ciudad De La Habana 11 600 (CU). **GARCÍA SIVERIO,
Marianela** [CU/CU]; Calle F No. 609, Apto 19, entre 25
y 27, Vedado, Plaza, Ciudad De La Habana 10 600 (CU).
BORROTO NORDELO, Carlos, Guillermo [CU/CU];
Ave 19-A No. 2114 entre 214 y 216, Atabey, Playa,
Ciudad Habana 11 600 (CU).

(74) Mandatario: **GONZÁLEZ BLANCO, Sonia**; Departa-
mento de Patentes, Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacán,
Playa, Ciudad De La Habana 10 600 (CU).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Publicada:

— sin informe de búsqueda internacional, será publicada nue-
vamente cuando se reciba dicho informe

(54) Title: BIOFERTILISER COMPOSITION

(54) Título: COMPOSICIÓN BIOFERTILIZANTE

(57) Abstract: The invention relates to a composition for stimulating the development of plants, comprising at least one strain of *Tsukamurella paurometabola*, a biofertiliser agent which optimises the use of organic material by plants, facilitating the assimilation of nitrogen and phosphorus. Said agent can increase the growth and development of plants when applied directly to the soil or to a natural or artificial substrate containing an organic material, or when applied to any kind of soil or substrate containing an organic complement.

(57) Resumen: Una composición para estimular el desarrollo de las plantas que comprende al menos una cepa de *Tsukamurella paurometabola*, agente biofertilizante que optimiza el aprovechamiento de la materia orgánica por las plantas, al favorecer la asimilación del nitrógeno y el fósforo. Dicho agente es capaz de incrementar el crecimiento y desarrollo de las plantas al ser aplicado al suelo directamente o en un sustrato natural o artificial, con materia orgánica, o al aplicarse en cualquier tipo de suelo o sustrato con un complemento orgánico.

WO 2008/131699 A2

COMPOSICIÓN BIOFERTILIZANTE.

Campo de la técnica

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

Estado de la técnica anterior

Los biofertilizantes se definen como productos a base de microorganismos que
10 viven normalmente en el suelo, aunque en poblaciones bajas y que al incrementar
sus poblaciones por medio de la inoculación artificial, son capaces de poner a
disposición de las plantas, mediante su actividad biológica, una parte importante de
las sustancias nutritivas que necesitan para su desarrollo, así como suministrar
sustancias hormonales o promotoras del crecimiento (Martínez J. S. y col. (1985).
15 Manual Práctico de Microbiología. Ed. Pueblo y Educación, Cuba).

Sobre este tema se han realizado diversos estudios sobre un grupo de
microorganismos conocidos que se resumen a continuación:

Se considera que la fijación simbiótica del nitrógeno, propia del género *Rhizobium*,
es una de las alternativas más viables para recuperar nitrógeno en el ecosistema.

20 Se ha estimado que 175 millones de toneladas de nitrógeno/año se fijan
biológicamente, del cual el 70% va al suelo (Burity HA y col. (1989). Estimation of
nitrogen fixation and transfer from alfalfa to associated grasses in mixed swards
under field conditions. *Plant and Soil*, 114:249-255) y de éste, el 50% proviene de
asociaciones nodulares como las causadas por *Rhizobium* (Carrera M y col. (2004).

25 Nodulación natural en leguminosas silvestres del Estado de Nuevo León).

La fijación simbiótica de nitrógeno ocurre cuando la bacteria (*Rhizobium*) reconoce a
su hospedero, lo infecta a través de los pelos radicales y en la matriz de las células
corticales, induce una meiosis y mitosis acelerada que dan lugar a un tejido
hipertrofiado: "el nódulo", estructura típica de las raíces de las leguminosas. Dentro
30 de este nódulo, *Rhizobium* pierde su pared celular y se transforma en un bacteroide,
que por la acción de su enzima nitrogenasa, fija el nitrógeno (N_2) y lo convierte en
amonio (NH_3), que es transferido al ribosoma vegetal para la síntesis de proteínas.
Al mismo tiempo, la leguminosa, mediante la fotosíntesis, reduce el CO_2 en
carbohidratos que servirán como fuente de carbono y energía para *Rhizobium*, y con

esto lo mantiene activo en el nódulo hasta cubrir las necesidades de nitrógeno de la planta (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 por cuanto se trata de los únicos que son unicelulares y, aparentemente, pueden fijar nitrógeno en condiciones aerobias (Andresson AJ y col. (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 *Azotobacter* el microorganismo que de una forma más amplia ha sido utilizado en la agricultura. 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/2002040400120400.htm>).

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

Se ha informado sobre el efecto positivo de 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 peúú* con *Azotobacter* resultaron superiores a los tratamientos testigos (Sánchez C. y col. (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, se ha informado sobre una respuesta positiva de los mismos a la coinoculación con *Glomus* sp. y *Azotobacter*, que brindó los resultados más efectivos, lo que demuestra que ambos microorganismos funcionaron de forma sinérgica cuando se añadieron simultáneamente (Terry E y col. (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).

Anteriormente, se ha reportado la actividad nematocida de la bacteria *Tsukamurella paurometabola*, cepa C-924, que ha sido empleada en el control de parásitos de animales y plantas (Mena J y col. Patente EP 0774906 B1) como bionematicida. El control biológico de los nemátodos es una alternativa valiosa al uso de los pesticidas químicos en las prácticas agrícolas. 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 desarrollo de las plantas, las aplicaciones de dichos fertilizantes al suelo generan otros desórdenes nutricionales y efectos colaterales indeseados. Es por ello que existe la necesidad de contar con nuevos biofertilizantes que puedan promover el crecimiento de las plantas sin causar efectos indeseados al ambiente y al hombre.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención resuelve el problema antes planteado, al proveer de una composición biofertilizante que estimula 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. La mencionada composición aumenta la fertilidad del suelo, y condiciona el mismo para un desarrollo más favorable de las plantas que en él se cultivan.

En una realización de la invención la composición biofertilizante comprende la bacteria *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924 (Mena J y col. (2003) *Biología Aplicada*, 20 (4): 248-252). Se demuestra su capacidad de incidir positivamente en la fenología de diversas especies de plantas cultivadas. Con los

resultados obtenidos se hace posible establecer un método para estimular el desarrollo 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. Adicionalmente, se eliminan o disminuyen las aplicaciones de fertilizantes químicos al suelo que, independientemente al efecto inmediato sobre el desarrollo de las plantas que estos 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 (NH_3), 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 la bacteria *T. paurometabola* cepa C-924 al suelo, sobre un sustrato orgánico (artificial o natural) o en combinación con 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 para estimular el desarrollo 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 una realización de la invención el metabolito comprendido en la composición biofertilizante puede ser obtenido por vía natural, recombinante o sintética. La

composición biofertilizante de la presente invención puede tener como portador 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.

5 En una materialización de la invención 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
10 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 *Tsukamurella paurometabola* o un metabolito derivado de dicha cepa obtenido por vía natural, recombinante o sintética
15 y b) contactar el suelo o un sustrato natural o artificial con una cantidad efectiva de dicho agente biofertilizante, o del metabolito derivado de dicha cepa. En una realización de la invención, el método antes mencionado se caracteriza porque la cepa de *Tsukamurella paurometabola* es la cepa C-924. La cantidad efectiva del agente biofertilizante que se aplica sobre suelo o sustrato en suspensión acuosa
20 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 terreno 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
25 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 DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

30 **Figura 1.** Cinética de formación de amoníaco durante el cultivo de *Tsukamurella 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; la agitación empleada fue de 500 revoluciones por minutos (rpm).

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

5 Ejemplos de realización

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

Se procedió al cultivo de la cepa de *T. paurometabola* C-924 en biorreactor de 5 L, a 28 °C y 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, 10, 12 y 13 h). Cinco ml de cada muestra (por triplicado) fueron centrifugados y filtrados a través de filtro de 0,2 µm; 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, determinado 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, lo cual demuestra la capacidad de desaminación 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 NH₃ de hasta 934 µg/mL, por lo que puede considerarse a *Tsukamurella 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 NH₃ debe sustentarse fundamentalmente en el proceso de desaminación oxidativa que sufren los aminoácidos componentes del medio de cultivo (Vanhook JL y col. (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,). 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 limitantes 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, y se incubó a 30°C por 10 días. Transcurrido este tiempo se observó el halo transparente característico en el medio.

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 control positivo se empleó *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 25922.

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	0,00	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 *Tsukamurella paurometabola* C-924 sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas de plátano (*Musa* sp. híbrido, cultivar Macho).

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), éste se tamizó por una malla con orificios de 0,5 cm de diámetro, para eliminar partículas indeseables; se aplicó un 5% de humus de

lombriz al suelo, con ello se elevó el contenido de materia orgánica del suelo sobre el 3 % de materia orgánica lábil y un 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* ("vitroplantas") de plátano (*Musa* sp. híbrido, cultivar Macho), que fueron 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 [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.

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

El experimento se llevó a cabo en un invernáculo 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 dócima de rangos múltiples de Tukey. Se empleó el programa SYSTAT 7.0 for Windows, para la ejecución de los cálculos estadísticos. Los resultados obtenidos a los tres meses de la aplicación de los tratamientos y del transplante fueron los siguientes:

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 (para cada medición) según la dócima 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. El incremento no tuvo diferencias entre los tratamientos con *T. paurometabola* cepa C-924 y con *Bacillus subtilis* cepa F16/95, bacteria que se empleó como control positivo, ya que es conocida como promotor

del crecimiento de las plantas (McSpadden B B y Fravel D R. (2002). Biological Control of Plant Pathogens: Research, Commercialization, and Application in the USA. En: http://www.phcmexico.com.mx/apsnet_biological_Control.html,).

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

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), éste se tamizó por una malla con orificios de
10 0,5 cm de diámetro, para eliminar partículas indeseables; se aplicó un 5% de humus de lombriz al suelo, con ello se llevó el suelo al 3 % de materia orgánica lábil (o disponible) y un 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
15 emplearon "vitroplantas" de banano (cultivar Cavendish, *Musa* sp. híbrido) plantadas en las macetas. Se utilizaron 10 réplicas en cada uno de los siguientes tratamientos:

1- Testigo: Medio 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.

20 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, en los parámetros: peso del follaje en gramos, peso de las raíces en gramos y la suma total de ambas determinaciones. El experimento se llevó a cabo en un invernáculo
25 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 dócima de rangos múltiples de Tukey. Se empleó el programa SYSTAT 7.0 for Windows, para la ejecución de los cálculos estadísticos. Los
30 resultados obtenidos a los 5 meses de la aplicación de los tratamientos y del transplante 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 (para cada medición) según la dócima 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 F16/95, empleada como control.

Ejemplo 5. Efecto de *Tsukamurella paurometabola* C-924 sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas de soya (*Glycine max*).

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), éste se tamizó por una malla con orificios de 0,5 cm de diámetro, para eliminar partículas indeseables; este suelo presentaba un contenido de 2,6 % de materia orgánica lábil (o disponible) y un 10,7 % 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 semillas pregerminadas de soya (*Glycine max*) sembradas 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 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, peso de los tallos, peso de las hojas y peso de la planta en gramos. Se evaluaron las plantas de 10 macetas (30 en total).

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

Se aplicó el Análisis de Varianza (ANOVA, $p \leq 0,05$) a los datos obtenidos de los

pesos. Se empleó el programa SYSTAT 7.0 for 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.

5 **Tabla 4. Medias de las mediciones en 30 plantas.**

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

A los 7 días del desarrollo de las plantas se observaron diferencias significativas en el incremento de los pesos frescos en tallos, hojas y en el peso total de las plantas, para el tratamiento donde se empleó la cepa C-924, por lo que se concluye que el
10 tratamiento con la composición que comprende la bacteria arrojó resultados satisfactorios en la estimulación del crecimiento de las plantas.

15 **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 al 50 %, turba al 25 % y zeolita al 25 %.

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

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

25 b) Tratamiento Testigo tratado sólo con agua.

A los 22 días de la siembra, cuando las plántulas o posturas estaban listas para el transplante, se midió la altura de 40 plántulas de cada tratamiento, ubicadas en grupos de a 10 en diferentes lugares del semillero seleccionados al azar. En la Tabla 5 se resumen los valores de las medias de las alturas por plantas, donde se
30 observan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$, ANOVA) entre las tallas obtenidas

en ambos tratamientos, y se apreciaba una clara influencia de la cepa C-924 como promotor del crecimiento de 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* C-924 sobre el crecimiento y otros parámetros fenológicos y del desarrollo de las plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. variedad FA-180) en condiciones de campo.

Se utilizó una casa de cultivos protegidos de 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), con un contenido de materia orgánica lábil del 3 % y 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, en la siguiente forma:

- Tratamiento con una suspensión concentrada ($5,0 \times 10^{11}$ ufc/mL) de *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924 a razón 10 L/ha aplicada por el sistema de fertirriego, 7 días antes del transplante.
- Tratamiento con una suspensión concentrada ($5,0 \times 10^{11}$ ufc/mL) de *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924 a razón 4 L/ha aplicada por el sistema de fertirriego, 7 días antes del transplante.
- 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 (goteo), con una norma de entrega total de riego de 1 L por metro cuadrado y 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 "sombrialla". MINAGRI, Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova").

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

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

- 5 • Número de flores por planta.

En la Tabla 6 se muestra un resumen de los resultados. Fueron significativamente superiores la altura, el número de folíolos y el número de flores en los dos tratamientos donde se empleó la cepa C-924 en dos dosis diferentes, lo cual ratifica las propiedades de este agente biofertilizante en condiciones de campo.

10 **Tabla 6. Medias de las mediciones en 10 plantas.**

Tratamiento	Altura (cm)	Folíolos	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 o medición) difieren significativamente según la prueba de Tukey, ($p \leq 0,05$).

15 **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 (maceta) se utilizó 1,2 kg de suelo tipo Pardo con Carbonatos, con un contenido de materia orgánica lábil de 3,74 % (14,2 % total) y de fósforo soluble de 19,14 mg de $P_2 O_5$ /100 g de suelo (Instituto de Suelos (1999). Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba. Ministerio de la Agricultura. Editorial AGRINFOR). El experimento se llevó a cabo en un invernáculo con condiciones semicontroladas.

25 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/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 a una dosis de 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. 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 de Urea, 119.5 kg/ha de SFT y 60 kg/ha de KCl.

Las variables fenológicas evaluadas fueron el número de hojas cada siete días, así como el peso seco. 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. Se aplicó el paquete estadístico SPSS versión 8.0 (1997). Los resultados de las mediciones se resumen en la Tabla 7.

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, existiendo diferencias significativas con el resto de los tratamientos. En el que se aplicaron ambas cepas,

este parámetro fue similar al tratamiento con *R. leguminosarum*, sin embargo resultaron diferentes al testigo.

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* aunque
5 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 en el suelo y el efecto positivo del *R. leguminosarum* sobre el crecimiento del cultivo del frijol.

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

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
15 profundidad de 3 cm en macetas de 1 L de capacidad. Para cada unidad experimental (maceta) se utilizó 1,2 Kg de suelo Pardo con Carbonatos, con un contenido de materia orgánica lábil de 3,74 % (14,2 % total) y de fósforo soluble de 19,14 mg de $P_2 O_5$ /100g de suelo (Instituto de Suelos (1999). Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba. Ministerio de la Agricultura. Editorial AGRINFOR).

20 El experimento se llevó a cabo en un invernáculo 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
25 100 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 a una dosis 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 a una dosis de 2 kg/ha.
- 30 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. 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 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 y el número de hojas 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,). 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, 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 superiores respecto al control 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).

5

EJEMPLO 10. Interacción de *T. paurometabola* cepa C-924, con micorrizas arbusculares 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) con un 2,9 % de materia orgánica lábil y 11,8 % 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 (macetas), 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 (testigo).

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. Si se comparan los tratamientos correspondientes a la aplicación de cada MA por separado, la

aplicación de C-924 y aplicación de una combinación de la misma MA y C-924, se observa que los mejores resultados se alcanzan en las plantas tratadas con la combinación. 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, en cuanto al incremento del peso del follaje de las plantas.

Tabla 9. Comparación de las medias del peso de la parte aérea de cada planta de lechuga.

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 en cultivos protegidos de pepino (*Cucumis sativus* var. Poinset) entre *T. paurometabola* cepa C-924 y *Glomus fasciculatum*.

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), con 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 (testigo).

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 testigo, 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 de los rendimientos en casas de cultivo con aplicación combinada de C-924 y el 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

COMPOSICIÓN BIOFERTILIZANTE.

1. Composición biofertilizante para estimular el crecimiento y el desarrollo
5 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.
2. Composición biofertilizante según la reivindicación 1, caracterizada porque la
cepa de *Tsukamurella paurometabola* es la cepa C-924.
- 10 3. Composición biofertilizante según la reivindicación 2, caracterizada porque la cantidad efectiva de la cepa de *Tsukamurella paurometabola* C-924 en la composición está en el rango de 10^9 a 10^{12} unidades formadoras de colonias (ufc) por mililitro o gramo de medio de cultivo.
4. Composición biofertilizante según la reivindicación 1, caracterizada porque el
15 metabolito puede ser obtenido por vía natural, recombinante o sintética.
5. Composición biofertilizante según la reivindicación 1, caracterizada porque 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.
- 20 6. Composición biofertilizante según la reivindicación 1, caracterizada porque 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,
25 así como cualquier principio activo o metabolito obtenido a partir de dichas cepas por vía natural, recombinante o sintética, en un portador apropiado.
7. Método para estimular el crecimiento de las plantas, caracterizado porque comprende:
 - a) Obtener un agente biofertilizante que comprende un cultivo de una cepa de
30 *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 del metabolito derivado de dicha cepa.

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, caracterizado porque la cantidad efectiva del agente biofertilizante que se aplica
5 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 es aplicado al menos una vez en el terreno o mezclado con el sustrato.

10

15

Figura 1

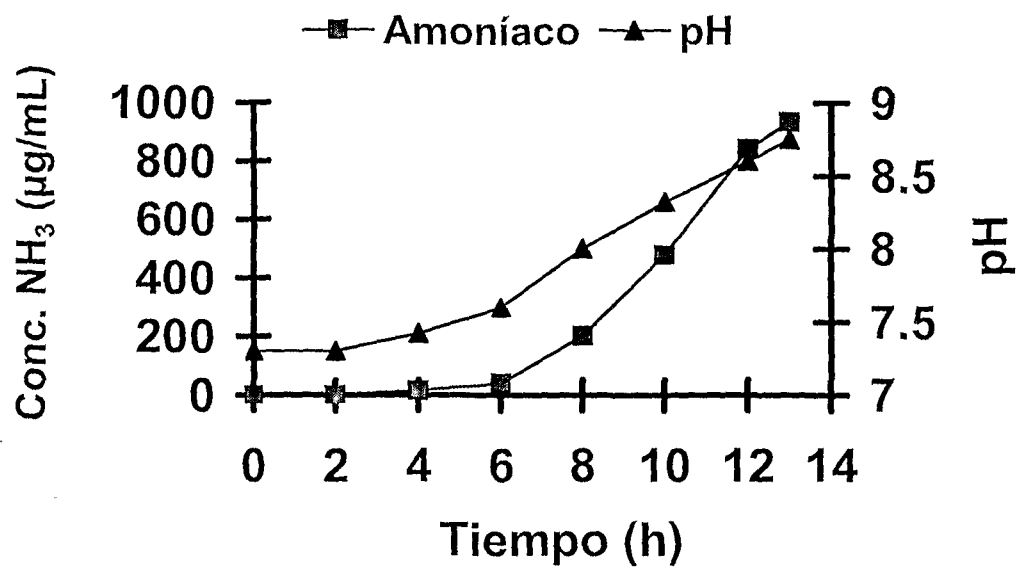


Figura 2

