

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

|  |   |
|--|---|
| (22) Data de pedido: <b>2008.04.29</b>                             | (73) Titular(es):<br><b>CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA</b><br><b>AVENIDA 31 ENTRE 158 Y 190 CUBANACÁN</b><br><b>PLAYA CIUDAD DE LA HABANA 10600</b> CU                                   |
| (30) Prioridade(s): <b>2007.04.30 CU 20070092</b>                  |   |
| (43) Data de publicação do pedido: <b>2010.02.17</b>               |   |
| (45) Data e BPI da concessão: <b>2015.07.29</b><br><b>222/2015</b> | (72) Inventor(es):<br><b>JESUS MENA CAMPOS</b> CU<br><b>EULOGIO PIMENTEL VÁZQUEZ</b> CU<br><b>MARIETA MARÍN BRUZOS</b> CU<br><b>ILEANA SÁNCHEZ ORTIZ</b> CU<br><b>ARMANDO TOMÁS HERNÁNDEZ GARCÍA</b> CU |
|  | (74) Mandatário:<br><b>ÁLVARO ALBANO DUARTE CATANA</b><br><b>AVENIDA MARQUÊS DE TOMAR, Nº 44, 6º 1069-229 LISBOA</b><br><b>PT</b>   |

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÃO BIOFERTILIZANTE**

(57) Resumo:

UMA COMPOSIÇÃO PARA ESTIMULAR O DESENVOLVIMENTO E O CRESCIMENTO DAS PLANTAS QUE COMPREENDE PELO MENOS UMA ESTIRPE DE TSUKAMURELLA PAUROMETABOLA, AGENTE BIOFERTILIZANTE QUE OPTIMIZA A ASSIMILAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA PELAS PLANTAS, FAVORECENDO A ASSIMILAÇÃO DE AZOTO E FÓSFORO PELA PLANTA. O REFERIDO AGENTE É CAPAZ DE AUMENTAR O CRESCIMENTO E O DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS DEPOIS DA APLICAÇÃO DESTES BIOFERTILIZANTE DIRECTAMENTE AO SOLO OU A UM SUBSTRATO NATURAL OU ARTIFICIAL, COM MATÉRIA ORGÂNICA, OU DEPOIS DA SUA APLICAÇÃO EM QUALQUER TIPO DE SOLO OU SUBSTRATO COM UM COMPLEMENTO ORGÂNICO.

## RESUMO

### "COMPOSIÇÃO BIOFERTILIZANTE"

Uma composição para estimular o desenvolvimento e o crescimento das plantas que compreende pelo menos uma estirpe de *Tsukamurella paurometabola*, agente biofertilizante que otimiza a assimilação da matéria orgânica pelas plantas, favorecendo a assimilação de azoto e fósforo pela planta. O referido agente é capaz de aumentar o crescimento e o desenvolvimento das plantas depois da aplicação destes biofertilizante directamente ao solo ou a um substrato natural ou artificial, com matéria orgânica, ou depois da sua aplicação em qualquer tipo de solo ou substrato com um complemento orgânico.

## DESCRIÇÃO

### "COMPOSIÇÃO BIOFERTILIZANTE"

#### **Campo Técnico**

A presente invenção refere-se ao campos da microbiologia do solo e refere-se à aplicação de biofertilizantes microbianos que são capazes de favorecer e estimular o crescimento de plantas sem afectar o meio ambiente.

#### **Estado da Técnica**

Os biofertilizantes são definidos como produtos à base de microorganismos que normalmente habitam no solo. Ao aumentar a sua população através da inoculação artificial, a resposta é que estes microrganismos aumentam a sua actividade biológica, assim fornecendo as plantas com nutrientes importantes que promovem o seu crescimento. Além disso, os microrganismos são creditados por fornecer as com substâncias hormonais que são essenciais para o seu desenvolvimento (JS Martínez et al., 1985. "Manual Práctico de Microbiología". Ed: Pueblo y Educación, Cuba). Vários estudos foram realizados sobre este tema, particularmente sobre um grupo de microorganismos conhecidos que serão analisados a seguir:

Estima-se que a fixação simbiótica do azoto, inerente ao género *Rhizobium*, é uma das maneiras mais viáveis para recuperar azoto e retornar para o ecossistema. Constatou-se que 175 toneladas de azoto por ano são biologicamente fixas; das quais 70% vão para o solo (Burity HA et al., 1989. *Estimation of nitrogen fixation and transfer from alfafa to associated grasses in mixed swards under field conditions. Plant and Soil*, 114:249-255). Cinquenta por cento desta fixação vem de associações nodulares como as causadas por *Rhizobium* (Carrera M et al., 2004. "Nodulación naturais en leguminosas silvestres del Estado de Nuevo León").

A fixação simbiótica do azoto ocorre quando as bactérias (*Rhizobium*) reconhecem o seu hospedeiro causando a sua infecção através dos pêlos radicais e na matriz das células corticais, induzindo assim uma acelerada meiose e mitose. Isso conduz a um tecido hipertrofiado: "o nódulo", uma estrutura típica das raízes das leguminosas. Dentro deste nódulo o *Rhizobium* perde a sua parede celular e transforma-se num bacteroide que, devido à acção da sua enzima nitrogenase, fixa o azoto (N<sub>2</sub>), e o converte em amónio (NH<sub>3</sub>), este último sendo transferido para o ribossoma vegetal para a síntese de proteínas. Ao mesmo tempo, por meio da fotossíntese, o CO<sub>2</sub> é reduzido em hidratos de carbono por parte da planta leguminosa, que servirá como fonte de carbono e energia para o *Rhizobium*, por conseguinte, é mantido activo no nódulo cobrindo assim as necessidades de azoto da planta Bauer T, 2001. "Microorganismos Fijadores de Nitrógeno: familia *Rhizobiaceae*".

Em: <http://www.microbiologia.com.ar/suelo/rhizobium.html>. Isto constitui a associação mais elaborada e eficiente entre plantas e microorganismos. É por isso que tem sido a mais amplamente estudada desde então. As bactérias do género *Azotobacter*, formam um grupo especial de microorganismos fixadores de azoto. Na medida em que são as únicas unicelulares e aparentemente capazes de fixar azoto em condições aeróbias (Andresson AJ et al., 1994 "Efecto de la inoculación con *Azotobacter* y MVA en vitroplantas de nome (*Dioscorea alata*)". *Cultivos Tropicales*, 15 (3):66). Do ponto de vista histórico, é o *Azotobacter* de facto, o microorganismo mais amplamente utilizado na agricultura. A primeira aplicação desta bactéria remonta a 1902, ganhando grande utilização

durante as décadas de 40, 50 e 60, em particular nos países da Europa do Leste (González J e C. Lluch, 1992. "Biología del nitrógeno. Interacción Planta-microorganismo". Ed. Rueda, Madrid, Espanha).

Outros microorganismos biofertilizantes são constituídos por várias estirpes do género *Pseudomonas*, que contribuem para o aumento da disponibilidade do fósforo assimilável (Lawrence RA, 2002. *Biofertilizers for rice cultivation. Agricultural Universities of India*. Em: <http://www.hinduonnet.com/thehindu/seta/2002/04/04/stories/2002040400120400.htm>).

A aplicação combinada de três espécies de bactérias: *Bacillus pumilus* Meyer e Gotheil, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn e *Curtobacterium flaccumfaciens* (Hedges) Collins e Jones, a sementes de pepino (*Cucumis sativus*, L.), proporcionou melhores resultados em comparação com a inoculação de cada uma separadamente (Raupach GS e Kloepper JW., 1998. *Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. Phytopatology*, 88: 1158-1164). Foi relatado o efeito positivo de estirpes de fungos micorrízicos, combinados com *Azotobacter* sp. e húmus de minhocas, sobre o crescimento de mudas de café (*Coffea arabica*). A combinação de *Glomus fasciculatum*, e *Glomus peúú* com *Azotobacter* resultou superior aos tratamentos de controlo (Sanchez, C. et al., 1994. "Utilización de las Micorrizas VA y *Azotobacter* sp. en la producción de posturas de *Coffea arabica* L". *Cultivos Tropicales*, 15 (3):69).

Nos cultivos de tomates, acelga, alface, vagem e rabanete, estes foram inoculados com *Glomus* sp. e *Azotobacter*, resultados positivos corroboraram a eficácia desta combinação que mostra claramente que os dois

microorganismos reagiram de um modo sinérgico (quando foram adicionados em simultâneo) (Terry E. *et al.*, 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).

A actividade nematocida da bactéria *Tsukamurella paurometabola*, estirpe C-924, foi anteriormente descrita como um controlo útil contra parasitas de animais e plantas (Mena J. *et al.*, Patentes EP 0774906 B1 e EP 1 356 733 A2).

O controlo biológico dos nemátodes é uma alternativa eficaz à utilização de pesticidas químicos na agricultura. O mecanismo desta acção bionematocida, foi relacionada com o efeito combinado de actividades de desulfurase e quitinase sobre os nemátodes e seus ovos. Até agora, não se conhece qualquer outra influência benéfica sobre as culturas que não seja derivada de sua acção directa sobre os nemátodes.

Embora o efeito rápido de fertilizantes químicos sobre o crescimento da planta seja um facto, os mesmos causam transtornos nutricionais em plantas além de efeitos secundários negativos sobre o solo. Devido a isso a obtenção de novos biofertilizantes é uma necessidade. Visam promover o crescimento e desenvolvimento das plantas sem provocar consequências nocivas indesejáveis, tanto para o ambiente como para as pessoas.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A presente invenção vem resolver o problema mencionado acima, ao fornecer uma composição de fertilizante biofertilizante que compreende pelo menos uma estirpe de *Tsukamurella paurometabola*, ou um mutante derivado da mesma, ou um metabolito derivado de tal estirpe, num

transportador apropriado, como especificados nas reivindicações. Tudo isto tem o efeito de estimular o crescimento e desenvolvimento fenológico das plantas. Além disso, esta já referida composição contribui para melhorar a fertilidade do solo, criando as condições para um desenvolvimento mais favorável das plantas.

Numa das suas formas de realização básicas, a composição biofertilizante da invenção compreende as bactérias conhecidas como *Tsukamurella paurometabola*, estirpe C-924 (Mena J. et al., 2003. *Biotecnologia Aplicada* 20(4):248-252), cuja capacidade de influenciar positivamente a fenologia de diversas espécies de plantas cultivadas, está adequadamente demonstrada.

Por conseguinte, com base nos resultados obtidos, é possível a criação de um método para estimular o desenvolvimento das plantas, por meio de um biofertilizante para ser utilizado na agricultura que ajuda as plantas a otimizar a aquisição de matéria orgânica, favorecendo desse modo, a assimilação de azoto e fósforo, elementos relacionados com a actividade de *T. Paurometabola*, estirpe C-924, sobre o solo ou num substrato natural ou artificial. Eventualmente, a aplicação de fertilizantes químicos é reduzida ou eliminada. Independentemente do efeito imediato que os fertilizantes exercem sobre o desenvolvimento da planta, os mesmos provocam outros transtornos nutricionais e efeitos secundários indesejados.

O efeito bio-estimulante de *T. paurometabola* sobre as plantas é gerado pela produção de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), associada ao crescimento destas bactérias que interage com a matéria orgânica e os aminoácidos presentes no solo ou substrato em que as plantas são cultivadas, ou sobre a matéria orgânica e os aminoácidos adicionados a qualquer mistura,

aplicada simultaneamente ou em combinação com esta bactéria. Ao mesmo tempo, este microorganismo participa da solubilização de fósforo, convertendo-o de não-absorvível para absorvível pelas plantas.

A aplicação da bactéria *T. Paurometabola*, estirpe C-924, ao solo, sobre um substrato (natural ou artificial) ou um transportador de matéria orgânica e/ou aminoácidos, é realizada por meio de uma suspensão celular que tem entre  $1,0 \times 10^7$  unidades formadoras de colónias (cfu)/mL e  $5,0 \times 10^{12}$  ufc/mL ou por um pó concentrado de aproximadamente  $10^{12}$  cfu/g de composição.

A composição que contém *T. Paurometabola*, estirpe C-924, (suportada por matéria orgânica, aminoácidos e outros veículos orgânicos), aplicada em combinação com outros biofertilizantes e bio-estimuladores, ou de forma independente, aumenta o desenvolvimento das plantas de uma maneira semelhante ou mesmo melhor do que outros microrganismos que promovem o crescimento de plantas utilizadas na agricultura.

Com os resultados obtidos, pode-se estabelecer um método, como definido nas reivindicações, para estimular o crescimento de plantas com base na utilização de um agente biofertilizante para uso agrícola que otimiza a aquisição de matéria orgânica pelas plantas, o que favorece a assimilação de azoto e de fósforo, elementos ligados à actividade de *T. Paurometabola*, estirpe C-924, quer aplicado ao solo ou a um substrato natural ou artificial.

Numa outra forma de realização da presente invenção, o metabolito compreendido na composição biofertilizante pode ser obtido de uma maneira natural, recombinante ou sintética. A composição biofertilizante da referida invenção pode ter vários tipos de veículos, tais como: um fertilizante orgânico, um solo pré-empacotado, um cobridor

de sementes, um pó, uma formulação de granulado, um nebulizador, um líquido, uma suspensão, ou qualquer das variantes acima mencionadas em forma encapsulada.

Numa outra execução desta invenção, a estirpe de *T. paurometabola* é combinada ou misturada com outros microorganismos biofertilizantes, tais como: *Bacillus subtilis*, *Rhizobium leguminosarum*, *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Glomus fasciculatum* e *Glomus*, ou um mutante derivado desses organismos, bem como qualquer outro princípio activo ou metabolito obtido a partir de tais estirpes, seja de uma maneira natural, sintética ou recombinante, num veículo adequado. É também um objecto da presente invenção um método para estimular o crescimento de plantas, caracterizado por compreender a) obter um agente biofertilizante que compreende um cultivo de uma estirpe de *Tsukamurella paurometabola* ou um metabolito derivado dessa estirpe, obtido de uma maneira natural, recombinante ou sintética; e b) colocar o solo ou qualquer substrato natural ou artificial em contacto com uma quantidade eficaz de um biofertilizante tal ou de um metabolito derivado desta estirpe. Numa forma de realização da invenção, o método descrito anteriormente é caracterizado por a estirpe de *Tsukamurella paurometabola* ser da estirpe C-924. No método para estimular o crescimento das plantas, a quantidade eficaz do agente biofertilizante é aplicada sobre o solo ou substrato numa suspensão aquosa com uma concentração de, aproximadamente, entre  $10^6$  e  $10^9$  cfu por mililitro de suspensão, e o agente biofertilizante é aplicado pelo menos uma vez ao solo ou misturado com o substrato.

O agente de biofertilizante e o método de estimular o crescimento de plantas da presente invenção é eficaz tanto para a produção de plantas utilizadas com o objectivo de

obter alimentos para seres humanos, como frutas e legumes, ou para plantas obtidas para a alimentação de animais, tais como pastagens, cereais, etc. É também aplicável a plantas ornamentais.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

**Figura 1.** Cinética da formação de amoníaco durante o cultivo de *T. paurometabola* C-924 num bio-reactor de 5 L. A temperatura de trabalho foi de 28 °C e o pH inicial foi a 7,0, com uma agitação de 500 rpm.

**Figura 2.** Correlação resultante do amoníaco acumulado e o peso seco da biomassa produzida no bio-reactor 5 L, nas referidas.

#### **Exemplos**

**Exemplo 1. Amoníaco produzido pela bactéria *T. paurometabola* estirpe C-924 cultivada num bio-reactor de 5 L.**

Uma vez criadas as condições, foi iniciado o processo de cultura de *T. paurometabola* estirpe C-924 num bio-reactor de 5 L. A temperatura foi regulada a 28 °C a uma velocidade de agitação de 500 rpm. As amostras de meio de cultivo foram colhidas em intervalos de tempo diferentes durante o processo de fermentação, (2, 4, 6, 8, 10, 12 e 13 h). Cinco mL de cada amostra (em triplicado) foram centrifugados e filtrados através de um filtro de 0,2 µm. A mistura filtrada foi submetida à análise de amónio de acordo com o método do reagente de Nessler. Para a sua determinação espectrofotométrica, foi utilizado um espectrofotómetro Pharmacia Biotech, com um comprimento de onda de 450 nm.

A produção de amoníaco, durante o cultivo de *Tsukamurella paurometabola* estirpe C-924 está representada na Figura 1, que mostra a cinética na formação de amoníaco no bio-reactor de 5 L (até 14 horas de cultura). A temperatura de

trabalho foi de 28 °C, e o pH inicial foi de 7,0. Observou-se que a produção de amoníaco foi associada ao crescimento de C-924, o que mostra a desaminação oxidativa do microorganismo de uma maneira constitutiva, na presença de substrato aminoacídico. O aumento do pH (em tempo) era perceptível quase a atingir o valor de 9,0, e a concentração de NH<sub>3</sub> até 934 µg/mL. Por conseguinte, a *T. paurometabola* estirpe C-924 pode ser considerada como um produtor elevado de amoníaco, em comparação com outros microorganismos (Hoffmann T., 1998. *Ammonification in Bacillus subtilis utilizing dissimilatory nitrate reductase dependent on resDE*. *Journal of Bacteriology*, vol. 180,1: 186-189; Takahasi N., 2000. *Metabolic Pathways for cytotoxic and product formation from glutamate and a spartate containing peptides by Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Bacteriology*, vol. 182, 17: 4704-4710).

A produção de NH<sub>3</sub> deve ser sustentada pelo processo de desaminação oxidativa que sofrem os aminoácidos componentes do meio de cultura (Vanhooke JL et al., 1999. *Phenylalanine desidrogenase from Rhodococcus sp. M4: high-resolution X-ray analysis of inhibitory ternary complexes reveal key features in the oxidative deamination mechanism*. *Biochemistry*, 38:2326-2329; Paustian T., 2001. *Microbiology Webbed Out*. Universidade de Wisconsin, Madison). É importante salientar que, por meio deste processo, os aminoácidos são desaminados obtendo-se o amoníaco e um resíduo de carbono (um α-cetoácido), uma vez que é necessário mais carbono energético do que azoto assimilável geralmente ocorre uma acumulação de amoníaco no meio de (Salle AJ, 1966. *Bacteriología*. Edición Revolucionaria, La Habana, Cuba). Presumivelmente, esse mecanismo se ajusta ao que aconteceu no processo de

acumulação de amoníaco pela *Tsukamurella paurometabola* estirpe C-924.

Na Figura 2 é mostrada a correlação experimental obtida entre os níveis de amoníaco no meio extracelular e a concentração celular expressa como peso seco da biomassa produzida no bio-reactor de 5 L. Ocorre uma relação linear entre ambas variáveis, o que indica uma produção de  $\text{NH}_3$  associada ao crescimento do microrganismo, cuja velocidade é constante em relação à concentração de biomassa.

**Exemplo 2. Solubilização de fosfato por *Tsukamurella paurometabola* estirpe C-924.**

O fósforo é um dos nutrientes mais importantes para o desenvolvimento das plantas, mas na maioria das ocasiões é encontrado numa forma insolúvel no solo. Uma elevada percentagem do fosfato inorgânico aplicada ao solo como fertilizante é rapidamente imobilizada após a aplicação e é mantida pelas plantas de um modo não disponível. Consequentemente, a liberação dessas formas insolúveis de fosfato será importante para aumentar a disponibilidade desse elemento no solo.

Com fins experimentais, a estirpe C-924 foi inoculada no meio NBRIP (Nautiyal C., 1999. *An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters* 170:265-270), útil para determinar microrganismos solubilizadores de fosfato. Incubou-se a 30 °C durante 10 dias. Após ter passado todos esses dias, observou-se o halo transparente característico deste meio.

Foi demonstrado que vários isolamentos que não mostram halo no meio sólido ou que fazem um halo muito pequeno, são capazes de solubilizar fosfato insolúvel em meios líquidos (Leyval C e Barthelin J., 1999. *Plant soil*, 17: 103-110). Por esse motivo, o ensaio foi levado a cabo num

meio líquido. Como controlo positivo, foi empregue *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25922.

As duas estirpes foram inoculadas em separado no meio NBRIP líquido, e foram incubadas a 30 °C com agitação de 180 rpm durante cinco dias. Além disso, um meio estéril (não inoculado) foi utilizado para validar o ensaio. As amostras foram analisadas cada 24 horas. Os cultivos de cada amostra foram centrifugados a 3000 rpm durante 25 minutos e o sobrenadante foi filtrado num filtro de 0,45 µm. Para cada caso, foi estabelecida a concentração de fosfato solúvel e foi utilizado o método de Fiske e Subbarow (Fiske e Subbarow Y H, 1925. *The colorimetric determination of phosphorus*. *J. Biol. Chem.* 66: 375-400). Os dados são apresentados na Tabela 1. Embora ambos os microorganismos mostraram a capacidade de solubilizar fosfatos, *Tsukamurella paurometabola* estirpe C-924 mostrou ser mais eficiente.

**Tabela 1. Resultados da medição de solubilização de fosfato pelas estirpes estudadas.**

| Tempo (dias) | Estirpe C-924 | Estirpe 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              |

**Exemplo 3. Efeito da composição biofertilizante que compreende *T. paurometabola* C-924 sobre o desenvolvimento e crescimento de plantas de bananeira (*Musa* sp. híbrida, cultivar "Macho").**

Foi seleccionado um solo "Castanho Macio Medianamente Carbonatado" (Instituto de Suelos, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministério

da Agricultura. Editorial AGRINFOR, Cuba). O referido solo foi peneirado através de uma malha de 0,5 cm (de diâmetro) para eliminar partículas indesejáveis. 5% de húmus de minhocas foram aplicados ao solo, a fim de aumentar o teor de matéria orgânica do solo, sobre 3% de matéria orgânica lábil e 12% de matéria orgânica total.

Mais tarde, potes de 15 cm de diâmetro superior e de 1,0 L de capacidade foram cheios, para serem utilizados nas experiências de actividade biológica.

Plântulas de bananeira (*Musa* sp. híbrida, cultivar "Macho") procedentes de cultivo de tecido in vitro, foram plantadas nos referidos potes. Para cada um dos seguintes tratamentos, foram utilizadas 10 réplicas:

1- Controlo: meio Luria Bertani (LB) + H<sub>2</sub>O a uma concentração de 1/1000, aplicado a uma proporção de 50 mL/pote.

2- *Bacillus subtilis* estirpe F16/95 [ajustado a  $1 \times 10^7$  esporos/mL], aplicada a uma proporção de 50 mL/pote.

3- *Tsukamurella paurometabola* estirpe C-924 [ajustada a  $1 \times 10^7$  cfu/mL], aplicada a uma proporção de 50 mL/pote.

Depois de três meses do início da experiência, a avaliação final foi feita visando esses parâmetros: peso da folhagem, peso das raízes e a soma total, dada em gramas. A experiência foi realizada numa estufa em condições semi-controladas. A Análise de Variância (ANOVA) foi aplicada aos dados obtidos dos pesos. A fim de saber em quais tratamentos se encontravam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), foi aplicado o teste de Tukey de comparações múltiplas. Além disso, o programa SYSTAT para Windows 7.0 foi aplicado para executar os cálculos estatísticos. Três meses após o transplante e a aplicação dos tratamentos, os resultados foram como se segue:

**Tabela 2. Média das medições em 10 plantas.**

| <b>Peso (gramas)</b>   | <b>Controlo</b>   | <b>C-924</b>      | <b>F 16/95</b>    |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|
| Raízes   | 3,3 <sup>a</sup>  | 26,8 <sup>a</sup> | 30 <sup>a</sup>   |
| Folhagem   | 10,9 <sup>b</sup> | 47,9 <sup>a</sup> | 59,4 <sup>a</sup> |
| Total  | 14,2 <sup>b</sup> | 74,7 <sup>a</sup> | 89,4 <sup>a</sup> |
| Valores médios com letras diferentes diferem significativamente, de acordo com o teste de Tukey de comparações múltiplas, para $p \leq 0,05$ . |                   |                   |                   |

Ambos os microrganismos utilizados foram capazes de impulsionar o crescimento das plantas de bananeira. Não foram observadas diferenças no crescimento entre os tratamentos com *T. paurometabola* estirpe C-924 e *Bacillus subtilis* estirpe F16/95 (as bactérias de controlo positivo). Estas últimas são bem conhecidas por aumentar o crescimento das plantas (Mc Spadden B B e Fravel D R, 2002. *Control of Plants Pathogens: Research, Commercialization, and Application in the USA*. Em: [http://www.phcmexico.com.mx/apsnet\\_biological\\_control.htm](http://www.phcmexico.com.mx/apsnet_biological_control.htm)).

**Exemplo 4. Efeito da *Tsukamurella paurometabola* estirpe C-924 sobre o desenvolvimento e crescimento de plantas de bananeira (*Musa sp. híbrida*, cultivar Cavendish).**

Foi seleccionado um solo "Castanho Macio Medianamente Carbonatado" (*Instituto de Suelos*, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministério da Agricultura. Editorial AGRINFOR, Cuba). O referido solo foi peneirado através de uma malha de 0,5 cm (de diâmetro) para eliminar partículas indesejáveis. 5% de húmus de minhocas foram aplicados ao solo, a fim de aumentar o teor de matéria orgânica do solo, sobre 3% de matéria orgânica lábil e 12% de matéria orgânica total.

Mais tarde, potes de 15 cm de diâmetro superior e de 1,0 L de capacidade foram cheios, para serem utilizados nas experiências de actividade biológica. Plântulas de

bananeira (*Musa* sp. híbrida, cultivar Cavendish) procedentes de cultivo de tecido *in vitro*, foram plantadas nos referidos potes. Para cada um dos seguintes tratamentos, foram utilizadas 10 réplicas:

1- Controlo: meio Luria Bertani (LB) + H<sub>2</sub>O a uma concentração de 1/1000, aplicado a uma proporção de 50 mL/pote.

2- *Bacillus subtilis* estirpe F16/95 [ajustado a  $1 \times 10^7$  esporos/mL], aplicada a uma proporção de 50 mL/pote.

3- *Tsukamurella paurometabola* estirpe C-924 [ajustada a  $1 \times 10^7$  ufc/mL], aplicada a uma proporção de 50 mL/pote.

Depois de cinco meses do início da experiência, a avaliação final foi feita visando esses parâmetros: peso da folhagem, peso das raízes e a soma total, dada em gramas.

A experiência foi realizada numa estufa em condições semi-controladas. A Análise de Variância (ANOVA) foi aplicada aos dados obtidos dos pesos. A fim de saber em quais tratamentos se encontravam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), foi aplicado o teste de Tukey de comparações múltiplas. Além disso, o programa SYSTAT para Windows 7.0 foi aplicado para executar os cálculos estatísticos. Cinco meses após o transplante e a aplicação dos tratamentos, os resultados foram como se segue:

**Tabela 3. Médias das medições em 10 plantas.**

| <b>Peso (gramas)</b>   | <b>Controlo</b>    | <b>C-924</b>       | <b>F 16/95</b>     |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|
| Raízes   | 25,06 <sup>b</sup> | 31,34 <sup>a</sup> | 36,04 <sup>a</sup> |
| Folhagem   | 42,48 <sup>b</sup> | 65,12 <sup>a</sup> | 63,32 <sup>a</sup> |
| Total  | 67,54 <sup>b</sup> | 96,46 <sup>a</sup> | 99,36 <sup>a</sup> |
| Valores médios com letras diferentes diferem significativamente, de acordo com o teste de Tukey de comparações múltiplas, para $p \leq 0,05$ . |                    |                    |                    |

Tal como no Exemplo 3, os dois microorganismos aplicados provocaram um crescimento significativo nas bananeiras. Não foram relatadas diferenças entre os tratamentos com a estirpe C-924 e com a estirpe F 16/95 de controlo.

**Exemplo 5. Efeito de *Tsukamurella paurometabola* C-924 sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas de soja (*Glycine max*). (Não faz parte da invenção)**

Foi seleccionado um solo "Ferralítico Vermelho" (Instituto de Suelos, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministério da Agricultura. AGRINFOR Editorial, Cuba). O referido solo foi peneirado através de uma malha de 0,5 cm (de diâmetro) para eliminar partículas indesejáveis. Este solo tinha um teor de 2,6% de matéria orgânica lábil e 10,7% de matéria orgânica total.

Potes de 15 cm de diâmetro superior e de 1,0 L de capacidade foram cheios, para serem utilizados nas experiências de actividade biológica. Foram utilizadas sementes pré-germinadas de soja. As sementes foram plantadas em número de três em cada pote. Vinte potes com três plantas cada, foram empregues com os seguintes tratamentos:

1. Controlo: meio Luria Bertani (LB) + H<sub>2</sub>O a uma concentração de 1/1000, aplicado a uma proporção de 50 mL/pote.

2. *Tsukamurella paurometabola* estirpe C-924 [ajustada a  $1 \times 10^6$  ufc/mL], aplicada a uma proporção de 100 mL/pote.

Os tratamentos foram aplicados um dia antes da sementeira das sementes pré-germinadas. Em seguida, sete dias após a sementeira, foi feita uma avaliação para testar os seguintes parâmetros: os pesos das raízes, caules e folhas foram monitorizados, assim como o peso total das plantas (dado em gramas). Foram avaliadas plantas de 10 potes, (30 ao todo).

A experiência foi realizada numa estufa em condições semi-controladas. A Análise de Variância (ANOVA) foi aplicada aos dados obtidos dos pesos. A fim de saber em quais tratamentos se encontravam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), foi aplicado o teste de Tukey de comparações múltiplas. Além disso, o programa SYSTAT para Windows 7.0 foi aplicado para executar os cálculos estatísticos.

Os valores médios resultantes (por plantas) recolhido a partir dos pesos frescos para cada avaliação e o seu significado são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4. Valores médios das medições em 30 plantas.**

| <b>Tratamento</b> | <b>Peso das raízes (g)</b> | <b>Peso dos caules (g)</b> | <b>Peso das folhas (g)</b> | <b>Peso da planta (g)</b> |
|-------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Controlo          | 0,388                      | 0,783                      | 0,564                      | 1,735                     |
| C-924             | 0,367                      | <b>1,066</b>               | <b>0,680</b>               | <b>2,113</b>              |

Após sete dias de crescimento, foram observadas diferenças significativas entre as plantas, tais como: aumento dos pesos frescos dos caules, bem como nas folhas e no peso total das plantas. Consequentemente, a conclusão leva à afirmação de que o tratamento com a composição que contém a estirpe C-924, produz resultados satisfatórios sobre a estimulação do crescimento e desenvolvimento das plantas.

**Exemplo 6. Efeito da *Tsukamurella paurometabola* estirpe C-924 sobre o crescimento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. Variedade FA-180) em condições de mudas.**

Em concordância, foi utilizada uma estufa adaptada para jardinagem de mudas. Como substrato para a muda, foi utilizada uma mistura de húmus de minhocas (50%), relva (25%) e zeólito (25%).

Dois tratamentos para o substrato foram aplicadas ao solo, três dias antes de plantar as sementes pré-germinadas:

a) Um tratamento com uma suspensão concentrada ( $5,0 \times 10^{11}$  ufc/mL) de *T. paurometabola* estirpe C-924 a uma proporção de 20 mL por 100 kg de substrato. Uma bomba de aspersão manual foi usada com uma adição de 10 L de água para ajudar a fazer homogênea a distribuição da suspensão de bactérias.

b) Tratamento de Controlo, em que se utilizou apenas água. No dia 22 da sua sementeira, quando as plântulas estavam prontas para serem transplantadas, mediu-se a altura de 40 plantas de cada tratamento. As plantas foram tomadas ao acaso, em 10 de locais diferentes dentro do canteiro de semente. A Tabela 5 mostra os valores médios das alturas por plantas. Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , ANOVA) foram apreciadas entre os tamanhos obtidos em ambos os tratamentos, foi observada uma clara influência da estirpe C-924. O efeito de aumento da referida estirpe foi substancial para as mudas de tomate no substrato com alto teor de matéria orgânica.

**Tabela 5. Média de medições em 40 plantas.**

| Tratamentos das mudas | Média da altura no dia 22 (cm) |
|-----------------------|--------------------------------|
| C-924                 | 16,22                          |
| Controlo              | 13,57                          |

**Exemplo 7. Efeito da *Tsukamurella paurometabola* estirpe C-924 sobre o crescimento e outros parâmetros fenológicos de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. Variedade FA-180) em condições de campo.**

Foi utilizada uma estufa (0,09 ha de superfície) com uma "Solo Castanho não-Carbonatado" (Instituto de Suelos, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministério da Agricultura. AGRINFOR Editorial, Cuba). O referido solo tinha um teor de matéria lábil de 3% e uma matéria orgânica total de 12%. Em seguida, a estufa foi

dividida em 16 parcelas onde um modelo experimental foi constituído com quatro tratamentos e igual número de réplicas. O procedimento foi como se segue:

- Tratamento com uma suspensão concentrada ( $5,0 \times 10^{11}$  ufc/mL) de *T. paurometabola* estirpe C-924, a uma proporção de 10 L/ha, aplicados através do sistema de irrigação. Isto foi feito sete dias antes do seu transplante.
- Tratamento com uma suspensão concentrada ( $5,0 \times 10^{11}$  ufc/mL) de *T. paurometabola* estirpe C-924, a uma proporção de 4 L/ha, aplicados através do sistema de irrigação. Isto foi feito sete dias antes do seu transplante.
- Tratamento químico: Basamid (Dazomet) a 600 kg/ha.
- Controlo (sem qualquer tratamento químico ou biológico).

Os dois tratamentos com a estirpe C-924 foram realizados por meio do auxílio de uma bomba ligada ao sistema de irrigação por gota, com uma produção total de irrigação de 1 L por metro quadrado de acordo com os parâmetros estabelecidos para a irrigação em estufas (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).

Quinze dias após o transplante, foram feitos os procedimentos de medição e contagem (10 plantas por parcela), incluindo os seguintes parâmetros:

- altura das plantas (cm).
- Número de folíolos por planta.
- Largura da base do caule (mm).
- Número de cachos de flores por planta.
- Número de flores por planta.

A Tabela 6 mostra um resumo dos resultados. Na verdade, ficou claramente estabelecido que a altura, o número de folíolos, e o número de flores foram significativamente superiores em ambos os tratamentos (com duas doses diferentes) com a estirpe C-924. Portanto, as propriedades de melhoramento deste agente biofertilizante estão além de qualquer dúvida.

**Tabela 6. Valores médios das medições aplicados a 10 plantas.**

| Tratamento     | Altura (cm)        | Folíolos          | Largura (mm)       | Cachos             | Flores            |
|----------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| C-924, 10 L/ha | 36,39 <sup>a</sup> | 8,78 <sup>a</sup> | 10,33 <sup>a</sup> | 1,15 <sup>ab</sup> | 653 <sup>ab</sup> |
| C-924, 4 L/ha  | 36,03 <sup>a</sup> | 9,08 <sup>a</sup> | 9,83 <sup>ab</sup> | 1,33 <sup>a</sup>  | 8,13 <sup>a</sup> |
| Controlo       | 25,42 <sup>b</sup> | 7,50 <sup>b</sup> | 9,70 <sup>ab</sup> | 1,03 <sup>bc</sup> | 4,58 <sup>c</sup> |
| Bas. 600 kg/ha | 29,10 <sup>b</sup> | 7,85 <sup>b</sup> | 8,65 <sup>b</sup>  | 0,93 <sup>c</sup>  | 5,23 <sup>b</sup> |

Valores médios com letras diferentes para cada parâmetro diferem significativamente de acordo com o Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**Exemplo 8. Comparação e interação de *Tsukamurella paurometabola* estirpe C-924 com *Rhizobium leguminosarum* no cultivo de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Cada tratamento incluiu cinco réplicas e quatro plantas por réplica. Uma semente foi plantada por canteiro, atingindo quatro canteiros por pote com uma profundidade de 3 cm nos potes de 1 L de capacidade. Para cada unidade ou pote experimental, 1,2 kg de "Solo Castanho Carbonatado" (Instituto de Suelos, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministério da Agricultura. AGRINFOR Editorial, Cuba) foram utilizados, com uma matéria orgânica lábil de 3,74% e uma matéria orgânica total de 14,2%, além de fósforo solúvel: 19,14 mg de  $P_2O_5/100$  g de solo.

O experimento foi conduzido numa estufa, em condições semi-controladas. Os tratamentos foram os seguintes:

- 1- Controlo sem qualquer inoculação.
- 2- *T. paurometabola* estirpe C-924 inoculada sete dias antes do plantio e sete dias após o plantio das culturas. A dose aplicada foi de 100 mL por pote com uma concentração de  $1 \times 10^9$  ufc/mL.
- 3- *R. leguminosarum* foi inoculada (com uma concentração de  $2,5 \times 10^8$  ufc/mL numa formulação sólida) misturada com húmus previamente peneirado. A quantidade atingiu 1 kg de biofertilizante por 45 kg de sementes.
- 4- Combinação dos tratamentos 2 e 3.

Seguindo as recomendações agroquímicas do "Instituto de Suelos" (Cuba), cada pote foi fertilizado de acordo com o conteúdo de  $P_2O_5$  e  $K_2O$  do solo. Os veículos utilizados foram: Ureia, Super Fosfato Triplo (TSF) e Cloreto de Potássio (KCl), para azoto, fósforo e potássio, respectivamente. A fertilização foi aplicada quatro dias antes do momento de plantação (no caso de fósforo e de potássio), enquanto para a ureia, foi aplicada 15 dias após a germinação. Para este cultivo, a quantidade aplicada foi de 217 kg/ha. Ao passo que, para TSF, e KCl, a fertilização atingiu 11,5 kg/ha e 60 kg/ha, respectivamente.

As variantes fenológicas avaliadas foram o número de folhas a cada sete dias, bem como o seu peso seco (MINAG, 1988. *Suelos. Análisis Químico. "Determinación de peso seco, materia orgánica y los índices del grado de acidez"*. NRAG. 892 e 878, Cuba). As variáveis foram avaliadas estatisticamente por ANOVA (classificação simples). O ensaio de comparação múltipla de Duncan foi utilizado para comparar as médias dos tratamentos (valores médios). O

pacote estatístico SPSS versão 8.0 (1997) foi aplicado, resultando nas medições especificados na Tabela 7.

**Tabela 7. Resultados obtidos da aplicação das estirpes inoculadas sobre os parâmetros fenológicos no cultivo de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).**

| Tratamentos  | Folhas, 36 dias    | Peso seco (%), 43 dias |
|--|--------------------|------------------------|
| Controlo   | 7,0 <sup>c</sup>   | 5,91 <sup>b</sup>      |
| C-924  | 12,10 <sup>a</sup> | 6,25 <sup>ab</sup>     |
| <i>Rhiz. leguminosarum</i>   | 10,60 <sup>b</sup> | 6,57 <sup>a</sup>      |
| C-924 + <i>Rhiz.</i>   | 10,10 <sup>b</sup> | 6,62 <sup>a</sup>      |
| Valores médios com letras diferentes diferem significativamente entre si (para cada medição) de acordo com o ensaio de comparações múltiplas de Duncan, para $p \leq 0,05$ . |                    |                        |

Quanto ao número de folhas, os melhores resultados foram obtidos no dia 36 com a aplicação de *T. paurometabola* estirpe C-924. Diferenças significativas com o resto dos tratamentos foram claramente demonstradas. No caso em que foram utilizadas ambas as estirpes, este parâmetro era semelhante ao tratamento com *R. leguminosarum*, no entanto, para o controlo, os resultados foram diferentes.

Em relação à percentagem de matéria seca, os maiores valores foram registados para a aplicação conjunta de ambas, *T. paurometabola* estirpe C-924 e *R. leguminosarum*. No entanto, estatisticamente falando, não diferem dos tratamentos em que o biofertilizante foi aplicado e em que não foi inoculado (controlo). Este facto é devido à presença de estirpes nativas de *R. leguminosarum* no solo e seu efeito positivo sobre o crescimento do cultivo de feijão.

**Exemplo 9. Comparação e interacção de *T. paurometabola* estirpe C-924 com *Azotobacter chroococum* e *Pseudomonas fluorescens* no cultivo de milho (*Zea maiz*).**

Havia cinco réplicas para cada tratamento e quatro plantas para cada réplica. As sementes foram plantadas a uma profundidade de 3 cm, o que significa uma semente por canteiro. Cada pote (capacidade de 1 L), tem quatro canteiros. Para cada pote experimental, foram utilizados 1,2 kg de "Solo Castanho Carbonatado". Este continha 3,74% de matéria orgânica lábil, (total 14%), fósforo solúvel de 19,14 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100 g de solo (Instituto de Suelos, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministério da Agricultura. AGRINFOR Editorial, Cuba).

A experiência foi realizada numa estufa, em condições semi-controladas. Os tratamentos foram os seguintes:

1. Controlo sem inoculação.
2. *T. paurometabola* estirpe C-924: inoculada sete dias antes de plantar as sementes e sete dias depois plantá-las, de acordo com os requisitos das aplicações no campo. A quantidade aplicada foi de 100 mL/pote com uma concentração de  $1 \times 10^9$  ufc/mL.
3. *A. chroococum* com uma concentração de  $4,5 \times 10^{10}$  ufc/mL numa formulação sólida, misturada com húmus previamente peneirado. A dose utilizada foi de 2 kg/ha.
4. *P. fluorecens* com uma concentração de  $2,7 \times 10^{10}$  ufc/mL numa formulação sólida, misturada com húmus previamente peneirado e uma dose de 2 kg/ha.
5. Combinação dos tratamentos 2 e 3.
6. Combinação dos tratamentos 2 e 4.

Cada pote tinha a sua fecundação necessária de acordo com os conteúdos de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e K<sub>2</sub>O do solo e de acordo com a recomendação agroquímicas feita pelo "Instituto de Suelos" (Cuba). Os veículos utilizados foram: ureia, Super Fosfato

Triplo (TSF) e Cloreto de potássio (KCl), para azoto, fósforo e potássio, respectivamente. No caso do fósforo e do potássio, a fertilização foi aplicada 4 dias antes de plantar as sementes, e para a ureia, a fertilização foi aplicada 15 dias depois da fase de germinação. O cultivo do milho teve uma adubação aplicada a uma taxa de 185 kg/ha de ureia, 121 kg/ha de TSP e 45 kg/ha de KCl.

As variáveis fenológicas avaliadas foram o diâmetro do caule, a altura da planta, o número de folhas (contado a cada sete dias), e o também o peso seco (MINAG, 1988. Suelo. Análisis Químico. "Determinación de peso seco, materia orgánica y los índices del grado de acidez". NRAG. 892 e 878, Cuba). A Tabela 8 é uma soma dos resultados da medição.

**Tabela 8. Resultado dos dados após a aplicação das estirpes inoculadas sobre os parâmetros fenológicos e a matéria seca no cultivo do milho (*Zea maiz* L.)**

| Tratamentos  | Diâmetro do caule, 36 dias | Nº de folhas, 36 dias | Altura (cm), 36 dias | Peso seco (%)     |
|--|----------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------|
| Controlo   | 8,56 <sup>b</sup>          | 6,30 <sup>b</sup>     | 69,79 <sup>b</sup>   | 4,80 <sup>b</sup> |
| C-924  | 10,71 <sup>a</sup>         | 11,70 <sup>a</sup>    | 77,70 <sup>a</sup>   | 5,08 <sup>a</sup> |
| <i>Azotobacter</i>   | 8,84 <sup>b</sup>          | 6,80 <sup>b</sup>     | 71,70 <sup>ab</sup>  | 5,12 <sup>a</sup> |
| <i>Pseudomonas</i>   | 8,69 <sup>b</sup>          | 6,30 <sup>b</sup>     | 75,15 <sup>ab</sup>  | 5,25 <sup>a</sup> |
| C-924-Azot   | 10,09 <sup>a</sup>         | 7,10 <sup>b</sup>     | 77,05 <sup>a</sup>   | 5,10 <sup>a</sup> |
| C-924-Pseud  | 10,70 <sup>a</sup>         | 7,20 <sup>b</sup>     | 69,20 <sup>b</sup>   | 5,16 <sup>a</sup> |
| Valores médios com letras diferentes diferem significativamente entre si de acordo com o ensaio de comparações múltiplas de Duncan, para $p \leq 0,05$ . |                            |                       |                      |                   |

Os melhores valores para cada um dos parâmetros fenológicos estudados foram alcançados quando *T. paurometabola* estirpe C-924 foi aplicada, por si só ou em

combinação com outros promotores do crescimento. Quanto ao número de folhas, o resultado obtido para a aplicação de apenas C-924 foi maior, do ponto de vista estatístico (teste de Duncan,  $p \leq 0,05$ ), em comparação com o resto dos tratamentos.

Os melhores resultados no desenvolvimento das culturas durante a aplicação de *T. paurometabola* estirpe C-924 indicam que há elementos adicionais para o crescimento das plantas que são devidos a compostos azotados que são libertados durante a degradação da matéria orgânica.

Em relação à percentagem de matéria seca de plantas de milho, uma vez que o estudo foi completado, ficou evidente que todas as variantes inoculadas com um ou outros microorganismo apresentam valores semelhantes, mas sempre superiores aos do controlo não inoculado. Isto vem corroborar a eficácia dos biofertilizantes estudados no crescimento da cultura (Haggag. W. M, 2002. *Sustainable Agriculture Management of Plant Disease. Online Journal of Biological Science*, 2:280-284).

**Exemplo 10. Interacção de *T. paurometabola* estirpe C-924 com micorrizas arbusculares na cultura de alface (*Lactuca sativa*).**

Um "Solo Ferrítico Vermelho Púrpura" (Instituto de Suelos, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministério da Agricultura. Ed: AGRINFOR, Cuba) foi utilizado para esta experiência. O referido solo continha 2,9% de matéria orgânica lábil e 11,8% de matéria orgânica total, distribuídas em potes com capacidade de 1 L. Foram utilizadas sementes de alface pré-germinada (*Lactuca sativa*) da variedades Black Simpson.

A estirpe C-924 foi utilizada na forma de um pó humectante concentrado a  $2 \times 10^{12}$  ufc/mL. A mesma foi inoculada sete dias antes da plantação da semente, utilizando uma

suspensão aquosa a uma concentração de  $3 \times 10^7$  ufc/mL. Uma irrigação adequada foi seguida diariamente, de modo a não superar a capacidade de retenção de humidade do solo.

As micorrizas arbusculares (AM) *Glomus fasciculatum* e *Glomus* previamente formulada no "Instituto Nacional de Ciências Agrícolas de Cuba" foram aplicadas no momento da plantação das sementes, com uma quantidade de 200 g/m<sup>2</sup> (20 g por pote). Um modelo experimental de seis tratamentos com quatro réplicas foi utilizado, cada um deles com 4 plantas de alface. As plantas foram mantidas (durante 30 dias) em condições semi-controladas numa estufa. Os tratamentos foram como a seguir:

- Tratamento 1: Solo sem inoculação (Controlo).
- Tratamento 2: solo inoculado com C-924.
- Tratamento 3: Solo inoculado com *Glomus fasciculatum* e C-924.
- Tratamento 4: Solo inoculado com *Glomus fasciculatum*.
- Tratamento 5: Solo inoculado com *Glomus clarum* e C-924.
- Tratamento 6: Solo inoculado com *Glomus clarum*.

Após 30 dias de ser plantada, o peso fresco da folhagem para cada planta foi verificado em todos os tratamentos. A Tabela 9 mostra um resumo dos resultados. Os tratamentos que envolveram a *T. paurometabola* estirpe C-924 foram significativamente melhores do que o controlo (solo sem inoculação). Para ambos os casos, a combinação de *T. paurometabola* estirpe C-924 + *G. clarum*. e *T. paurometabola* estirpe C-924 + *G. fasciculatum* apresentou melhores resultados do que os tratamentos em que a mesma AM foi aplicada separadamente. Isto foi em relação ao aumento de peso da folhagem das plantas.

**Tabela 9. Comparação de valores médios peso da parte aérea das plantas de alface em cada tratamento.**

| Tratamentos  | Peso da folhagem (g)  |
|--|-----------------------|
| Controlo   | 0,9835 <sup>a</sup>   |
| C-924  | 13,56425 <sup>b</sup> |
| C-924 + <i>G. fasciculatum</i>   | 23,0545 <sup>c</sup>  |
| <i>G. fasciculatum</i>   | 27,2235 <sup>b</sup>  |
| C-924 + <i>G. Clarum</i>   | 29,503 <sup>d</sup>   |
| <i>G. clarum</i>   | 25,30975 <sup>c</sup> |
| Valores médios com letras diferentes apresentaram diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$ (Tukey). |                       |

**Exemplo 11. Ensaio de compatibilidade entre *T. paurometabola* estirpe C-924 e *G. fasciculatum* em pepino (*Cucumis sativus*. Var. Poinset) cultivados em estufas.**

Estavam disponíveis duas estufas com um "Solo Castanho não-Carbonatado" (Instituto de Suelos, 1999. *Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba*. Ministério da Agricultura. AGRINFOR Editorial, Cuba). O referido solo tinha um teor de 3,1% de matéria orgânica lábil e um total de 12,3% de matéria orgânica. Foi realizado um modelo experimental com parcelas de igual tamanho (30 m<sup>2</sup>); foram realizados quatro tratamentos com quatro réplicas da seguinte forma:

- Tratamento 1: Solo inoculado com *Glomus fasciculatum* e C-924.
- Tratamento 2: Solo inoculado com *Glomus fasciculatum*.
- Tratamento 3: solo inoculado com C-924.
- Tratamento 4: solo sem qualquer inoculação (Controlo).

A estirpe C-924 e a AM foram aplicadas sete dias antes de plantar as sementes e em dois outros momentos em intervalos de 21 dias após a sua primeira aplicação, de

acordo com as doses requeridas por m<sup>2</sup>, como aplicado no Exemplo 10. O rendimento (peso) dos frutos comerciais colhidos foram avaliadas durante o ciclo de cultivo (98 dias) para cada tratamento. Os resultados podem ser vistos na Tabela 10.

Com referência ao grupo de Controlo, um aumento significativo do peso das frutas foi obtido para as plantas que receberam tratamento com tratamento *T. paurometabola* estirpe C-924 de, bem como aqueles tratados com *Glomus fasciculatum*. Além disso, a aplicação combinada dos microrganismos resultou num maior peso das frutas, em comparação com a aplicação por separado. Esta diferença foi estatisticamente significativa.

**Tabela 10. Comportamento do rendimento em estufas com aplicação combinada de C-924 e o fungo micorrízico *G. fasciculatum*.**

| <b>Tratamentos</b>  | <b>Peso médio das frutas por parcela (kg) .</b> |
|---|---|
| <i>G. fasciculatum</i> + C-924  | 501,5 <sup>a</sup>                              |
| <i>Glomus fasciculatum</i>  | 448,5 <sup>b</sup>                              |
| <i>T. paurometabola</i> estirpe C-924   | 443,0 <sup>b</sup>                              |
| Controlo  | 303,5 <sup>c</sup>                              |
| Valores médios com letras diferentes apresentaram diferenças estatisticamente significativas, $p \leq 0,05$ (Tukey) . |   |

Lisboa,

**REIVINDICAÇÕES**

1. Composição biofertilizante para estimular o crescimento e o desenvolvimento fenológico das plantas, caracterizada por compreender pelo menos uma estirpe de *Tsukamurella paurometabola*, um mutante derivado da mesma ou um metabolito derivado da referida estirpe num veículo apropriado, em que a referida composição compreende uma quantidade eficaz no intervalo de  $10^7$  a  $5,0 \times 10^{12}$  unidades formadoras de colónia (CFU) de *Tsukamurella paurometabola* por mililitro ou grama de meio de cultura.
2. Composição biofertilizante de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por a referida estirpe de *Tsukamurella paurometabola* ser a estirpe C-924.
3. Composição biofertilizante de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por a quantidade eficaz da estirpe C-924 de *Tsukamurella paurometabola* na composição ser no intervalo de  $10^9$  a  $10^{12}$  unidades formadoras de colónia (cfu) por mililitro ou grama de meio de cultura.
4. Composição biofertilizante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, caracterizada por o metabolito ser obtido por uma maneira natural, recombinante ou sintética.
5. Composição biofertilizante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, caracterizada por o veículo ser um fertilizante orgânico, um solo pré-empacotado, um revestimento de sementes, um pó, um granulado, um nebulizador, um líquido, uma suspensão, ou qualquer dessas variantes numa forma encapsulada.
6. Composição biofertilizante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, caracterizada por a referida estirpe de *Tsukamurella paurometabola* ser combinada ou

misturada com outros microrganismos biofertilizantes, tais como *Bacillus subtilis*, *Rhizobium leguminosarum*, *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Glomus fasciculatum* e *Glomus*, ou um mutante derivado desses organismos, bem como qualquer outro princípio activo ou metabolito obtido a partir de tais estirpes, de uma maneira natural, sintética ou recombinante, num veículo adequado.

7. Método para estimular o crescimento das plantas, caracterizado por:
  - a) fornecer um agente biofertilizante que compreende um cultivo de uma estirpe de *Tsukamurella paurometabola* ou um metabolito derivado dessa estirpe, obtido de uma maneira natural, recombinante ou sintética;
  - b) colocar o solo ou um substrato natural ou artificial em contacto com uma quantidade eficaz do referido biofertilizante ou o metabolito derivado da referida estirpe, em que a referida quantidade eficaz está no intervalo de  $10^6$  a  $5,0 \times 10^{12}$  unidades formadoras de colónia (cfu) de *Tsukamurella paurometabola* por mililitro ou grama de meio de cultivo.
8. Método para estimular o crescimento das plantas de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado por a estirpe de *Tsukamurella paurometabola* ser a estirpe C-924.
9. Método para estimular o crescimento das plantas de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado por a quantidade eficaz do agente biofertilizante a ser aplicada ao solo, ou substrato numa suspensão aquosa ser numa concentração de aproximadamente entre  $10^6$  e  $10^9$  cfu por mililitro ou grama de meio de cultivo.
10. Método para estimular o crescimento das plantas de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por o

agente biofertilizante ser aplicado pelo menos uma vez ao solo, ou misturado com o substrato.

Lisboa,

## FIGURAS

Fig. 1

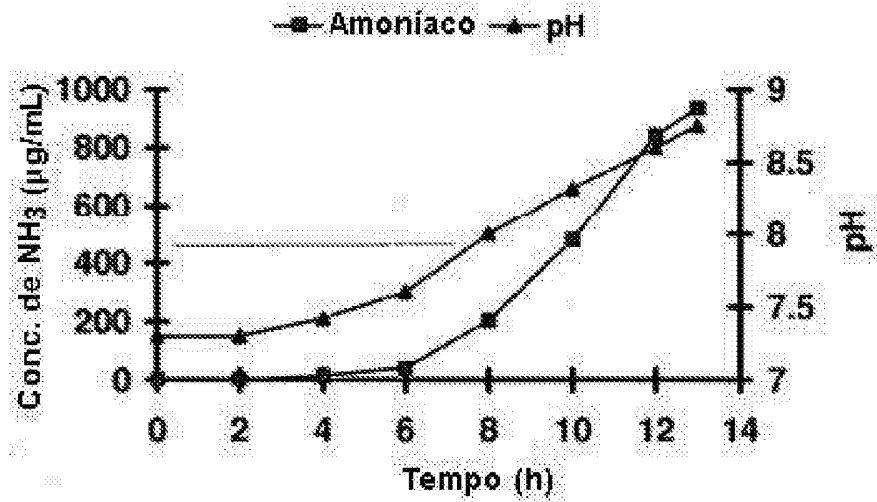


Fig. 2

