

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 954 078**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2010.01)

C05F 11/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2015** **PCT/US2015/059565**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.06.2016** **WO16085637**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2015** **E 15863850 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023** **EP 3223616**

54 Título: **Consorcios bacterianos sinérgicos para movilizar fósforo del suelo**

30 Prioridad:

25.11.2014 US 201462084303 P
05.06.2015 US 201562171643 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.11.2023

73 Titular/es:

**COLORADO STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION (100.0%)**
P.O. Box 483
Fort Collins, CO 80522, US

72 Inventor/es:

WALLENSTEIN, MATTHEW D. y
BELL, COLIN W.

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 954 078 T3

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

DESCRIPCIÓN

Consorcios bacterianos sinérgicos para movilizar fósforo del suelo

5 Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de conformidad con 35 U.S.C. § 119(e) de la solicitud de patente provisional de EE. UU. nº 62/084.303, presentada el 25 de noviembre de 2014, y de 62/171.643, presentada el 5 de junio de 2015.

10 Lista de secuencias

En el presente documento se incorpora una lista de secuencias presentada en formato legible con ordenador. El archivo legible con ordenador se llama P253038us03_SynergisticBacteriaConsortia.TXT, se creó el 8 de septiembre de 2015 y contiene 16 kilobytes.

Campo

La presente descripción se refiere a combinaciones de cultivos bacterianos aislados y a composiciones que comprenden dichos cultivos, en donde las combinaciones tienen mayor actividad que la que se observaría para los cultivos de bacterias individuales. Una composición de la presente descripción se puede utilizar ventajosamente para aumentar la disponibilidad del fósforo del suelo y otros macronutrientes y/o micronutrientes para las plantas, y de esta manera potenciar su crecimiento y rendimiento.

25 Antecedentes

En los Estados Unidos y la mayoría de las regiones por todo el mundo, muchas granjas sufren de una eficiencia reducida del uso de fósforo (P), lo que significa que los aportes de P (fertilizante o abono) son mayores que el P cosechado en los cultivos. Incluso cuando se aplica a los suelos un fertilizante de P aparentemente adecuado, el 70-90% puede llegar a estar rápidamente no disponible para una absorción por parte de las plantas. Esto se debe en gran medida a que el P fácilmente se absorbe a las superficies minerales resistentes a la intemperie dentro del perfil del suelo. A lo largo del tiempo, esto crea grandes acumulaciones de P en el suelo residual que no está disponible para la absorción por parte de las plantas. A modo de respuesta, los agricultores frecuentemente aplican fertilizante de P excediendo los requerimientos de las plantas, lo cual contribuye a una escorrentía del P en el agua subterránea y a la eutrofización de los ecosistemas acuáticos.

La conciencia ambiental, las limitaciones de recursos y la opinión pública en general están aumentando la demanda de tecnologías y productos ecológicos eficientes como opciones a los fertilizantes fosforados tradicionales. Estas tecnologías y productos ecológicos son aquellos que promueven la sostenibilidad y tienen un impacto mínimo en el medio ambiente. Un área que se está explotando para desarrollar tecnología y productos ecológicos es el uso de microorganismos y sus propiedades especializadas. Si bien la mayor parte del P del suelo no está disponible para las plantas, algunos microorganismos tienen la capacidad de solubilizar el P inorgánico y otros micronutrientes y mineralizar el P orgánico en ortofosfato soluble que está disponible para la absorción en las plantas. En conjunto, estos dos procesos movilizan el fósforo del suelo, aumentando su disponibilidad para las plantas.

El documento US 2007/227212 A1 describe un método para aumentar la disponibilidad del fosfato en el suelo que comprende aplicar materiales de roca fosfórica o roca fosfórica de dolomita con material orgánico y bacterias que disuelven el P, tales como *Citrobacter freundii* y *Enterobacter cloacae*.

El documento WO 2011/154963 A1 describe que *Enterobacter spp.* y *Pseudomonas putida* son microorganismos solubilizadores de fosfato.

RODRIGUEZ H ET AL.: "Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion", BIOTECHNOLOGY ADVANCES, ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB, vol. 17, nº 4-5, 1 de octubre de 1999 (1991-10-01), páginas 319-339 describe que *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* y *Pseudomonas putida* son bacterias solubilizadoras de fosfato.

También se ha informado sobre otros cultivos aislados de bacterias y hongos que movilizan el fósforo. Si bien existe un gran potencial para mejorar la movilización microbiana del P, el progreso en la comercialización de composiciones microbianas ha sido muy limitado. En algunos casos, los inóculos bacterianos comerciales no pueden mejorar significativamente la disponibilidad de P o el crecimiento de las plantas, incluso con concentraciones de uso elevadas, debido a inestabilidad bajo ciertas condiciones como alta temperatura y pH elevado, y por la identificación de cepas individuales a través de técnicas de cultivo tradicionales para uso en los inóculos. El uso de combinaciones de al menos dos cultivos aislados de bacterias puede mejorar la actividad, ampliar las aplicaciones potenciales, reducir las concentraciones de uso y los costos, y reducir la

necesidad de aportes de fertilizantes químicos. Las combinaciones de diferentes cultivos aislados de bacterias pueden proporcionar un rendimiento mejorado en una variedad más amplia de suelos y climas debido a la redundancia funcional. Existen muchos otros inóculos microbianos en el mercado que pretenden estimular el vigor de las plantas. Esos productos contienen una mezcla indefinida de microbios que se cultivan sobre productos de desecho orgánicos y son esencialmente un té de compost sin una funcionalidad mecánica definida. Si bien hacen afirmaciones generales, esos productos no son muy efectivos y solo han penetrado en un mercado reducido de fanáticos.

En consecuencia, existe una necesidad de desarrollar tecnologías basadas en microorganismos y productos para la movilización de P que sean estables bajo diversas condiciones, tengan una vida útil apreciable, combinen dos o más cepas y aumenten el crecimiento y el vigor de las plantas al tiempo que reducen los aportes químicos y el impacto ambiental.

Compendio

Los cultivos aislados microbianos y los consorcios (mezclas de dos o más cepas bacterianas distintas) se pueden usar para mejorar la movilización microbiana del P, aumentando así la disponibilidad del fósforo del suelo para las plantas, aumentando su absorción de fósforo y su crecimiento. Las aplicaciones incluyen, pero no se limitan a, cultivos agrícolas y pastos.

La presente descripción se dirige a composiciones que contienen y a métodos de uso de cultivos aislados bacterianos y comunidades. En particular, la presente descripción se dirige a una composición que contiene uno o más microorganismos procedentes de los consorcios bacterianos tal y como se describen en el presente documento, particularmente en la Tabla 1 o mezclas de los mismos. En una realización preferida, la composición incluirá dos o más cepas procedentes de las enumeradas en la Tabla 1.

Los microorganismos se pueden caracterizar por una secuencia del gen ribosómico 16S identificador que se corresponde con y es al menos 97% idéntico a las SEQ ID NOs 1-4 y/o mediante comparación con bacterias con los números de registro de NRRL: NRRL B-67136, NRRL B-67137, NRRL B-67138 y NRRL B-67139.

En determinadas realizaciones, las composiciones incluirán componentes adicionales tales como aditivos, agentes auxiliares y excipientes además de los consorcios bacterianos. Esos componentes adicionales pueden mejorar el crecimiento de las bacterias, inducir la producción de metabolitos específicos a través de las bacterias, mejorar la estabilidad de la composición, agregar color, agregar valor nutritivo y/o proporcionar otros atributos a las composiciones de la presente descripción. Los aditivos adecuados incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, quitina, quitosano, glucosamina, aminoácidos, minerales, vitaminas, sales, conservantes y otros aditivos conocidos en la técnica para mejorar el crecimiento, inducir la producción de metabolitos específicos o estabilizar la composición.

Las composiciones descritas en este documento pueden estar en forma acuosa o seca. Las composiciones se pueden aplicar como un líquido (que puede incluir cultivos vivos y/o latentes, o extractos), mezclas secas, recubrimientos de semillas u otras formas de aplicación. La composición se puede proporcionar en forma diluida o concentrada. En una realización, la composición está concentrada. En otra realización, la composición está diluida.

Los métodos de la presente descripción incluyen el uso de la composición descrita para enriquecer el suelo y/o las plantas. Las composiciones se pueden aplicar sobre el suelo, semillas y plántulas o plantas maduras. La composición se puede aplicar sobre el suelo en forma líquida o seca. La composición se puede aplicar sobre la superficie del suelo o mezclar en el suelo usando métodos conocidos en la técnica, tales como inyección, labranza y/o arado. En otro aspecto, la composición puede usarse para enriquecer plantas. La composición se puede aplicar sobre el suelo o sobre una fuente de agua o fertilizante, incluidos los sistemas hidropónicos y aeropónicos, que luego se administran al suelo y/o a la planta en forma líquida o seca. En otro aspecto, la composición puede usarse para enriquecer semillas antes de plantarlas. En diversas realizaciones, la planta o semilla puede cultivarse en diversos entornos, incluidos campos y contenedores. En muchas realizaciones, la planta o semilla puede crecer en suelo natural, suelo sintético o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el suelo puede comprender fibras de coco, lana de roca y/u otros medios adecuados bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, las semillas se pueden poner a remojo en una solución acuosa que contiene la composición descrita y/o las semillas se pueden recubrir con la composición. El tratamiento del suelo, las semillas y las plántulas también puede incluir aplicaciones repetidas de las composiciones anteriores.

Los métodos de la presente descripción incluyen el uso de una composición de microorganismos como reemplazo químico o suplemento para evitar o reducir la aplicación de fertilizantes que contienen fósforo.

La aplicación de las composiciones descritas permite una eliminación o reducción significativa de la cantidad de fertilizante, fungicida y/o insecticida utilizada en aplicaciones agrícolas. En algunas realizaciones, el uso de

las formulaciones bacterianas da como resultado una disminución en la cantidad de emisiones de gases de efecto invernadero.

Breve descripción de los dibujos

5

Figura 1. El gráfico de dispersión muestra un crecimiento bacteriano estable, medido como unidades formadoras de colonias (ufc/ml) en medios líquidos de alfalfa en función del tiempo.

10

Figura 2. El gráfico de dispersión muestra niveles de pH estables en medios líquidos de alfalfa con o sin tampón PO_4 añadido.

Figura 3. Histograma de frecuencia que muestra una amplia variabilidad en la solubilización microbiana de P inorgánico y entre comunidades bacterianas aisladas de suelos de pastizales naturales

15

Figura 4. Capacidades de solubilización bacteriana de P observadas que finalmente se estabilizan en la generación nº 27 después de una mejora progresivamente rápida desde la generación nº 1; representando consorcios cada vez más superiores seleccionados para mejorar las tasas de solubilización del fósforo a través de las generaciones posteriores.

20

La Figura 5 son gráficos que muestran la capacidad de todos los cultivos aislados microbianos y combinaciones de cultivos aislados para producir ortofosfato (PO_4) más disponible. Estos hallazgos demuestran cómo puede tener lugar una movilización mejorada del ortofosfato (PO_4) con las sinergias de múltiples especies bacterianas. Más específicamente, un consorcio con dos especies, incluidas *Enterobacter cloacae* (Ec) y *Citrobacter freundii* (Cf), muestra la mejora sinérgica más fuerte en la movilización de PO_4 ; pero también se observó una mejora sinérgica con un grado ligeramente menor al incluir *Pseudomonas putida* (Pp). Los cultivos aislados bacterianos no demuestran el mismo beneficio aditivo para mejorar la movilización de PO_4 en comparación con el efecto del consorcio.

25

30

Las Figuras 6A y 6B son gráficos que muestran una biomasa de trigo mejorada con el uso de un aspecto de la presente descripción para dos variedades de trigo diferentes, la Figura 6A Byrd y la Figura 6B Hatcher. La biomasa del trigo se recolectó al final de la temporada de crecimiento en un ensayo de invernadero. Los resultados muestran que el bioestimulante microbiano movilizador de P de la Solicitante (Elevate P; una realización de la composición descrita) con fertilizantes inorgánicos tradicionales mostraba una emergencia más rápida y un mayor crecimiento, en comparación con dos productos bioestimulantes microbianos de la competencia con fertilizantes inorgánicos tradicionales (BioApt Inoc y Accomplish).

35

40

Las Figuras 7A, 7B y 7C son gráficos que muestran la altura de la hierba a los 8 y 10 días desde la siembra con el bioestimulante microbiano movilizador de P de la Solicitante (Elevate P) y fertilizantes inorgánicos tradicionales. Los resultados muestran que el bioestimulante microbiano movilizador de P de la Solicitante (Elevate P) mostraba una emergencia más rápida y un mayor crecimiento, en comparación con los fertilizantes inorgánicos tradicionales (Fertilizante inorgánico), en ballica Fig. 7A, festuca alta Fig. 7B y pasto azul de Kentucky Fig. 7C.

45

Las Figuras 8A, 8B y 8C son gráficos que muestran el color verde oscuro para el pasto azul de Kentucky Fig. 8A, festuca alta Fig. 8B y ballica Fig. 8C usando el bioestimulante microbiano movilizador de P de la solicitante (Elevate P) y fertilizantes inorgánicos tradicionales. Los resultados muestran que una realización del bioestimulante microbiano que moviliza P de la presente descripción (Elevate P) mostraba un color más verde en relación con los fertilizantes inorgánicos tradicionales (Fertilizante inorgánico).

50

Las Figuras 9A, 9B, 9C y 9D son gráficos que muestran el crecimiento vegetal descrito como g/cm^2 normalizado seco para pasto azul Fig. 9B, pasto azul de Kentucky Fig. 9C, festuca alta Fig. 9A y ballica Fig. 9D usando el bioestimulante microbiano movilizador de P de la solicitante (Elevate P) y fertilizantes inorgánicos tradicionales. Los resultados indican que el bioestimulante microbiano movilizador de P de la descripción (Elevate P) conducía a un mayor crecimiento de las plantas que los fertilizantes inorgánicos tradicionales (Fertilizante inorgánico).

55

60

La Figura 10 es un gráfico que muestra el crecimiento vegetal descrito como g/cm^2 normalizado seco para pasto azul de Kentucky usando el bioestimulante microbiano movilizador de P de la solicitante (Elevate P) y fertilizantes inorgánicos tradicionales. Los resultados indican que el bioestimulante microbiano movilizador de P de la descripción (Elevate P) conducía a un mayor crecimiento de las plantas que los fertilizantes inorgánicos tradicionales (MG = Miracle Gro).

65

Las Figuras 11A, 11B, 11C, 11D y 11E son gráficos que muestran la absorción de nutrientes en el tejido vegetal para pasto azul de Kentucky usando el bioestimulante microbiano movilizador de P de la solicitante (Elevate P) y fertilizantes inorgánicos tradicionales. Los datos muestran que las semillas inoculadas con la composición bioestimulante microbiana movilizadora de P de la descripción (Elevate P) mostraban un aumento de la

absorción de calcio del suelo (Ca, Fig. 11A), magnesio (Mg, Fig. 11B), sodio (Na, Fig. 11C), potasio (K, Fig. 11D y hierro (Fe, Fig. 11E), en comparación con los fertilizantes inorgánicos tradicionales (Fertilizante inorgánico).

Las Figuras 12A, 12B y 12C son gráficos que muestran en la Fig. 11A los días antes de la primera floración, en la Fig. 11B el número de plantas que emergieron después de 3 semanas y el rendimiento en 11C para las plantas de jalapeño con el fertilizante bioestimulante microbiano movilizador de P de la solicitante (Elevate P) y el fertilizante inorgánico tradicional. Los resultados muestran que el bioestimulante microbiano movilizador de P de la solicitante (Elevate P) mostraba una emergencia y floraciones más rápidas en comparación con los fertilizantes inorgánicos tradicionales (MG = Miracle Gro).

Las Figuras 13A y 13B son gráficos que muestran en la Fig. 13A el nº de tomates después de 4 meses y en la Fig. 13B el nº de plantas que emergieron después de 3 semanas para plantas de tomate cereza con el bioestimulante microbiano movilizador de P de la solicitante (Elevate P) y fertilizantes inorgánicos tradicionales. Los resultados muestran que el bioestimulante microbiano movilizador de P de la solicitante (Elevate P) mostraba una emergencia más rápida en comparación con los fertilizantes inorgánicos tradicionales (MG = Miracle Gro).

Las Figuras 14A y 14B son gráficos que muestran en la Fig. 14A el nº de plantas que emergieron después de 3 semanas y el rendimiento en la Fig. 14B para plantas de tomate Brandywine con el bioestimulante microbiano movilizador de P de la solicitante (Elevate P) y fertilizantes inorgánicos tradicionales. Los resultados muestran que el bioestimulante microbiano movilizador de P de la solicitante (Elevate P) mostraba una emergencia más rápida y un mayor rendimiento en comparación con los fertilizantes inorgánicos tradicionales (MG = Miracle Gro).

La Figura 15 es un gráfico que muestra el número de plantas que emergieron después de 3 semanas para las plantas de albahaca con el bioestimulante microbiano movilizador de P de la solicitante (Elevate P) y fertilizantes inorgánicos tradicionales. Los resultados muestran que el bioestimulante microbiano movilizador de P de la solicitante (Elevate P) mostraba una emergencia más rápida en comparación con los fertilizantes inorgánicos tradicionales (MG = Miracle Gro).

La Figura 16 es un gráfico que muestra el número de plantas que emergieron después de 3 semanas para las plantas de caléndula con el bioestimulante microbiano movilizador de P de la solicitante (Elevate P) y fertilizantes inorgánicos tradicionales. Los resultados muestran que el bioestimulante microbiano movilizador de P de la solicitante (Elevate P) mostraba una emergencia más rápida en comparación con los fertilizantes inorgánicos tradicionales (MG = Miracle Gro).

La Figura 17 es una tabla, la Tabla 4.1, que muestra un análisis elemental del césped. Los datos presentados demuestran una mayor absorción de nutrientes por parte de las plantas para varios macro y micronutrientes cuando se inoculan con bioestimulantes (las tasas más altas se indican en negrita). *T = Tratamiento; M = Humedad*; el Tratamiento 1 es consorcios microbianos que movilizan P de la presente descripción; el Tratamiento 2 es medio estéril correspondiente al tratamiento 1 (usando 0,2 µM) sin actividad microbiana; el Tratamiento 3 es un fertilizante vegetal inorgánico rico en nutrientes común usado para un control (solución de Hoagland).

La Figura 18 es una tabla, la Tabla 4.2, que muestra un análisis elemental de nutrientes del suelo que demuestra niveles más altos de macro y micronutrientes cuando se inocula con bioestimulantes (las tasas más altas se indican en negrita). *T = Tratamiento*; el Tratamiento 1 es consorcios microbianos que movilizan P de la presente descripción; el Tratamiento 2 es medio estéril correspondiente al tratamiento 1 (usando 0,2 µM) sin actividad microbiana; el Tratamiento 3 es un fertilizante vegetal inorgánico rico en nutrientes común usado para un control (solución de Hoagland).

La Figura 19 muestra gráficos de varios indicadores del crecimiento de las plantas a lo largo del tiempo; número de rosetas, diámetro de la roseta y altura de la planta para semillas cultivadas con o sin diversas combinaciones de las bacterias descritas.

Breve descripción de las tablas

Tabla 1. Nomenclatura de las bacterias movilizadoras de fósforo (97% de similitud)

Tabla 2.1 Ejemplo de medios definidos usando sustratos férricos (FePO₄) y de aluminio (AlPO₄)

Tabla 2.2 Ejemplo de límites estequiométricos de nutrientes en medio férrico (FePO₄) y de aluminio (AlPO₄)

Tabla 3.1 Diseño factorial completo para someter a ensayo los efectos interactivos entre las cuatro especies diana para la movilización mejorada del ortofosfato (PO₄). Los valores a continuación representan proporciones

relativas (μL) para lograr un volumen final de 50 μL para añadir a 950 μL en cada pocillo de las placas de 96 pocillos profundos. Cada cultivo tenía un recuento de 10^9 UFC en el momento de la mezcla.

Tabla 3.2 Estructura de la comunidad bacteriana, unidades formadoras de colonias (UFCs) y abundancias relativas para nuestros consorcios bacterianos para la movilización de PO_4 del suelo.

Tabla 4.3 Leyendas del gráfico del tratamiento

Descripción detallada

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, etc., utilizados en la presente memoria descriptiva y reivindicaciones asociadas deben entenderse modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la siguiente memoria descriptiva son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretenden obtener mediante las presentes realizaciones. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de la reivindicación, cada parámetro numérico se debe considerar al menos en vista del número de dígitos significativos descritos y aplicando técnicas ordinarias de redondeo.

A continuación se presentan una o más realizaciones ilustrativas que incorporan las características descritas en el presente documento. No todas las características de una implementación física se describen o se muestran necesariamente en esta solicitud en aras de la claridad. Debe entenderse que en el desarrollo de una realización física que incorpore las realizaciones de la presente descripción, se pueden tomar numerosas decisiones específicas en la implementación para lograr los objetivos del desarrollador, como el cumplimiento de normas relacionadas con el sistema, relacionadas con el negocio, relacionadas con el gobierno y otras restricciones, que varían según la implementación y de vez en cuando. Si bien los esfuerzos de un desarrollador pueden requerir mucho tiempo, esos esfuerzos serían, sin embargo, una tarea rutinaria para aquellos con conocimientos ordinarios en la técnica y que se benefician de esta descripción.

A lo largo de esta descripción, varios aspectos de las composiciones y métodos actualmente descritos se pueden presentar en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es simplemente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible de la presente descripción. En consecuencia, se debe considerar que la descripción de un intervalo ha descrito específicamente todos los posibles subintervalos, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un intervalo tal como del 1 al 6 ha descrito específicamente subintervalos tales como del 1 al 3, del 1 al 4, del 1 al 5, del 2 al 4, del 2 al 6, del 3 al 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Si bien las composiciones y los métodos se describen en el presente documento en términos de que "comprenden" varios componentes o etapas, las composiciones y los métodos también pueden "consistir esencialmente en" o "consistir en" los diversos componentes y etapas.

I. Consorcios Movilizadores de Fósforo

Los inóculos bacterianos comerciales generalmente disponibles no mejoran significativamente la disponibilidad del fósforo o el crecimiento de las plantas. Esta ineficacia se debe, en parte, a la inestabilidad de los inóculos bajo diversas condiciones, como alta temperatura y pH elevado. Por el contrario, en el presente documento se describen combinaciones de diferentes cultivos aislados de bacterias que proporcionan un rendimiento mejorado en una amplia gama de suelos (por ejemplo, naturales y sintéticos, así como sistemas hidropónicos y aeropónicos), condiciones y climas. El rendimiento mejorado de las combinaciones descritas se debe, en parte, a una redundancia funcional de los cultivos aislados bacterianos seleccionados y al proceso de selección que identifica y modifica las bacterias, lo que da como resultado una actividad de movilización de fósforo mejorada del consorcio, lo que a su vez da como resultado un crecimiento vegetal mejorado. En muchos casos, las combinaciones descritas proporcionan una actividad de movilización de fósforo sorprendentemente mejorada.

De acuerdo con un aspecto de la descripción, se crea un consorcio (una mezcla de distintas cepas bacterianas) de bacterias para movilizar el fósforo. Los consorcios movilizadores de fósforo comprenden las cepas bacterianas *Comamonas testosteroni*, *Pseudomonas putida*, *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii* y un vehículo. Las diversas cepas de bacterias modificadas en un consorcio se identifican por sus secuencias del gen ribosómico 16S.

La presente descripción contempla consorcios para usar solos o como parte de una composición de inóculo, incluyendo aditivos, vehículos y otros componentes. La presente descripción también puede proporcionar

compuestos de nitrógeno, potasio y fosfato que pueden ser absorbidos directamente por las plantas. Los consorcios presentes modifican los nutrientes del suelo y los componentes orgánicos para que las plantas puedan utilizar de manera más efectiva los compuestos y aditivos que ya pueden estar presentes en el suelo circundante (es decir, moviliza compuestos como el fósforo). Los microorganismos beneficiosos vivos (así como los compuestos, moléculas y enzimas producidos por los microorganismos) dentro de las composiciones actualmente descritas, pueden descomponer la materia orgánica que está presente en el suelo, que luego se convierte en formas que son absorbibles por las plantas.

Las composiciones de la presente descripción pueden usarse junto con compuestos de nitrógeno, potasio y fósforo para tratar las plantas. En algunas realizaciones, los compuestos de nitrógeno, potasio y fósforo se añaden antes, durante o después de la aplicación de las composiciones descritas. En algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria pueden ayudar a permitir que las plantas absorban más eficazmente los compuestos de nitrógeno, potasio y fósforo aplicados. Como resultado, se requieren menos fertilizantes químicos y una menor frecuencia de aplicación. En otra realización, se pueden añadir pequeñas cantidades de compuestos de nitrógeno, potasio y fósforo a las composiciones de la descripción, lo que puede ayudar a la eficacia del consorcio, es decir, los compuestos de nitrógeno, potasio y fósforo se añaden durante la aplicación de las composiciones descritas.

Las composiciones descritas pueden usarse para ayudar en el crecimiento de una planta o semilla. En muchas realizaciones, el crecimiento de una planta se puede controlar con una variedad de métodos. En algunas realizaciones, el crecimiento de una planta puede controlarse midiendo la altura, el peso, el rendimiento (número o peso) de flores o frutos de la planta, así como atributos químicos tales como el contenido en azúcar, el contenido en nutrientes y la proteína obtenida de la planta.

El uso de las composiciones descritas puede ayudar a aumentar el crecimiento de una planta en relación con las plantas cultivadas sin el uso de las composiciones descritas. En muchos casos, el uso de las composiciones descritas puede mejorar el crecimiento promedio en más de aproximadamente un 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20% o 30%, y menos de aproximadamente un 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3% o 2%. La mejora descrita del crecimiento puede medirse en varios estadios a lo largo del crecimiento de la planta, por ejemplo, desde la germinación hasta la recolección de la planta, su semilla, flor o fruto.

II. Composiciones

Las composiciones útiles en esta descripción comprenden las cepas bacterianas *Comamonas testosteroni*, *Pseudomonas putida*, *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii* y un vehículo. En otro aspecto, las composiciones descritas incluyen los microorganismos bacterianos identificables por homología con al menos 95 o más por ciento de identidad con las secuencias ribosómicas 16S de SEQ ID NOs: 1-4. En muchas realizaciones, la cantidad de homología de la secuencia 16S es menor de aproximadamente 1,2 kb, 1,1 kb, 1,0 kb, 0,9 kb, 8 kb, 0,7 kb, 0,6 kb, 0,5 kb, 0,4 kb, 0,3 kb, 0,2 kb o 0,1 kb y mayor de aproximadamente 50 nt, 0,1 kb, 2 kb, 0,3 kb, 0,4 kb, 0,5 kb, 0,6 kb, 0,7 kb, 0,8 kb, 0,9 kb, 1,0 kb o 1,1 kb. En muchas realizaciones, la cantidad de homología de la secuencia ribosómica 16S está entre aproximadamente 150 nt y 500 nt, por ejemplo, aproximadamente 250 nt.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para una comparación óptima (p. ej., se pueden introducir espacios en la secuencia de una primera secuencia de ácido nucleico para una alineación óptima con una segunda secuencia de ácido nucleico). A continuación, se comparan los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = nº de posiciones idénticas / nº total de posiciones X 100).

Tabla 1. Nomenclatura de las bacterias movilizadoras de fósforo (97% de similitud)

Especie	Secuencia 16S (OTU Representativa en 97% de similitud)
1) Comamonas testosteroni; SEQ ID NO:1	CATCGGAACGTGCCTAGTAGTGGGGGATAACTACTCNNNNNAGTA GCTAATACCGCATGAGATCTACGGATGAAAGCAGGGGACCTTCGG GCCTTGTGCTACTAGAGCGGCTGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTG GGGTAAAGGCTTACCAAGCCTGCGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGG ACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG GGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGAT CCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTCGGGTTGTAACTG CTTTTGTACGGAACGAAAAGCCTGGGGGCTAATATCCCCGGGTCAT GACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGC CGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCG TAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTTGTNAAGACAGTGGTGAAATCCCC GGGCTCAACCTGGGGAAGTCCATTGTGACTGCAAGGCTAGAGTG CGGCAGAGGGGGATGGAATTCCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTA GATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAATCCCCTGGGCCT GCACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG ATACCCTGGGTAGTCCACGNCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTTG GGTCTTAACTGACTCAGTAACGAAGCTAACGCGTGAAGTTGACCG CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG GGACCCGCAACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAATTGATGCAACG CGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGGAACCTACCAGAGAT GGTTTGGTGCTCGAAAGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCT GTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA GCGCAACCCTTGCCATTAGTTGCTACATTCAGTTGAGCACTCTAAT GGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA GTCCTCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGG CTGGTACAAAGGGTTGCCAACC CGAGGGGGAGCTAATCCCAT AAGCCAGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGA AGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGNCACGGTGAATA CGTTCCCGGGTCTTGTACACACC

2) <i>Pseudomonas putida</i>; SEQ ID NO:2	TGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTNNNNNAAGGA ACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTC GGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGG TGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGA GGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTAC GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGA TCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGC ACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTT GACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGC CGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCG TAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCG GGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTACG GTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT ATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATAC TGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATC CTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTTGACCGCCTG GGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAGTCAAATGAATTGACGGGGGC CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA GAAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGG ATTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTGC TCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGC AACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGG AGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAG TCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGT CGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAA AACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAA GTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAANGNNGCGGTGAATAC GTTCCCGGGCCTTGATACACACCGCC
3) <i>Citrobacter freundii</i>; SEQ ID NO:3	AGTAATGTCTGGGAAAGTGCCTGATGGAGGGGGGATNNNTNCTGGA AACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAGAGGGGGGA CCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTA GTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTC TGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACT CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAG CCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT AAAGTACTTTTACGCGAGGAGGAAGGNNTTGTGGTTAATAACCGCA GTGATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCC AGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAC TGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAA ATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCGAAAGTGGCAGGCTA GAGTCTTGATAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATG CGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTG GACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCACTTGG AGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGT CGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAGTCAAATGAAT TGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGGAGCATGTGGTTTAATTCG ATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAANTTN GCAGAGATGCTNNNNNTGCCTTCGGGAAGTCTGAGACAGGTGCT GCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCG GGAAGTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGG GATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACG TGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAG

	CGGACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTC GACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAANNNC NCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC
4) Enterobacter cloacae; SEQ ID NO:4	CTNATACCNCNTAANGTCNCAAGACCNAANAGGGGGNNNTNNGG CCTCTTGNCNTCNNATGTGNCCNNATGGGATTANCTNGTANGTGG GGTAACNNNTCNCNNNNNCGACNATNCCTNNNTGGNNTNAGAGGA TGACCNNNCNCNCTNNNNCTGAGACACGGNCCANACNCCNNCNCN GANGNNNNNTGGGGAATATTGCNNCAATGGGNGCNAGCCTGAT GCANNATGCCNCGTGTATGAANAANGNCTTCNGGTTGTNAAGTA CTTTCNNCNGGGGAGGAANGNGTTGAGGNTNNTNNNCTCANCAATT GACGNTNCCNCANAANAANCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGC CGCGGTAATACNGAGGGTGCAAGCGTTNATCGGAATTACTGGGCG TAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCNGATGTGAAATCCCCG GGCTCAACCTGGGAACTGCATTNAACTGGCAGGCTAGAGTCTT GTNNAGGGGGGNAGAATTCCNGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA GATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAG ACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCACTTGGAGGTTGTG CCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCC TGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGG GCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGATGCAACGCG AAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTNNCAGAGATNN NTNGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCG TCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC AACCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTNGGCCGGGAACTCAAAGG AGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGT CATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCG CATAAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAA GTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAG TCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAAATGCTACGGTGAATACGT TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCNGNCACNCCATGGGAGTGGGT TGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTANCCTTCGGGAGGGNNCT

La determinación del porcentaje de homología entre dos secuencias puede realizarse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido, no limitativo, de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Ese algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. Las búsquedas de nucleótidos en BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos similares u homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la presente descripción. Para obtener alineaciones con espacios con fines comparativos, Gapped BLAST se puede utilizar como se describe en Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Al utilizar los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros predeterminados de los respectivos programas (p. ej., XBLAST y NBLAST). Esos algoritmos pueden usarse para alinear ADN con ARN y, en algunos casos, pueden usarse para alinear proteínas con secuencias de nucleótidos traducidas.

Se contempla que los microorganismos puedan cocultivarse para producir la composición descrita. En otras realizaciones, la composición descrita puede formarse combinando cultivos individuales de las cepas. Los microorganismos pueden propagarse mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los microorganismos pueden propagarse en un medio líquido en condiciones anaeróbicas o aeróbicas. Los medios líquidos adecuados utilizados para el cultivo de microorganismos incluyen los conocidos en la técnica, como caldo nutritivo y agar de soja triptica (TSA), etc. En una realización más preferida, la composición incluye la lista completa de las 4 cepas enumeradas en la Tabla 1.

En un aspecto, la composición incluye un número total de microorganismos desde aproximadamente uno a aproximadamente 10 mil millones de unidades formadoras de colonias (UFCs) por mililitro. Preferiblemente, la composición incluye un número total de microorganismos desde aproximadamente 100.000 a aproximadamente 800.000 UFC por mililitro. Más preferiblemente, la composición incluye un número total de microorganismos desde aproximadamente 250.000 a aproximadamente 600.000 UFC por mililitro. Lo más

preferiblemente, la composición incluye un número total de microorganismos de aproximadamente 300.000 UFC por mililitro.

5 En un aspecto, la composición incluye microorganismos vivos y no vivos. En otro aspecto, la composición incluye microorganismos vivos o no vivos. Las composiciones que contienen microorganismos no vivos pueden contener extractos de microorganismos, por ejemplo, extractos de los microorganismos de la Tabla 1 u otras bacterias. Los extractos de microorganismos incluyen, a modo de ejemplo, enzimas, metabolitos, proteínas y otras sustancias que son producidas por los microorganismos y que son capaces de provocar un efecto en un entorno. En algunas realizaciones, los extractos pueden ser productos líquidos de la fermentación de uno o 10 más microorganismos, como los de la Tabla 1. En algunas realizaciones, los extractos pueden purificarse usando protocolos de purificación bioquímica estandarizados.

15 En un aspecto, la composición se fermenta para producir un producto de fermentación. La composición se puede fermentar durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 días o más. Preferiblemente, la composición se fermenta durante al menos aproximadamente un día hasta aproximadamente 5 días. Más preferiblemente, la composición se fermenta durante al menos 3 días.

20 Las composiciones también pueden incluir aditivos. Los aditivos adecuados incluyen sustancias conocidas en la técnica que pueden favorecer el crecimiento, la producción de metabolitos específicos por el microorganismo, alterar el pH, enriquecer los metabolitos diana, mejorar los efectos insecticidas y combinaciones de los mismos. Ejemplos de aditivos incluyen fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, fuentes de fósforo, sales inorgánicas, ácidos orgánicos, medios de crecimiento, vitaminas, minerales, ácido acético, aminoácidos y similares.

25 Ejemplos de fuentes de carbono adecuadas incluyen, sin limitación, almidón, peptona, extracto de levadura, aminoácidos, azúcares como sacarosa, glucosa, arabinosa, manosa, glucosamina, maltosa, caña de azúcar, extractos de alfalfa, melaza, ron y similares; sales de ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido fumárico, ácido adípico, ácido propiónico, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido málico, ácido pirúvico, ácido malónico y similares; alcoholes tales como etanol, glicerol y similares; aceite o grasa tal como aceite de soja, aceite de salvado de arroz, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de sésamo. La cantidad de fuente de carbono añadida varía según el tipo de fuente de carbono y normalmente está entre 1 y 100 gramos por litro de medio. La fracción en peso de la fuente de carbono en la composición puede ser de aproximadamente 98% o menos, aproximadamente 95% o menos, aproximadamente 90% o menos, aproximadamente 85% o menos, 30 aproximadamente 80% o menos, aproximadamente 75% o menos, aproximadamente 70% o menos, aproximadamente 65% o menos, aproximadamente 60% o menos, aproximadamente 55% o menos, aproximadamente 50% o menos, aproximadamente 45% o menos, aproximadamente 40% o menos, aproximadamente 35% o menos, aproximadamente 30% o menos, aproximadamente 25% o menos, aproximadamente 20% o menos, aproximadamente 15% o menos, aproximadamente 10% o menos, 35 aproximadamente 5% o menos, aproximadamente 2% o aproximadamente 1% o menos del peso total de la composición. Preferiblemente, la alfalfa está contenida en el medio como fuente principal de carbono, con una concentración de aproximadamente 1 a 20% (p/v). Más preferiblemente, la alfalfa tiene una concentración de aproximadamente 5 a 12% (p/v).

40 Ejemplos de fuentes de nitrógeno adecuadas incluyen, sin limitación, aminoácidos, extracto de levadura, extracto de alfalfa, triptona, extracto de carne, peptona, nitrato de potasio, nitrato de amonio, cloruro de amonio, sulfato de amonio, fosfato de amonio, amoníaco o combinaciones de los mismos. La cantidad de fuente de nitrógeno varía según la fuente de nitrógeno, normalmente entre 0,1 y 30 gramos por litro de medio. La fracción en peso de la fuente de nitrógeno en la composición puede ser de aproximadamente 98% o menos, aproximadamente 95% o menos, aproximadamente 90% o menos, aproximadamente 85% o menos, 45 aproximadamente 80% o menos, aproximadamente 75% o menos, aproximadamente 70% o menos, aproximadamente 65% o menos, aproximadamente 60% o menos, aproximadamente 55% o menos, aproximadamente 50% o menos, aproximadamente 45% o menos, aproximadamente 40% o menos, aproximadamente 35% o menos, aproximadamente 30% o menos, aproximadamente 25% o menos, 50 aproximadamente 20% o menos, aproximadamente 15% o menos, aproximadamente 10% o menos, aproximadamente 5% o menos, aproximadamente 2% o aproximadamente 1% o menos del peso total de la composición.

55 Ejemplos de sales inorgánicas adecuadas incluyen, sin limitación, dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio, hidrogenofosfato de disodio, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, sulfato férrico, sulfato ferroso, cloruro férrico, cloruro ferroso, sulfato manganoso, cloruro manganoso, sulfato de zinc, cloruro de zinc, sulfato cúprico, cloruro de calcio, cloruro de sodio, carbonato de calcio, carbonato de sodio y combinaciones de los mismos. La fracción en peso de la sal inorgánica en la composición puede ser de aproximadamente 98% o menos, aproximadamente 95% o menos, aproximadamente 90% o menos, 60 aproximadamente 85% o menos, aproximadamente 80% o menos, aproximadamente 75% o menos, aproximadamente 70% o menos, aproximadamente 65% o menos, aproximadamente 60% o menos,

aproximadamente 55% o menos, aproximadamente 50% o menos, aproximadamente 45% o menos, aproximadamente 40% o menos, aproximadamente 35% o menos, aproximadamente 30% o menos, aproximadamente 25% o menos, aproximadamente 20% o menos, aproximadamente 15% o menos, aproximadamente 10% o menos, aproximadamente 5% o menos, aproximadamente 2% o aproximadamente 1% o menos del peso total de la composición.

En otra realización, las composiciones de la presente descripción pueden comprender además ácido acético o ácido carboxílico. Los ácidos acéticos adecuados incluyen cualquiera conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butanoico, ácido isobutírico, ácido 3-metilbutanoico, acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de butilo, acetato de isobutilo y acetato de 2-metilbutilo. En una realización, el ácido acético se incluye usando vinagre. La fracción en peso del ácido acético en la composición puede ser de aproximadamente 98% o menos, aproximadamente 95% o menos, aproximadamente 90% o menos, aproximadamente 85% o menos, aproximadamente 80% o menos, aproximadamente 75% o menos, aproximadamente 70% o menos, aproximadamente 65% o menos, aproximadamente 60% o menos, aproximadamente 55% o menos, aproximadamente 50% o menos, aproximadamente 45% o menos, aproximadamente 40% o menos, aproximadamente 35% o menos, aproximadamente 30% o menos, aproximadamente 25% o menos, aproximadamente 20% o menos, aproximadamente 15% o menos, aproximadamente 10% o menos, aproximadamente 5% o menos, aproximadamente 2% o aproximadamente 1% o menos del peso total de la composición.

Las composiciones de la presente descripción pueden estar en forma líquida o seca. La composición puede comprender una suspensión acuosa de componentes. Esa suspensión acuosa se puede proporcionar como una solución madre concentrada que se diluye antes de la aplicación o como una solución diluida lista para usar. Además, la composición puede ser materia pulverizada, gránulos, polvo, perlas o concentrado coloidal. Esas formas secas se pueden formular para disolverlas inmediatamente después de la humectación o disolverlas en una forma de liberación controlada, de liberación sostenida o de otra manera dependiente del tiempo. Además, la composición puede estar en forma seca que no depende de una humectación o disolución para ser eficaz. Las composiciones se pueden proporcionar adicionalmente en una formulación capaz de poder pulverizarse. El spray puede ser un líquido o un aerosol.

En algunas realizaciones, la composición de la presente descripción puede comprender al menos un excipiente opcional. Ejemplos no limitantes de excipientes adecuados incluyen antioxidantes, aditivos, diluyentes, aglutinantes, cargas, agentes tamponadores, sales minerales, agentes modificadores del pH, agentes desintegrantes, agentes dispersantes, agentes aromatizantes, agentes nutritivos, agentes oncóticos y osmóticos, estabilizantes, conservantes, potenciadores de la palatabilidad y colorantes. La cantidad y los tipos de excipientes utilizados para formar la combinación pueden seleccionarse de acuerdo con principios científicos conocidos.

En una realización, el excipiente puede incluir al menos un diluyente. Ejemplos no limitativos de diluyentes adecuados incluyen celulosa microcristalina (MCC), derivados de celulosa, polvo de celulosa, ésteres de celulosa (es decir, ésteres mixtos de acetato y butirato), etilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, almidón de maíz, almidón de maíz fosfatado, almidón de maíz pregelatinizado, almidón de arroz, almidón de patata, almidón de tapioca, almidón-lactosa, almidón-carbonato de calcio, glicolato de almidón de sodio, glucosa, fructosa, lactosa, lactosa monohidrato, sacarosa, xilosa, lactitol, manitol, malitol, sorbitol, xilitol, maltodextrina y trehalosa.

En otra realización, el excipiente puede comprender un aglutinante. Los aglutinantes adecuados incluyen, entre otros, almidones, almidones pregelatinizados, gelatina, polivinilpirrolidona, celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa, poliacrilamidas, poliviniloxazolidona, polivinilalcoholes, alcoholes de ácidos grasos C12-C18, polietilenglicol, polioles, sacáridos, oligosacáridos, polipéptidos, oligopéptidos y combinaciones de los mismos.

En otra realización, el excipiente puede incluir una carga. Las cargas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, carbohidratos, compuestos inorgánicos y polivinilpirrolidona. A modo de ejemplo no limitativo, la carga puede ser sulfato de calcio, tanto dibásico como tribásico, almidón, carbonato de calcio, carbonato de magnesio, celulosa microcristalina, fosfato de calcio dibásico, carbonato de magnesio, óxido de magnesio, silicato de calcio, talco, almidones modificados, lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol.

En aún otra realización, el excipiente puede comprender un agente tamponador. Ejemplos representativos de agentes tamponadores adecuados incluyen, entre otros, MOPS, HEPES, TAPS, bicina, tricina, TES, PIPES, MES, tampones Tris o sales salinas tamponadas (p. ej., solución salina tamponada con Tris o solución salina tamponada con fosfato).

En otra realización, el excipiente puede incluir un agente desintegrante. Los desintegrantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, almidones como almidón de maíz, almidón de patata, sus almidones

pregelatinizados y modificados, edulcorantes, arcillas, como bentonita, celulosa microcristalina, alginatos, glicolato de almidón sódico, gomas como agar, guar, algarrobo, karaya, pectina y tragacanto.

5 En una realización adicional, el excipiente puede incluir un potenciador de la dispersión. Los dispersantes adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, almidón, ácido algínico, polivinilpirrolidonas, goma guar, caolín, bentonita, celulosa de madera purificada, glicolato de almidón sódico, silicato isoamorfo y celulosa microcristalina.

10 En otra realización, el excipiente puede incluir un lubricante. Ejemplos no limitativos de lubricantes adecuados incluyen minerales tales como talco o sílice; y grasas tales como estearina vegetal, estearato de magnesio o ácido esteárico.

15 La fracción en peso del (de los) excipiente(s) en la combinación puede ser de aproximadamente 98% o menos, aproximadamente 95% o menos, aproximadamente 90% o menos, aproximadamente 85% o menos, aproximadamente 80% o menos, aproximadamente 75% o menos, aproximadamente 70% o menos, aproximadamente 65% o menos, aproximadamente 60% o menos, aproximadamente 55% o menos, aproximadamente 50% o menos, aproximadamente 45% o menos, aproximadamente 40% o menos, aproximadamente 35% o menos, aproximadamente 30% o menos, aproximadamente 25% o menos, aproximadamente 20% o menos, aproximadamente 15% o menos, aproximadamente 10% o menos, aproximadamente 5% o menos, aproximadamente 2% o aproximadamente 1% o menos del peso total del combinación.

25 Las composiciones de la presente descripción son estables en diversas condiciones con respecto a las concentraciones de unidades formadoras de colonias bacterianas (ufc/ml) (Figura 1) y los niveles de pH a lo largo del tiempo (Figura 2) en forma líquida o seca. Preferiblemente, las composiciones de la presente descripción son estables a temperatura ambiente.

30 En otro aspecto de la presente descripción, los consorcios pueden mantenerse a una temperatura reducida para el almacenamiento y transporte sin comprometer significativamente la viabilidad de los microorganismos vivos. Los consorcios o composiciones que los comprenden pueden estar refrigerados, congelados o liofilizados. Las composiciones se pueden refrigerar entre 0°C y 6,6°C.

35 En otro aspecto de la presente descripción, el consorcio o las composiciones que lo componen pueden almacenarse y transportarse en estado congelado. Los microorganismos beneficiosos vivos pueden revitalizarse rápidamente una vez que las composiciones se descongelan y se llevan a temperatura ambiente, preferiblemente con aireación y/o agitación.

40 En otro aspecto más de la presente descripción, los consorcios pueden liofilizarse. Primero se congelan los consorcios. A continuación, se elimina el agua en condiciones de vacío. Este procedimiento reduce aún más el peso de la composición para el almacenamiento y transporte. Los consorcios de composiciones que comprenden los mismos pueden reconstituirse y revitalizarse antes de la aplicación.

45 En otro aspecto de la presente descripción, los consorcios concentrados o las composiciones que los comprenden pueden diluirse con agua antes de la aplicación sobre semillas, plantas, suelo o similares. Las composiciones diluidas se pueden almacenar durante un período de tiempo prolongado, por ejemplo, hasta 30 días, sin perder la viabilidad. Para mantener el microorganismo beneficioso vivo en un estado sustancialmente aeróbico, el oxígeno disuelto en las composiciones diluidas de la presente descripción se mantiene preferentemente en un nivel óptimo. Es preferible suministrar cantidades óptimas de oxígeno a la composición diluida mediante aireación lenta.

50 III. Métodos

55 Las composiciones descritas en el presente documento son útiles en la agricultura y como sustitutos de productos químicos/fertilizantes para aumentar el fósforo disponible para las plantas. Las composiciones descritas en el presente documento son útiles en métodos agrícolas. Los métodos de la presente descripción incluyen el enriquecimiento del suelo y el enriquecimiento de las plantas.

60 Los métodos de tratamiento del suelo incluyen aplicar la composición en el suelo que se va a enriquecer. La composición puede estar en forma líquida o seca y se aplica al suelo mediante métodos conocidos en la técnica. Los métodos ejemplares incluyen rociado, goteo, dispersión, aplicación de polvo fino sobre el suelo objetivo. Además, la composición se puede aplicar sobre una fuente de agua que alimenta el suelo objetivo.

65 En otro aspecto, la composición puede usarse para el enriquecimiento de plantas. Los métodos de enriquecimiento de plantas incluyen la aplicación de las composiciones de la presente descripción en el suelo o la fuente de agua de la planta como se describe en este documento. En otro aspecto, las semillas se pueden poner a remojo en una composición de la presente descripción antes de la siembra. Se reconocerá que puede

ser beneficioso combinar cualquiera de los métodos descritos en el presente documento para el enriquecimiento de suelos y plantas.

La composición de microorganismos puede proporcionarse en forma seca o líquida. La composición de microorganismos se puede proporcionar en una variedad de cantidades con respecto al peso del suelo o la planta. En algunos aspectos, la composición de microorganismos se proporciona en una cantidad que oscila entre aproximadamente 0,5 y 50% en peso del peso total del suelo o la planta. En otro aspecto, la composición de microorganismos se proporciona en una cantidad que oscila entre aproximadamente 1 y aproximadamente 3% en peso del peso total del suelo o la planta

El microorganismo puede proporcionarse en forma seca, en forma líquida o mediante pulverización. Los métodos de tratamiento de productos de desecho incluyen, sin limitación, pulverización, espolvoreado, aspersión, inoculación líquida, nebulización, fumigación, aerosolización y otros métodos conocidos en la técnica.

Para facilitar una mejor comprensión de las realizaciones de la presente descripción, se proporcionan los siguientes ejemplos. Los siguientes ejemplos no se deben interpretar de ningún modo para limitar o definir el alcance de la presente descripción.

Ejemplos

Ejemplo 1

La solicitante extrajo las comunidades microbianas de suelo natural a partir de suelos de todos los EE. UU. a partir de sitios agrícolas y pastizales naturales y sitios boscosos representativos de una amplia gama de climas, características del suelo y tipos de vegetación, incluidos los principales cultivos de producción (soja, trigo y maíz). Los microbios se propagaron en un medio definido que se asemejaba a diferentes condiciones limitantes del P. El medio proporciona un entorno único, que permite a la solicitante controlar la estequiometría de los nutrientes para adaptar el crecimiento de los microbios del suelo a muchas condiciones ambientales diferentes. Por ejemplo, para el cultivo de microbios en suelos ácidos típicos, la estequiometría de los nutrientes se controlaría mediante el uso de P insoluble que se encuentra en los sustratos férricos (FePO_4) y de aluminio (AlPO_4), Tabla 2.1; 2.2.

Tabla 2.1 Ejemplo de medios definidos usando sustratos férricos (FePO_4) y de aluminio (AlPO_4)

Nombre químico	Nutriente	Concentración deseada (M/L de medio)	Fórmula química
Tampón MES	tampón	0	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$
Tampón MOPS	tampón	0,05	$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$
TAPS	tampón	0	$\text{C}_7\text{H}_{17}\text{NO}_6\text{S}$
D-glucosa	carbono y nitrógeno N	0,006660746	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
Glicina	carbono y nitrógeno	0,000532836	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$
L-Histidina	carbono y nitrógeno	0,000257815	$\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$
L-Metionina	carbono y nitrógeno	0,000134039	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$
L-Triptófano	carbono y nitrógeno	9,79312E-05	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$
Cloruro amónico	nitrógeno	0,14955787	NH_4Cl
Fosfato monosódico	fósforo	0	NaH_2PO_4
Dihidrato de fosfato de hierro (III) (férrico)	fósforo	0,001605566	$\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Fosfato de aluminio	fósforo	0,002049972	AlPO_4
Fosfato de aluminio monobásico	fósforo	0	$\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$
Fosfato dicálcico	fósforo	0	CaHPO_4
Hidroxilapatita	fósforo	0	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$
Fosfato monocálcico	fósforo	0	$\text{CaH}_4\text{P}_2\text{O}_8$
Fosfato tricálcico	fósforo	0	$\text{Ca}_3\text{O}_8\text{P}_2$

Nombre químico	Nutriente	Concentración deseada (M/L de medio)	Fórmula química
Solución de ácido fítico	fósforo	0	C ₆ H ₁₈ O ₂₄ P ₆
Hidrato de sal de sodio de ácido fítico	fósforo	0	C ₆ H ₁₈ O ₂₄ P ₆
Hexahidrato de sulfato de amonio y hierro (II)	macronutriente	0	(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ · 6H ₂ O
Cloruro de calcio	macronutriente	0,004081244	CaCl ₂ ·2H ₂ O
Sulfato de magnesio	macronutriente	0,006492	MgSO ₄ ·7H ₂ O
Sulfato de potasio	macronutriente	0,006886	K ₂ SO ₄
Cloruro de sodio	macronutriente	0,020534	NaCl
Ácido bórico	micronutriente	9,70403E-07	H ₃ BO ₃
Sulfato de cobalto (II)	micronutriente	1,35183E-06	CoSO ₄ ·7H ₂ O
Sulfato de cobre (II)	micronutriente	8,00961E-08	CuSO ₄ ·5H ₂ O
Sulfato de manganeso (II)	micronutriente	4,73317E-06	MnSO ₄ ·2H ₂ O
Cloruro de níquel (II)	micronutriente	2,10358E-07	NiCl ₂ ·6H ₂ O
Ácido nitrilotriacético	micronutriente	5,23177E-06	C ₆ H ₉ NO ₆
Alumbre de potasio	micronutriente	8,43188E-08	KA1(SO ₄) ₂ · 12H ₂ O
Molibdato de sodio	micronutriente	2,06654E-07	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O
Selenito de sodio	micronutriente	3,46941E-06	Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O
Sulfato de zinc	micronutriente	6,9558E-08	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
Ácido 4-aminobenzoico	vitaminas	1,45836E-06	C ₇ H ₇ NO ₂
Biotina	vitaminas	2,4559E-07	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S
d-Ca-pantotenato	vitaminas	9,12284E-07	C ₉ H ₁₇ NO ₅
Ácido fólico	vitaminas	4,53104E-07	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆
Ácido L-ascórbico	vitaminas	1,13559E-06	C ₆ H ₈ O ₆
Ácido lipoico	vitaminas	9,69321E-07	C ₈ H ₁₄ O ₂ S ₂
Ácido nicotínico	vitaminas	1,62457E-06	C ₆ NH ₅ O ₂
Clorhidrato de piridoxina	vitaminas	1,18217E-06	C ₈ H ₁₁ NO ₃
Riboflavina	vitaminas	5,31406E-07	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆
Clorhidrato de tiamina	vitaminas	6,64872E-07	C ₁₂ H ₁₇ C ₁ N ₄ OS
Vitamina B12 (es decir, cianocobalamina)	vitaminas	1,4756E-08	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁ 4P

Tabla 2.2 Ejemplo de límites estequiométricos de nutrientes en medios férricos (FePO₄) y de aluminio (AlPO₄)

C: Contenido en nutrientes en los medios	
C/N	1,960295009
C/P	107,9008086
C/S	6,209541778
C/K	28,640332
C/Mg	60,75740407
C/Ca	96,64628501
C/Fe	245,6685534

- 5 Se cuantificó la tasa de crecimiento microbiano a la que las comunidades microbianas de esos suelos producían ortofosfato soluble y los resultados se muestran en la Figura 3. Estas comunidades microbianas

diferían ampliamente en su tasa de mineralización de ortofosfato y acumulación de P en la biomasa microbiana, lo que analizamos usando un protocolo del sistema de detección de fosfato (Taylor et al. 2013). Empleando ese enfoque, la solicitante podía seleccionar subsecuentemente consorcios microbianos raros que mostraban tasas de cinco a diez veces mayores que las tasas promedio de solubilización de P o las características de mineralización de PO_4 orgánico, incluidos aquellos con las tasas más rápidas y/o mayores magnitudes de solubilización y mineralización de P (Figura 3).

A continuación, para mejorar aún más la solubilización y mineralización de P mostradas por estos consorcios microbianos, la plataforma de caracterización de alto rendimiento (para evaluar las características microbianas) se combinó con el uso de una selección artificial dirigida en la que las bacterias se modificaron a través de un proceso de reproducción que daba como resultado una mayor actividad de movilización del fósforo. La solubilización del ortofosfato en la comunidad microbiana dirigida y la selección de una mineralización se lograron inoculando primero consorcios superiores que mostraban una movilización mejorada (identificados durante la caracterización y detección de eficacias de P de los consorcios microbianos) en placas de 96 pocillos profundos que contenían nuestros medios de selección. Debido a que se añadió una comunidad "semilla" relativamente pequeña a cada uno de los 96 duplicados, se lograron ligeros cambios en la composición de la comunidad dentro de cada duplicado simplemente a través de la variabilidad natural y los factores ecológicos aleatorios en juego durante la combinación de la comunidad (McGrady-Steed et al., 1997; Van Der Gast et al., 2008; Nemergut et al., 2013). En cada generación posterior se identificaron consorcios deseables en función de su capacidad para solubilizar o mineralizar el ortofosfato (Figura 4). Además, durante la selección dirigida, la mutación microbiana y la transferencia horizontal de genes se aceleraron mediante una exposición a rayos UV o a agentes mutagénicos. El consorcio con la mayor tasa de solubilización de P se seleccionó como la comunidad de semillas que se iba a utilizar para inocular la siguiente generación. Los consorcios resultantes consisten en una combinación novedosa de cepas bacterianas que difieren sustancialmente de las comunidades que se encuentran en los suelos naturales y muestran una movilización de P sorprendentemente mejorada.

Las bacterias para uso con los consorcios actualmente descritos se describen en la Tabla 1 (Consortios movilizadores de fósforo). Las cepas son identificables por su secuencia representativa del ribosoma 16S para sus unidades taxonómicas operativas descritas en las tablas. De acuerdo con la presente descripción, se pueden usar dos o más de esas cepas identificadas para aumentar el fósforo en el suelo disponible para las plantas. En una realización preferida, las cepas son aquellas que incluyen una OTU representativa con una similitud del 97% al menos sobre aproximadamente 0,2 kb de las secuencias 16S (Tabla 1). Una vez optimizados, usamos medios que simulaban las condiciones de P insoluble que se encuentran típicamente en suelos ácidos usando sustratos férricos (FePO_4) y de aluminio (AlPO_4) Tabla 2.1.

Hemos podido estabilizar con éxito el crecimiento bacteriano después del período de fermentación inicial con varias formulaciones de medios diferentes, como los medios de alfalfa. Para esos experimentos, se crearon medios de alfalfa utilizando un protocolo de extracción con calor y agua. En resumen, se combinaron aproximadamente 80 g de sustrato de alfalfa (contenido en bolsas de ebullición de nailon de malla fina) con aproximadamente 3,78 litros de agua y se hirvieron ($\sim 100^\circ\text{C}$) en un hervidor de acero inoxidable durante aproximadamente 60 minutos. El calor y el agua ayudan a extraer compuestos de carbono y nutrientes de la alfalfa que pueden contribuir al crecimiento de los consorcios bacterianos descritos. El método de extracción con calor y agua también sirve para esterilizar al menos parcialmente el extracto de alfalfa. Después de hervir durante 60 minutos, la mezcla de agua y alfalfa permanece cubierta en el hervidor, se retira del elemento calefactor y se deja enfriar lentamente (hasta $\sim 60^\circ\text{C}$) durante las siguientes 12 horas. Después del período de enfriamiento, el extracto líquido de alfalfa se transfiere asépticamente a botellas de vidrio estériles y se almacena a 4°C hasta su uso.

Otros métodos han podido estabilizar el crecimiento bacteriano después del período de fermentación inicial. En muchos de esos métodos, se mezclaron varias formulaciones estabilizadoras, se esterilizaron en autoclave, se enfriaron y luego se incorporaron al inóculo bacteriano con diferentes concentraciones y volúmenes que oscilaban entre el 0,001% y el 50% del volumen total. Los aditivos de la formulación pueden incluir: sorbitol, glucosa, lactosa, trehalosa, glicerol, PEG, glicina y/o prolina.

Ejemplo 2 - Evaluación de las mejoras en los consorcios bacterianos para movilizar el fósforo

Realizamos un ensayo *in vitro* para cuantificar las mejoras en la capacidad de nuestros consorcios bacterianos para movilizar ortofosfato (PO_4), en comparación con otros cultivos aislados bacterianos (es decir, en cultivo puro). Sorprendentemente, los consorcios descritos mostraban una mayor movilización por encima de las cantidades esperadas. De hecho, se observó un efecto sinérgico cuando se incluían dos o más cepas bacterianas individuales en los consorcios. Esto era sorprendente ya que normalmente se esperaría que las cepas bacterianas diferentes se inhibieran entre sí.

Para comparar los cultivos aislados bacterianos (enumerados en la Tabla 1), se prepararon varias combinaciones de cultivos aislados que trabajaban conjuntamente como un consorcio. Las bacterias se

cultivaron a partir de muestras de reserva almacenadas congeladas de varios cultivos aislados de especies bacterianas (previamente cultivadas en nuestros medios férricos y de aluminio (enumerados anteriormente) y luego se almacenaron congeladas como submuestras en tubos de microcentrífuga estériles de 2 mL a -80°C). Se cultivaron muestras de cultivos aislados bacterianos para este experimento mediante la inoculación de un volumen total de 1 mL de bacterias concentradas en 19 mL de medio de alfalfa estéril (preparado como se ha descrito anteriormente). Se cultivaron 20 mL de cada cultivo aislado bacteriano (Tabla 1) mediante la inoculación de 1 mL de cultivo de reserva bacteriano congelado (para cada especie de forma independiente) en 19 mL de medio de alfalfa. Cada cultivo de especies bacterianas aisladas se cultivó en medio de alfalfa durante 3 días (a 25°C) en una incubadora hasta que cada uno de los cultivos aislados tenía una concentración de aproximadamente 10^9 UFC/mL.

Posteriormente llevamos a cabo un diseño factorial completo usando cuatro duplicados para cada grupo de factores (Tabla 3.1) para someter a ensayo las habilidades interactivas de las especies bacterianas para movilizar PO_4 utilizando un formato de placa de 96 pocillos profundos. Para los cultivos aislados bacterianos, inoculamos 50 μ L de cultivo maduro total en 950 μ L de medio de alfalfa. Sin embargo, para combinar cultivos aislados en diferentes conjuntos de consorcios bacterianos, usamos la misma proporción de inóculo total (50 μ L de cultivo maduro total en 950 μ L de medio de alfalfa), pero recombina los múltiples cultivos aislados bacterianos en un consorcio basándose en las proporciones bacterianas relativas tal y como se observaban en el análisis de la comunidad molecular de alto rendimiento (Tabla 3.1; Tabla 3.2). Los cultivos bacterianos crecieron en las placas de 96 pocillos profundos durante 3 días (en una incubadora a 25°C) hasta que cada uno de los cultivos aislados alcanzó una concentración de 10^9 UFC/mL. Después del período de crecimiento de tres días, todas las muestras (cultivos aislados bacterianos y combinaciones de bacterias que representaban diferentes combinaciones de consorcios) se evaluaron simultáneamente para determinar el aumento de la disponibilidad de PO_4 .

Los resultados de este estudio de incubación demuestran cómo se puede lograr una movilización mejorada del ortofosfato (PO_4) y el efecto sinérgico de incluir múltiples especies bacterianas en un consorcio. Estos datos muestran que la capacidad para movilizar fósforo mejora mucho mediante la adición de dos o más especies bacterianas descritas, de manera que la tasa de movilización de fósforo es mayor para los consorcios que las tasas aditivas de los miembros de los consorcios en cultivos aislados. Más específicamente, las mejoras sinérgicas más fuertes en la movilización de PO_4 se observaron con consorcios de dos especies (incluyendo *Enterobacter cloacae* (E) y *Citrobacter freundii* (C)) y consorcios de tres especies (incluyendo *Enterobacter cloacae* (E) y *Citrobacter freundii* (C) y *Pseudomonas putida* (P)) (Figura 5). Este resultado era inesperado. Más bien, en la mayoría de los casos, una especie bacteriana inhibiría el crecimiento y el metabolismo de una segunda especie bacteriana en el mismo cultivo.

Tabla 3.1 Diseño factorial completo para someter a ensayo los efectos interactivos entre las cuatro especies diana para la movilización mejorada de ortofosfato (PO_4). Los valores a continuación representan proporciones relativas (μ L) para lograr un volumen final de 50 μ L para añadir a 950 μ L en cada pocillo de las placas de 96 pocillos profundos. Cada cultivo tenía un recuento de 10^9 UFC en el momento de la mezcla. El ejemplo en el que están presentes todos los grupos de factores está de acuerdo con la presente invención reivindicada, otros ejemplos no forman parte de la presente invención reivindicada.

Grupo de factores	C. freundii (μ L)	E. cloacae (μ L)	P. putida (μ L)	C. testosteroni (μ L)
Todo	10	15	20	5
Cf+Ec+Pp	11,1	16,7	22,2	0
Cf+Pp+Ct	14,3	0	28,6	7,1
Ec+Pp+Ct	0	18,75	25	6,25
Cf+Ec+Ct	16,7	25	0	8,3
Cf+Pp	16,7	0	33,4	0
Cf+Ec+Ct	20	0	20	10
Ec+Pp	0	21,4	28,6	0
Ct+Ec+Pp	0	25	16,7	8,3
Ct+Pp	0	0	40	10
Ec+Pp	0	25	16,7	8,3
Cf+Ec	20	30	0	0
Cf+Ct	33,3	0	0	16,7
Cf+Pp	25	0	25	0

Grupo de factores	C. freundii (μL)	E. cloacae (μL)	P. putida (μL)	C. testosteroni (μL)
Ec+Pp	0	30	20	0
Ec+Ct	0	37,5	0	12,5
Ct+Pp	0	0	33,3	16,7
C. freundii	50	0	0	0
E. cloacae	0	50	0	0
P. putida	0	0	50	0
C. testosteroni	0	0	0	50

Tabla 3.2 Estructura de la comunidad bacteriana, unidades formadoras de colonias (UFCs) y abundancias relativas para nuestros consorcios bacterianos de movilización de PO₄ del suelo

Especies bacterianas	UFC/mL	Abundancias relativas
<i>Enterobacter cloacae</i>	80.000.000	0,4
<i>Citrobacter freundii</i>	60.000.000	0,3
<i>Comamonas testosteroni</i>	40.000.000	0,2
<i>Pseudomonas putida</i>	20.000.000	0,1
Total	200.000.000	1,00

5

En algunas realizaciones de la composición descrita, la abundancia relativa de una cepa individual en un consorcio puede estar entre 0,05 y 0,95. En muchas realizaciones, la abundancia relativa de una cepa puede ser mayor que aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98 o 0,99 y menos de aproximadamente 0,99, 0,98, 0,97, 0,96, 0,95, 0,90, 0,85, 0,80, 0,75, 0,70, 0,65, 0,60, 0,55, 0,50, 0,45, 0,40, 0,35, 0,30, 0,25, 0,20, 0,15, 0,10, 0,05, 0,04, 0,03, 0,02 o 0,01. Así, por ejemplo, la proporción de especies bacterianas en un consorcio puede ser, sin limitación, 0,5:0,5, 0,1:0,9, etc. (para consorcios con dos cepas/especies), 0,33:0,33:0,33, 0,1:0,4:0,5, 0,2:0,6:0,2, etc. (para consorcios con tres cepas/especies), 0,1:0,4:0,4:0,1, 0,4:0,3:0,2:0,1 etc. (para consorcios con cuatro cepas/especies).

10

15

Ejemplo 3 - Evaluación del rendimiento bioestimulante en estudios de invernadero

La solicitante ha sometido a ensayo la efectividad y la eficacia de los bioestimulantes microbianos movilizadores de P para mejorar la emergencia temprana, el verdor y el vigor general de trigo (Figura 64), césped (Figuras 7-11), jalapeños (Figura 12), tomates (Figuras 13-15), albahaca (Figura 15) y caléndulas (Figura 16) en experimentos de invernadero. Esos experimentos se llevaron a cabo en el invernadero Plant Growth Facilities en el campus de la Universidad Estatal de Colorado (Fort Collins, Colorado), que proporciona un fotoperíodo controlado de 16 horas para simular la luz solar para el crecimiento de las plantas. La temperatura diurna del invernadero se establece en 23°C y 17°C por la noche.

20

25

Por ejemplo, en un estudio piloto inicial para evaluar la eficacia de los bioestimulantes microbianos sobre las características de vigor del césped, cultivamos cuatro especies de hierbas diferentes en bandejas de semillas de tamaño completo (las dimensiones son 53,34 cm de largo × 27,94 cm de ancho × 5,84 cm de alto), hechas de polipropileno reciclado, con agujeros de drenaje en la parte inferior. Las bandejas de semillas se llenaron en ¾ partes con tierra recogida. Después de agregar suelo a las bandejas de semillas, los suelos se regaron previamente con 150 mL de agua usando un vaso de precipitados. Las densidades de semillas recomendadas se diseminaron por la parte superior del suelo (1,6 g para pasto azul de Kentucky y 2,66 g para ballica, festuca alta y agrostis). Los suelos utilizados en ese experimento se caracterizan como suelo franco Stoneham con una mezcla de aluvión y/o material parental de depósito eólico (Haplustalfs mésico-franco-fino, mixto) (NRCS, 2012). Los Haplustalfs áridicos se clasifican en el orden de los suelos Alfisols, por lo general experimentan condiciones secas prolongadas y se utilizan ampliamente en agroecosistemas y ocupan aproximadamente una décima parte de la superficie terrestre de la tierra. Esos suelos tienen un subsuelo enriquecido con arcilla y se caracterizan por carecer de fósforo disponible en muchas partes del mundo. En general, los Alfisols tienen un alto contenido en aluminio (Al) y hierro (Fe), lo que sugiere que esos suelos tienen una afinidad de sorción de P relativamente alta. Una vez recogidos, los suelos se tamizaron con un tamiz de 4 mm para eliminar objetos grandes (rocas, raíces, etc.) y luego con un tamiz de 2 mm para homogeneizar mejor el tamaño de los agregados. El suelo de campo homogeneizado se mezcló con una mezcla de arena estéril en una proporción de 1:1 para maximizar la porosidad del suelo a la vez que se mantenía una cantidad razonable de suelo de campo por sus propiedades nutritivas y microbianas. Antes de crear la mezcla de suelo y arena, la arena (Quikrete; Atlanta, GA) se esterilizó primero en un autoclave durante 30 minutos a 121°C y 0,069 bar, y luego

30

35

40

45

se saturó con agua desionizada estéril (a intervalos de ~30 min) hasta lograr un pH de ~8,0 para igualar las condiciones de pH del suelo de campo *in situ* (media del pH del suelo de campo $\pm$ SE = 8,3 $\pm$ 0,05).

Haciendo referencia a las Tablas 4.1 y 4.2 (presentadas en las Figuras 17 y 18), se aplicaron diferentes tratamientos en este experimento, incluidos: Tratamiento 1) consorcios microbianos procedentes de nuestros consorcios microbianos movilizadores de P; Tratamiento 2) medios estériles correspondientes al tratamiento 1 (utilizando 0,2 μ M) sin actividad microbiana; y Tratamiento 3) un fertilizante vegetal inorgánico común rico en nutrientes usado para un control (solución de Hoagland), que representa un recurso de nutrientes no limitante para el crecimiento del pasto. Cada tratamiento del pasto (100 mL) se aplicó directamente a la semilla de hierba usando una botella vaporizadora. Una vez que se aplicaron los tratamientos, se añadió una capa de 1 cm de tierra vegetal para cubrir las semillas, seguida de 400 mL de agua que se aplicaron a cada caja de semillas usando un vaso de precipitados de 500 mL.

Se observó una emergencia más rápida, un mayor crecimiento del pasto y un pasto más verde en tres de las cuatro especies de pasto (incluyendo la ballica, la festuca alta y el pasto azul de Kentucky) inoculadas con el Tratamiento 1, 8 días después de la siembra, en comparación con todos los demás tratamientos (Figura 6). La mayoría de los pastos eran más verdes (evaluados usando el índice DGCI) (Figura 7) y los céspedes incorporaron más biomasa cuando se inoculó nuestro bioestimulante movilizador de P, en comparación con todos los demás tratamientos, incluidas las adiciones de fertilizantes inorgánicos, como lo demostró el pasto azul de Kentucky (Figura 8-9). Además, la mayor disponibilidad de nutrientes del suelo y la subsiguiente absorción de varios macro y micronutrientes por parte de las plantas se correspondían con aplicaciones de bioestimulantes microbianos (Figura 11). Por ejemplo, las semillas inoculadas con la composición bioestimulante microbiana movilizadora de P de la presente descripción (Elevate P) demostraban una mayor absorción de calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na), potasio (K) y hierro (Fe) del suelo, en comparación con los fertilizantes inorgánicos tradicionales (Fertilizante inorgánico) (Figura 11). Los inóculos bacterianos de la solicitante también aumentaban la disponibilidad y la absorción de varios otros nutrientes, que se muestran en las Tablas 4.1 y 4.2, Figuras 17 y 18, respectivamente.

Por lo tanto, la presente descripción está bien adaptada para lograr los fines y ventajas mencionados, así como aquellos que son inherentes a la misma. Las realizaciones particulares descritas anteriormente son solo ilustrativas, ya que la presente descripción puede modificarse y ponerse en práctica de maneras diferentes pero equivalentes, evidentes para los expertos en la técnica que se benefician de las enseñanzas de este documento. Además, no se pretende establecer limitaciones a los detalles de construcción o diseño que se muestran en este documento, aparte de las descritas en las reivindicaciones siguientes. Por lo tanto, es evidente que las realizaciones ilustrativas particulares descritas anteriormente pueden alterarse, combinarse o modificarse y todas esas variaciones se consideran dentro del alcance y el espíritu de la presente descripción. La presente descripción que se describe de manera ilustrativa en el presente documento puede ponerse en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento que no se describa específicamente en el presente documento y/o cualquier elemento opcional descrito en el presente documento.

Ejemplo 4 - Efecto de los consorcios sobre el crecimiento de las plantas

Se estudió el efecto que las bacterias reivindicadas a continuación tenían sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* porque se sabe que su crecimiento se ve afectado por inoculaciones en el suelo (Swenson *et al.*, 2000). Se plantaron dos semillas de tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* (de Evotek Inc., Washington DC, EE. UU.) por maceta, en macetas de 10 cm rellenas con aproximadamente medio litro de tierra esterilizada en autoclave (50% de tierra vegetal agrícola y 50% de tierra para macetas). Las macetas sembradas se mantuvieron a 21°C con 16 h al día de luz solar suplementaria bajo un banco de nebulización durante aproximadamente dos semanas para asegurar la germinación. Inmediatamente después de plantar las semillas, se añadieron 5 mL de medio (té de alfalfa, descrito anteriormente) a cada maceta.

Algunos de los medios comprendían una o más especies de bacterias. Si el medio incluía bacterias, la concentración total de bacterias en el medio era de $6,5 \pm 2,1 \times 10^8$ ufc/mL. Un grupo de plantas recibió solo medio ("medio" o "0 ssp"). Un conjunto de plantas recibió medios que contenían las cuatro especies de bacterias ("4 ssp"): *Comamonas testosteroni* (Ce), *Citrobacter freundii* (Cf), *Enterobacter cloacae* (Ec) y *Pseudomonas putida* (Pp). Cuatro conjuntos de plantas recibieron medios que contenían una especie ("1 ssp"), cada una entre Ce, Cf, Ec o Pp. Seis conjuntos de plantas recibieron medios que contenían cantidades equivalentes de dos especies bacterianas ("2 ssp"), cada una, seleccionada entre Ce, Cf, Ec y Pp; Ce+Cf, Ce+Ec, Ce+Pp, Cf+Ec, Cf+Pp y Ec+Pp. Cuatro conjuntos de plantas recibieron medios que contenían cantidades equivalentes de tres especies bacterianas ("3 ssp"), cada una, seleccionada entre Ce, Cf, Ec y Pp; Ce+Cf+Ec, Ce+Ec+Pp, Ce+Cf+Pp y Cf+Ec+Pp. El ejemplo en el que están presentes todos los grupos de factores es según la presente invención reivindicada, otros ejemplos no forman parte de la presente invención reivindicada.

Si ambas semillas germinaban, se sacaba de la maceta la más pequeña de las dos. Después de la germinación, las macetas se inocularon por segunda vez, nuevamente con 5 mL de medio que contenía la mezcla bacteriana

adecuada, o sin bacterias (0 ssp). Las macetas se mantuvieron húmedas mediante riego diario en un banco de niebla durante dos semanas para asegurar la germinación. Dos semanas después de la siembra, las plantas se retiraron del banco de niebla, pero se mantuvo el riego diario.

- 5 Se midieron tres variables para evaluar el crecimiento de cada planta: el número de hojas de la roseta, el diámetro máximo de la roseta y la altura de la planta. Las mediciones se tomaron y se registraron dos veces por semana. Se excluyeron del análisis las plantas que no pudieron espigar (crecer) después de 32 días. La incapacidad de espigar se distribuía por igual entre todos los tratamientos.
- 10 La Figura 19 muestra los resultados de esos experimentos, específicamente indicadores del crecimiento de *Arabidopsis* para semillas inoculadas con medios que comprendían diferentes cantidades de especies. Las Tablas 5-9 presentan los datos utilizados para crear los gráficos de la Figura 19. Los puntos graficados en la Figura 19 representan la media y las barras de error indican el error estándar de la media de 6-8 repeticiones. Los símbolos indican que los datos de los tratamientos con 4 especies, 4 ssp, son significativamente mayores que con 0 especies, con $p < 0,05$ ($\Phi \Phi$) o $p < 0,1$ (Φ) y con 4 especies son mayores que todos los demás tratamientos, con $p < 0,05$ ($**$) o $p < 0,1$ ($*$). Sorprendentemente, y para cada variable medida, el crecimiento de las plantas mostraba el mayor aumento cuando los medios incluían las cuatro especies, 4 ssp. Este resultado era consistente a lo largo del desarrollo de la planta; fase temprana (número de hojas de la roseta), fase temprana-intermedia (diámetro máximo de la roseta) y fase intermedia-tardía (altura de la planta).
- 20 Específicamente, la tasa de crecimiento de los primeros cinco días después de que la primera planta comenzó a espigar (desarrollar un tallo), el tratamiento completo con cuatro especies daba como resultado una tasa de crecimiento en altura más de cinco veces mayor que añadiendo simplemente medios sin microbios. Curiosamente, añadir entre 1 y 3 especies no daba lugar a ningún efecto significativo, en comparación con solo añadir medios. Finalmente, la presencia de cuatro especies bacterianas en los medios ayudaba a reducir a la mitad (2 veces) la variabilidad de los datos (en relación con ssp 1, ssp 2 y ssp 3) y 3 veces (en relación con 0 ssp, control de medios).
- 25
- 30 La Tabla 5 muestra la productividad de *Arabidopsis* por número de especies en el tratamiento. Las letras detrás de los valores en la tabla indican la relación entre los valores en una columna dada, específicamente las diferencias significativas ($p < 0,1$; por ejemplo, "a" es similar a "a" y a "ab", pero no "b"). Todos los tratamientos recibieron las aplicaciones de fertilizantes indicadas. El tratamiento con ssp 4 (Mammoth P) aumentaba la productividad en un 25%, 71% y 58% para las tres medidas de productividad evaluadas. El número de hojas de la roseta se evaluó después de 14 días; el diámetro máximo de la roseta a los 25 días; la altura de la planta se evaluó 39 días después de la siembra.
- 35

Tabla 5

Tratamiento	Número de hojas de la roseta ± SE	Diámetro máximo de la roseta (mm) ± SE	Altura de la planta (mm) ± SE
0 ssp - control	4,8 ± 0,4 b	17 ± 3 b	119 ± 23 b
1 ssp	5,1 ± 0,2 ab	21 ± 2 b	155 ± 9 a
2 ssp	5,1 ± 0,1 b	20 ± 1 b	160 ± 7 a
3 ssp	5,1 ± 0,2 ab	21 ± 1 b	154 ± 9 a
4 ssp - Mammoth P	6,0 ± 0,3 a	29 ± 2 a	188 ± 8 a

- 5 La Tabla 6 muestra la productividad de *Arabidopsis* mediante tratamientos específicos para puntos temporales pico específicos de las mediciones. El número de hojas de la roseta se evaluó después de 14 días; el diámetro máximo de la roseta a los 25 días; la altura de la planta se evaluó 39 días después de la siembra.

Tabla 6

10

Tratamiento	Número de hojas de la roseta ± SE	Diámetro máximo de la roseta (mm) ± SE	Altura de la planta (mm) ± SE
ssp 4 (Mammoth P; Cf, Ec, Pp & Ce)	6,0 ± 0,3	29 ± 2	188 ± 8
Cf, Ec & Pp	5,3 ± 0,3	23 ± 1	172 ± 15
Cf & Pp	4,8 ± 0,5	21 ± 4	165 ± 18
E & Pp	5,0 ± 0,3	21 ± 3	150 ± 19
Pp & Ce	4,8 ± 0,3	20 ± 2	156 ± 13
Cf & Ec	5,5 ± 0,3	21 ± 3	166 ± 20
C & Ce	5,0 ± 0,3	19 ± 2	145 ± 16
E & Ce	5,4 ± 0,2	21 ± 2	184 ± 14
Pp	5,0 ± 0,4	19 ± 3	142 ± 25
Cf	5,0 ± 0,4	18 ± 2	167 ± 25
Ec	5,4 ± 0,2	20 ± 1	168 ± 11
Ce	5,1 ± 0,4	24 ± 4	146 ± 12
0 ssp - Control	4,8 ± 0,4	17 ± 3	119 ± 23

La Tabla 7 muestra el crecimiento de *Arabidopsis* por altura (mm) para todos los tratamientos y tiempos de muestreo. Los números indican la media ± SE. Mammoth P tiene las cuatro especies; Cf = *E. Citrobacter*, Ec = *E. Enterobacter*, Pp = *P. Pseudomonas*; Ce = *C. Comamonas*

15

Tabla 7

Tratamiento	Día 28	Día 32	Día 33	Día 35	Día 39	Día 42	Día 46
Ce, Cf, Ec & Pp	16 ± 6	85 ± 17	109 ± 18	145 ± 13	188 ± 8	211 ± 12	237 ± 17
Cf, Ec & Pp	5 ± 2	50 ± 17	71 ± 19	117 ± 20	172 ± 15	205 ± 12	252 ± 12
Cf & Pp	3 ± 2	41 ± 16	59 ± 20	164 ± 25	165 ± 18	208 ± 11	248 ± 20
Ec & Pp	8 ± 6	44 ± 21	61 ± 23	96 ± 26	150 ± 19	189 ± 12	237 ± 7
Pp & Ce	4 ± 2	37 ± 15	54 ± 17	92 ± 18	156 ± 13	204 ± 11	246 ± 13
Cf & Ec	9 ± 3	67 ± 18	88 ± 21	123 ± 23	166 ± 20	193 ± 19	224 ± 15
Cf & Ce	8 ± 4	44 ± 14	60 ± 16	95 ± 18	145 ± 16	176 ± 13	220 ± 9
Ec & Ce	11 ± 4	66 ± 18	84 ± 19	126 ± 20	184 ± 14	222 ± 12	252 ± 9
Pp	4 ± 2	44 ± 14	57 ± 17	94 ± 24	142 ± 25	179 ± 23	219 ± 20

Tratamiento	Día 28	Día 32	Día 33	Día 35	Día 39	Día 42	Día 46
Cf	10 ± 7	66 ± 17	60 ± 29	96 ± 33	167 ± 25	211 ± 17	259 ± 11
Ec	4 ± 1	40 ± 13	67 ± 11	114 ± 13	168 ± 11	208 ± 11	251 ± 8
Ce	3 ± 2	51 ± 27	50 ± 14	88 ± 17	146 ± 12	187 ± 12	240 ± 16
Control	10 ± 6	46 ± 10	51 ± 24	74 ± 27	119 ± 23	158 ± 16	209 ± 11

La Tabla 8 muestra el crecimiento de *Arabidopsis* por diámetro máximo (mm) para todos los tratamientos y tiempos de muestreo. Los números indican la media ± SE. Mammoth P tiene las cuatro especies; Cf = *E. Citrobacter*, Ec = *E. Enterobacter*, Pp = *P. Pseudomonas*; Ce = *C. Comamonas*.

5

Tabla 8

Tratamiento	Día 19	Día 21	Día 25	Día 28	Día 32	Día 35	Día 39	Día 46
Ce,Cf,Ec&P p (ssp 4; MammothP)	16 ± 2	21 ± 2	29 ± 2	37 ± 2	44 ± 3	46 ± 3	48 ± 3	46 ± 5
Cf,Ec&Pp	14 ± 1	16 ± 1	23 ± 1	28 ± 3	38 ± 4	40 ± 4	42 ± 4	45 ± 5
Cf&Pp	13 ± 3	15 ± 3	21 ± 4	27 ± 4	35 ± 4	41 ± 4	46 ± 5	49 ± 5
Ec&Pp	12 ± 2	15 ± 3	21 ± 3	27 ± 3	37 ± 2	42 ± 2	45 ± 2	46 ± 3
P&Ce	12 ± 1	15 ± 2	20 ± 2	26 ± 2	36 ± 4	42 ± 3	47 ± 3	50 ± 4
Cf&Ec	14 ± 2	16 ± 2	21 ± 3	28 ± 4	37 ± 5	37 ± 5	41 ± 5	40 ± 5
Cf&Ce	12 ± 1	14 ± 1	19 ± 2	25 ± 2	33 ± 2	35 ± 2	39 ± 2	40 ± 1
Ec&Ce	13 ± 1	15 ± 1	21 ± 2	28 ± 2	38 ± 4	41 ± 3	44 ± 3	45 ± 3
Pp	12 ± 2	15 ± 3	19 ± 3	24 ± 4	31 ± 5	34 ± 5	37 ± 5	37 ± 5
Cf	11 ± 2	13 ± 2	18 ± 2	25 ± 2	36 ± 5	43 ± 5	46 ± 5	49 ± 6
Ec	13 ± 1	14 ± 1	20 ± 1	26 ± 2	35 ± 2	39 ± 2	42 ± 2	44 ± 3
Ce	15 ± 2	18 ± 3	24 ± 4	31 ± 5	43 ± 6	47 ± 6	48 ± 6	52 ± 8
Control	11 ± 1	13 ± 2	17 ± 3	23 ± 3	31 ± 4	34 ± 4	39 ± 3	43 ± 4

La Tabla 9 muestra el crecimiento de *Arabidopsis* por número de hojas de la roseta para todos los tratamientos y tiempos de muestreo. Los números indican la media ± SE. Mammoth P tiene las cuatro especies; Cf = *E. Citrobacter*, Ec = *E. Enterobacter*; Pp = *P. Pseudomonas*; Ce = *C. Comamonas*.

10

Tabla 9

Tratamiento	Día 14	Día 18	Día 19	Día 21	Día 25
Ce,Cf,Ec&Pp - Mammoth P	6,0 ± 0,3	7,9 ± 0,3	8,4 ± 0,3	9,7 ± 0,3	11,6 ± 0,4
Cf,Ec&Pp	5,3 ± 0,3	7,8 ± 0,7	8,3 ± 0,6	9,0 ± 0,4	11,3 ± 0,2
Cf&Pp	4,8 ± 0,5	7,5 ± 0,5	8,0 ± 0,5	9,2 ± 0,7	11,2 ± 0,7
Ec&Pp	5,0 ± 0,3	6,7 ± 0,3	7,6 ± 0,4	8,9 ± 0,4	10,4 ± 0,5
Pp&Ce	4,8 ± 0,3	6,6 ± 0,3	7,6 ± 0,3	8,8 ± 0,4	10,9 ± 0,4
Cf&Ec	5,5 ± 0,3	7,5 ± 0,3	8,5 ± 0,3	9,3 ± 0,5	11,5 ± 0,6
Cf&Ce	5,0 ± 0,3	7,0 ± 0,3	7,8 ± 0,3	8,8 ± 0,3	10,3 ± 0,3
E&Ce	5,4 ± 0,2	7,7 ± 0,2	8,3 ± 0,2	9,6 ± 0,2	11,4 ± 0,2
Pp	5,0 ± 0,4	6,4 ± 0,6	7,3 ± 0,6	8,4 ± 0,5	11,6 ± 1,2
Cf	5,0 ± 0,4	6,4 ± 0,4	7,6 ± 0,4	8,8 ± 0,5	10,4 ± 0,5
Ec	5,4 ± 0,2	7,1 ± 0,1	7,7 ± 0,2	9,0 ± 0,0	11,6 ± 0,2
Ce	5,1 ± 0,4	7,1 ± 0,4	7,8 ± 0,4	9,0 ± 0,5	11,4 ± 0,7
Control	4,8 ± 0,4	7,0 ± 0,4	7,4 ± 0,5	8,8 ± 0,4	10,3 ± 0,5
Tratamiento	Día 28	Día 32	Día 35	Día 39	Día 46

Tratamiento	Día 14	Día 18	Día 19	Día 21	Día 25
Ce,Cf,Ec&Pp - Mammoth P	14,3 ± 0,9	15,4 ± 0,8	14,3 ± 0,8	13,3 ± 1,1	12,6 ± 1,3
Cf,Ec&Pp	13,0 ± 0,3	14,2 ± 0,8	14,0 ± 1,3	13,0 ± 1,2	13,1 ± 1,4
Cf&Pp	12,8 ± 0,6	13,3 ± 0,7	12,8 ± 0,5	12,2 ± 0,9	12,3 ± 1,1
Ec&Pp	12,7 ± 0,6	13,3 ± 0,5	12,4 ± 0,2	11,3 ± 0,3	12,7 ± 1,0
Pp&Ce	12,4 ± 0,3	13,0 ± 0,6	13,3 ± 0,7	12,8 ± 0,7	13,5 ± 0,9
Cf&Ec	12,7 ± 0,9	14,0 ± 1,1	12,8 ± 1,2	12,2 ± 1,5	11,8 ± 1,4
Cf&Ce	11,8 ± 0,3	12,4 ± 0,5	12,4 ± 0,7	11,9 ± 0,7	12,1 ± 0,8
Ec&Ce	12,4 ± 0,5	13,0 ± 0,5	13,4 ± 0,8	14,0 ± 0,9	13,3 ± 0,8
Pp	14,3 ± 2,5	15,9 ± 3,1	15,3 ± 2,8	14,1 ± 2,4	12,4 ± 2,0
Cf	12,8 ± 0,6	13,4 ± 0,7	12,6 ± 0,6	12,0 ± 0,9	13,0 ± 1,1
Ec	12,7 ± 0,2	13,4 ± 0,7	13,0 ± 0,7	11,7 ± 1,0	13,4 ± 1,1
Ce	13,4 ± 0,9	14,0 ± 1,0	14,1 ± 1,1	12,6 ± 1,1	12,0 ± 1,0
0 ssp - Control	12,6 ± 0,7	13,1 ± 0,7	13,0 ± 0,7	11,8 ± 0,9	12,0 ± 0,7

Depósitos

- Un depósito de consorcios de los Consorcios de Movilización de Fósforo de la Solicitante y los Consorcios de Mineralización de la Solicitante está y ha sido mantenido por la Universidad Estatal de Colorado desde antes de la fecha de presentación de esta solicitud. El acceso a ese depósito estará disponible durante la tramitación de la solicitud para el Comisionado de Patentes y Marcas y las personas que el Comisionado determine que tienen derecho para ello previa solicitud. Una vez admitida cualquiera de las reivindicaciones en la solicitud, la solicitante pondrá a disposición del público sin restricciones un depósito de los consorcios bacterianos en la Colección de cultivos ARS del Centro Nacional del Departamento de Agricultura de los EE. UU. para la Investigación de la Utilización Agrícola (NRRL; el "Depositorio"), Peoria, Illinois, 61604. Las bacterias depositadas serán tomadas del mismo depósito mantenido en la Universidad Estatal de Colorado como se ha descrito anteriormente. Además, la Solicitante cumplirá con todos los requerimientos de 37 C.F.R. §1.801 - 1.809, incluyendo la provisión de una indicación de la viabilidad de la muestra cuando se realiza el depósito. Los números de registro para una realización de los consorcios de bacterias son: *Comamonas testosteroni*, NRRL B-67136; *Citrobacter freundii*, NRRL B-67137; *Enterobacter cloacae*, NRRL B-67138; *Pseudomonas putida*, NRRL B-67139.

- Este depósito de las bacterias mencionadas anteriormente se mantendrá en el Depositorio, que es un depositario público, durante un período de 30 años, o 5 años tras la última petición, o durante la vida efectiva de la patente, lo que sea más largo, y se sustituirá si fuera necesario durante este periodo. La Solicitante no impondrá restricciones sobre la disponibilidad del material depositado; sin embargo, la Solicitante no tiene autoridad para renunciar a las restricciones impuestas por la ley sobre la transferencia de material biológico o su transporte en el comercio.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para mejorar la tasa con la que el fósforo orgánico del suelo se convierte en ortofosfato que comprende las cepas bacterianas *Comamonas testosteroni*, *Pseudomonas putida*, *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii* y un vehículo.
5
2. La composición según la reivindicación 1, en la que cada una de las cepas bacterianas comprende una secuencia de ARNr 16S mayor de 200 nucleótidos con al menos un 97% de identidad con una de SEQ ID NOS: 1 - 4.
10
3. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que la cepa bacteriana *Comamonas testosteroni* tiene el número de registro de NRRL, NRRL B-67136, la cepa bacteriana *Pseudomonas putida* tiene el número de registro de NRRL, NRRL B-67139, la cepa bacteriana *Citrobacter freundii* tiene el número de registro de NRRL, NRRL B-67137 y la cepa bacteriana *Enterobacter cloacae* tiene el número de registro de NRRL, NRRL B-67138.
15
4. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el vehículo comprende uno o más compuestos extraídos de la alfalfa.
- 20 5. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha composición es un líquido.
6. La composición según la reivindicación 5, en donde dicha composición líquida es una composición líquida concentrada a la que se ha eliminado el agua.
- 25 7. La composición según la reivindicación 5 o 6, en donde dicha composición líquida tiene un número total de microorganismos de 100.000 a 800.000 unidades formadoras de colonias por mililitro.
8. Un método para mejorar la tasa con la que el fósforo orgánico del suelo se convierte en ortofosfato que comprende: poner en contacto un suelo con las cepas bacterianas *Comamonas testosteroni*, *Pseudomonas putida*, *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii*.
30
9. El método según la reivindicación 8, en el que el suelo comprende una semilla o una planta.
10. El método según la reivindicación 8 o 9, que comprende además la etapa de permitir que crezca una semilla o una planta dentro del suelo.
35
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que se añade una semilla o una planta al suelo después de poner en contacto el suelo con las cepas bacterianas.
- 40 12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que las cepas bacterianas están comprendidas en una composición tal y como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que las cepas bacterianas están comprendidas en una composición tal y como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha composición es una composición en polvo o granulada que se aplica sobre el suelo.
45
14. El método según la reivindicación 12 o 13, en el que se entra en contacto con el suelo rociando el suelo con la composición.
- 50 15. El método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que las cepas bacterianas están comprendidas en una composición tal y como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde dicha composición es una composición líquida que se aplica sobre el suelo.

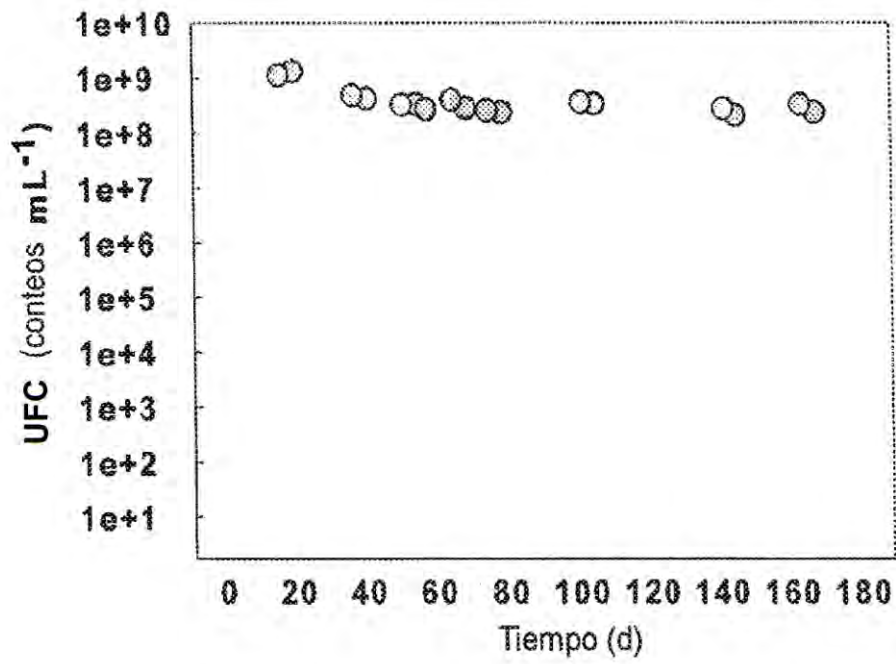


Fig 1

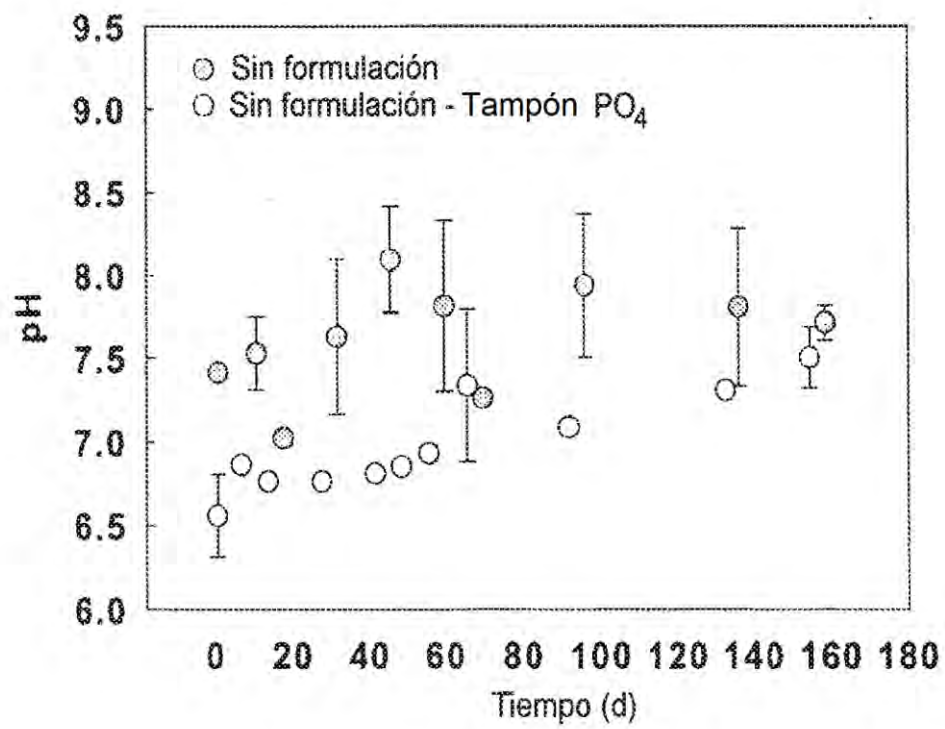


Fig 2

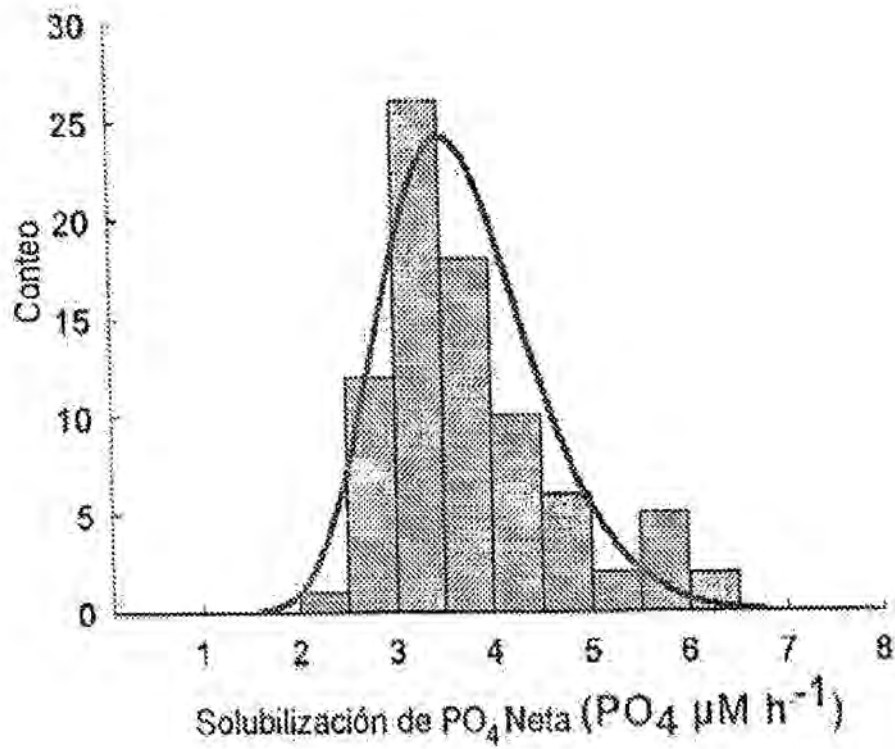


Fig 3

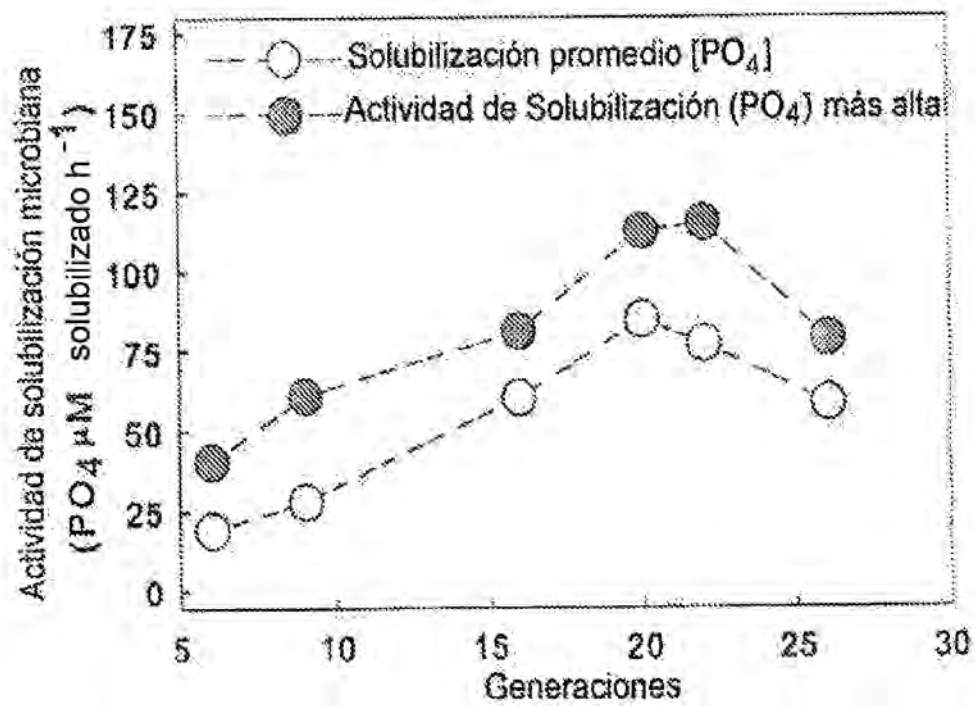


Fig 4

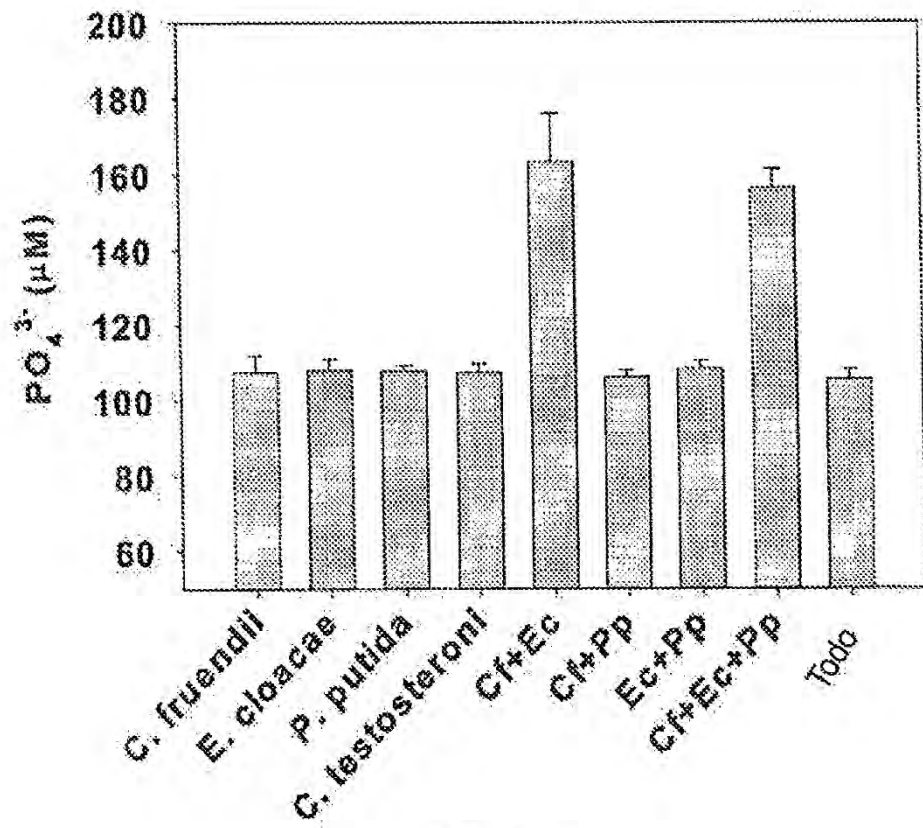


Fig 5

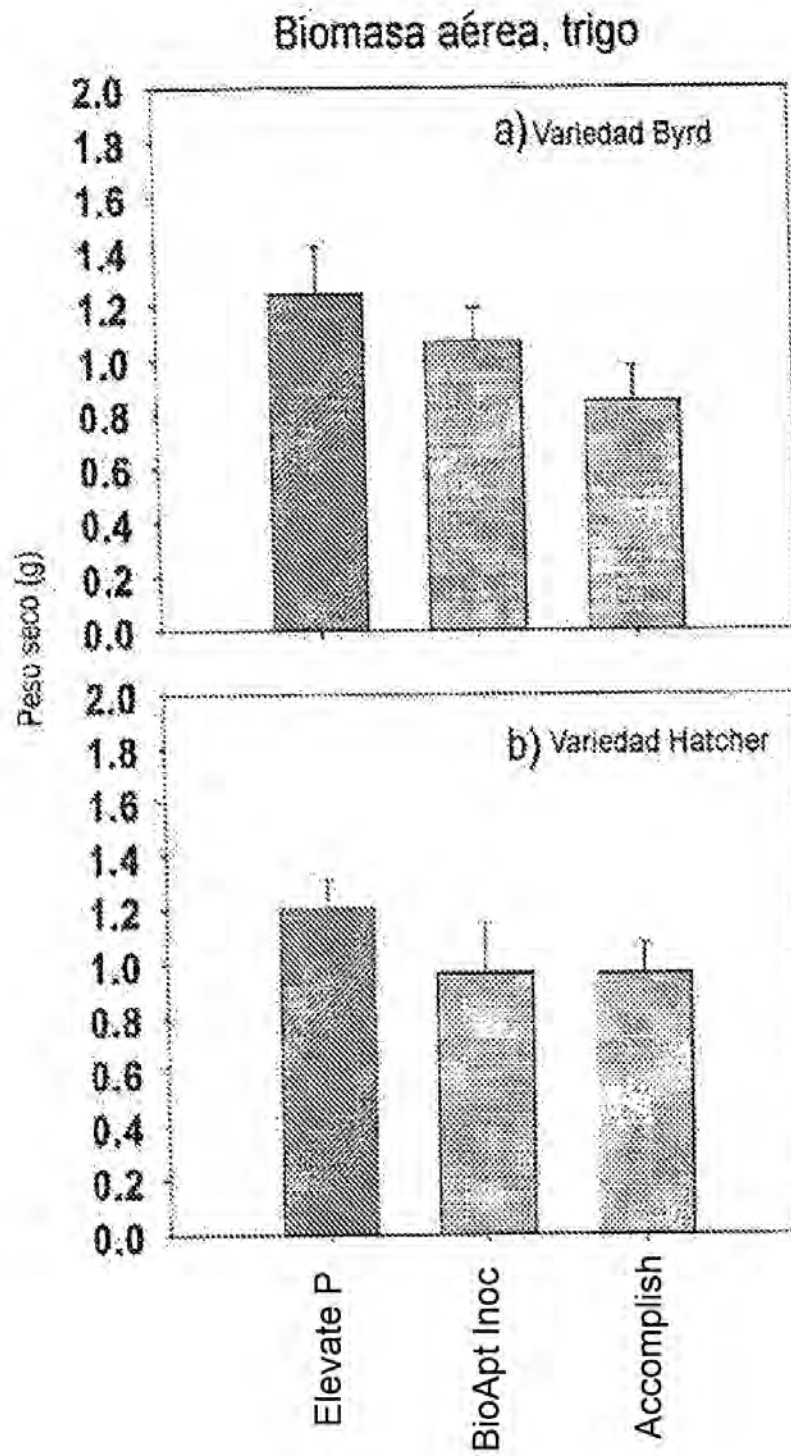


Fig 6A

Fig 6B

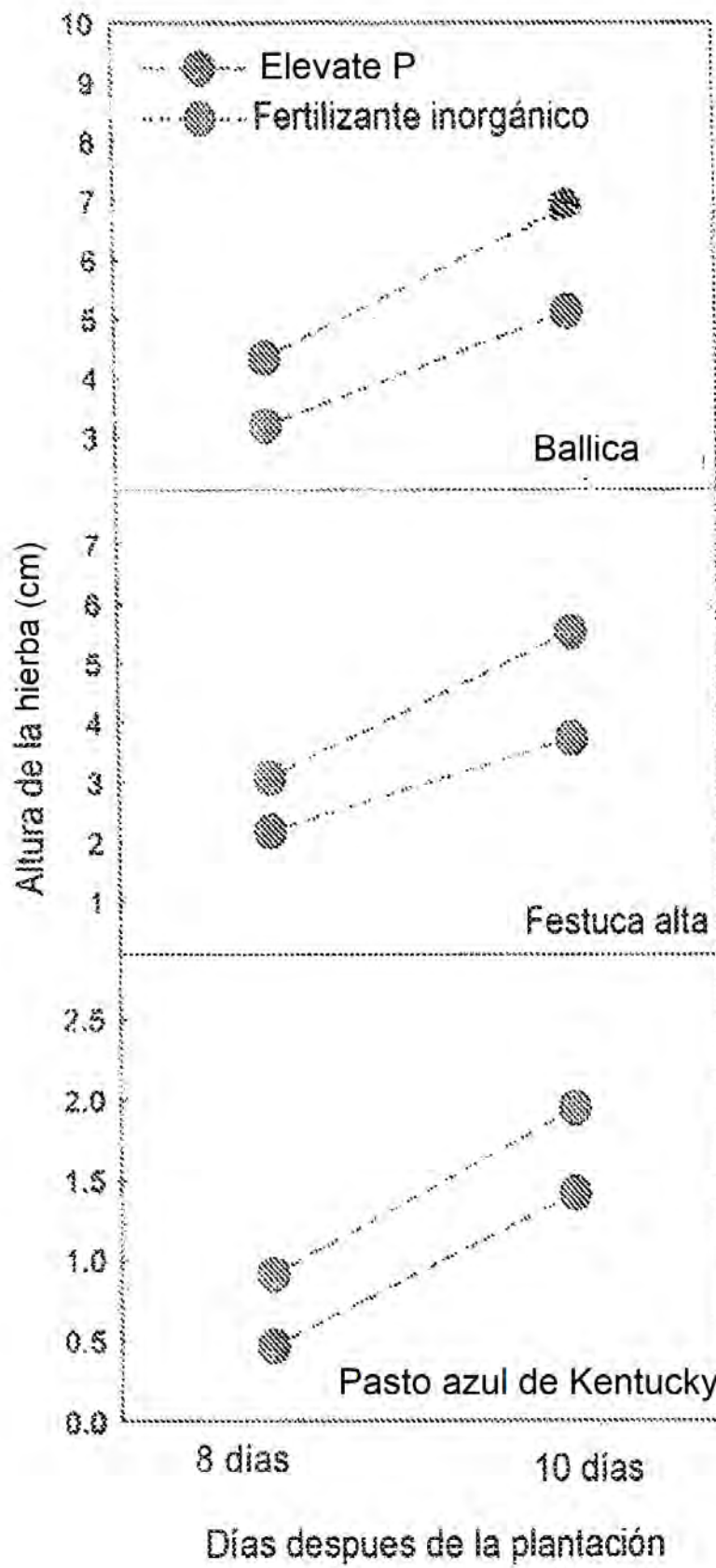
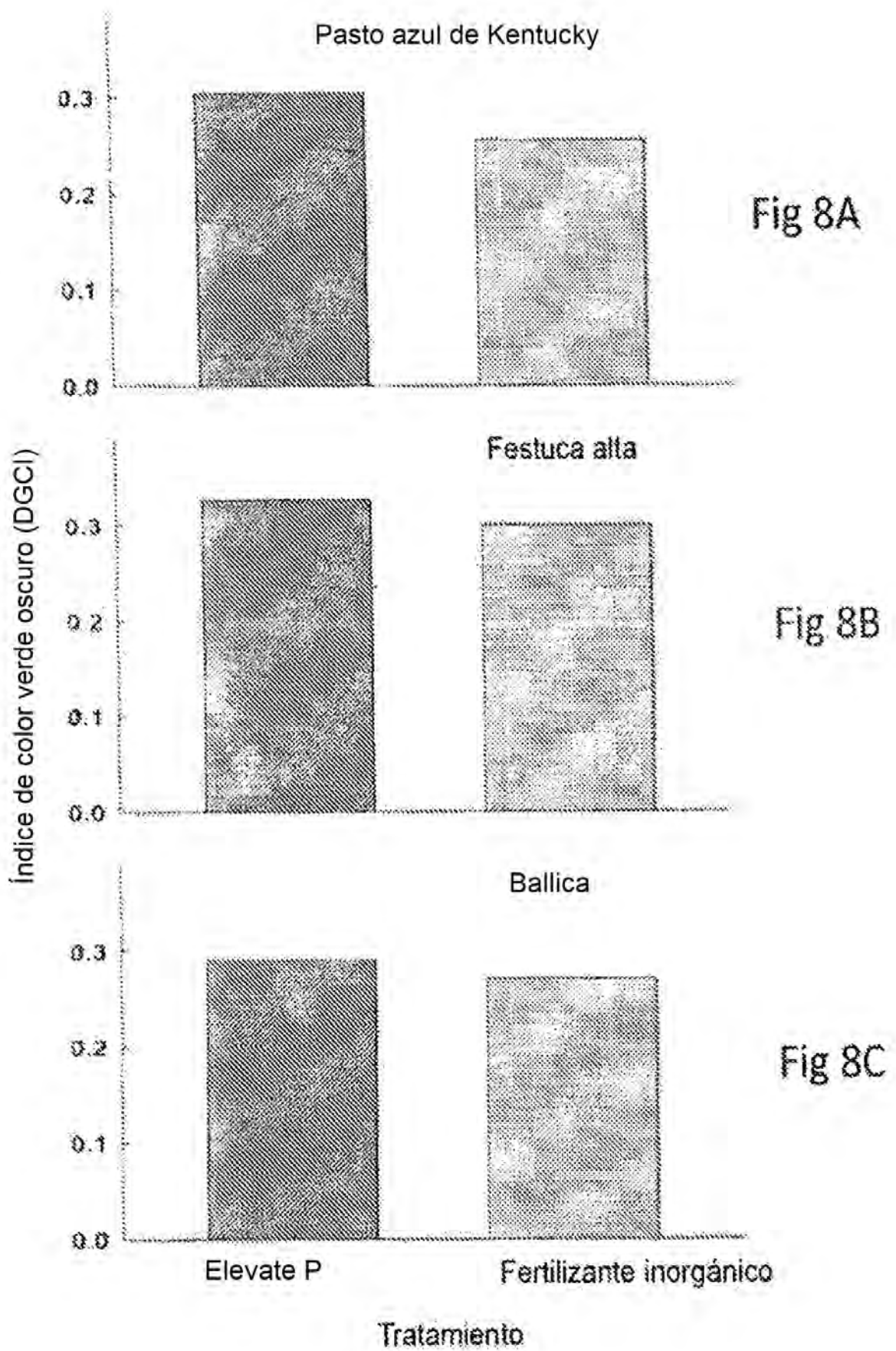
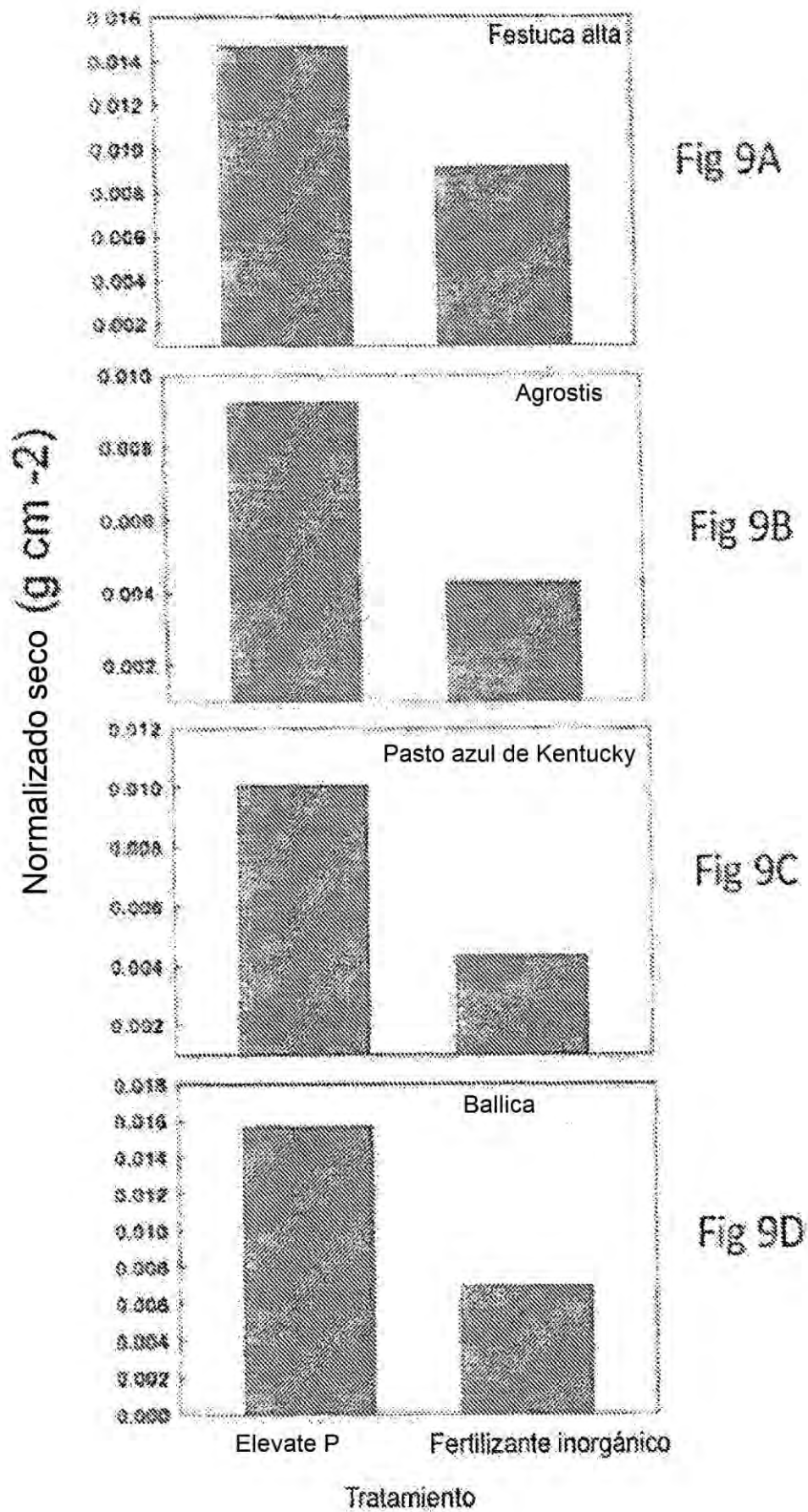


Fig 7A

Fig 7B

Fig 7C





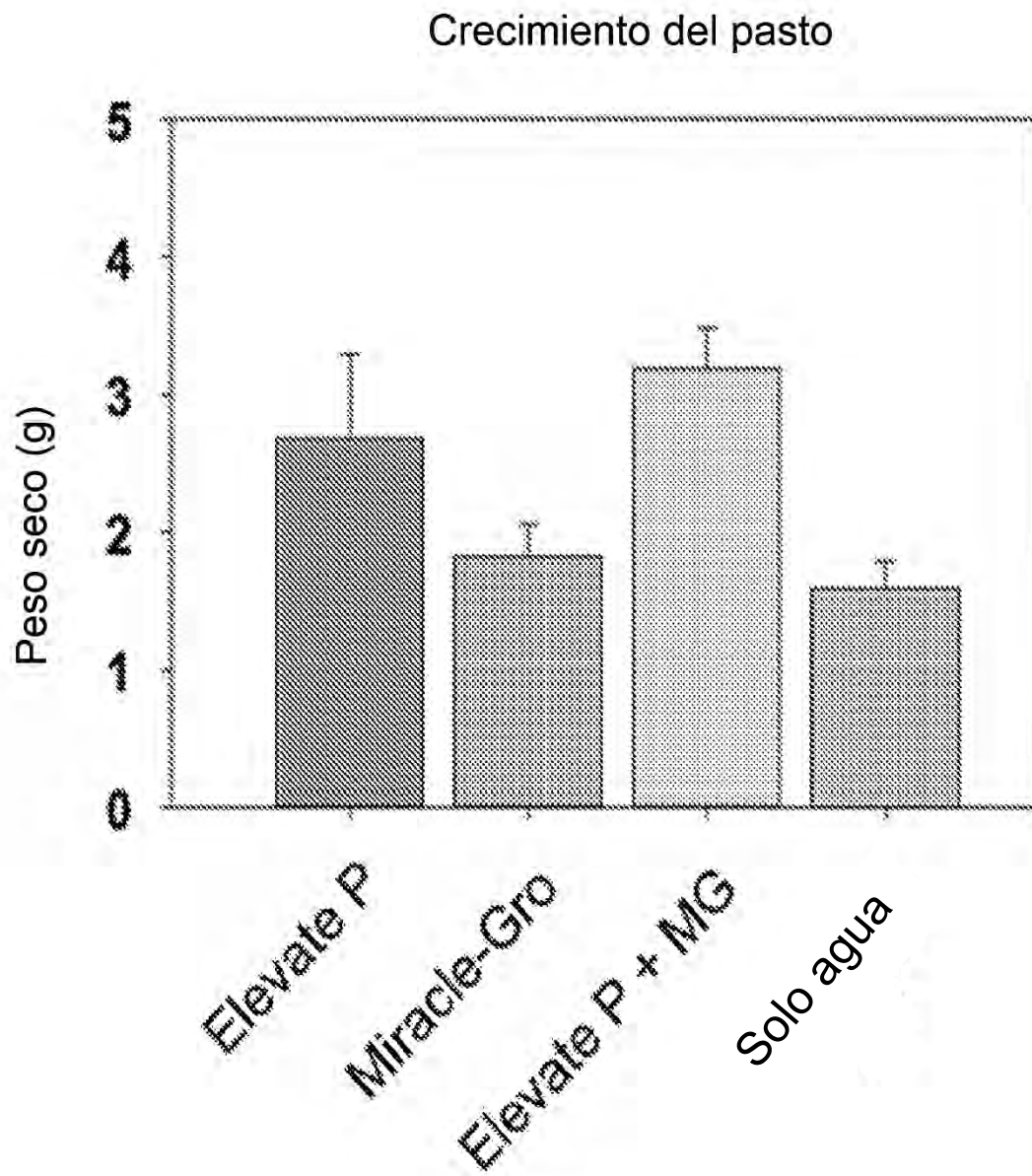


Fig. 10

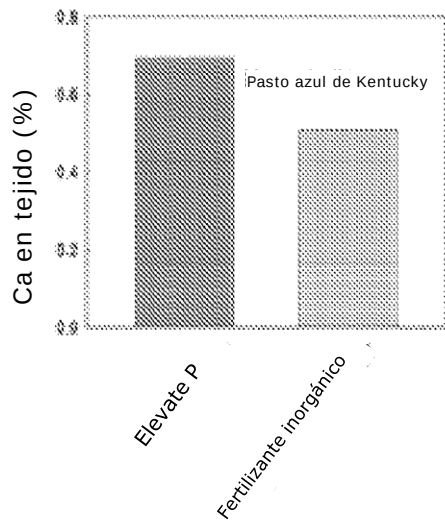


Fig 11A

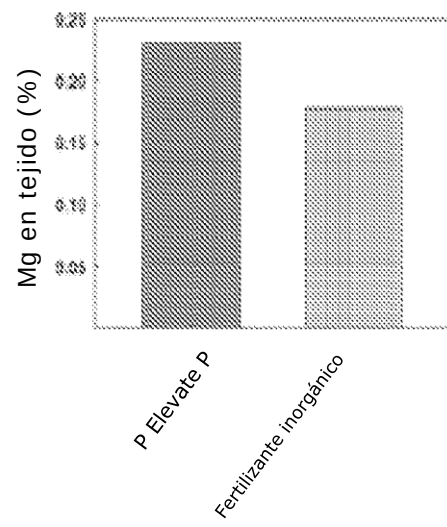


Fig 11B

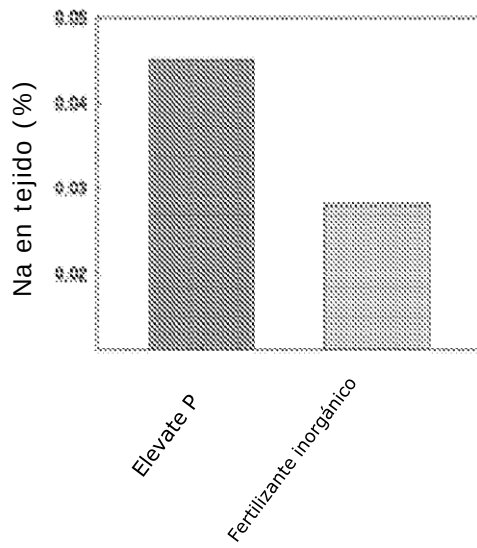


Fig 11C

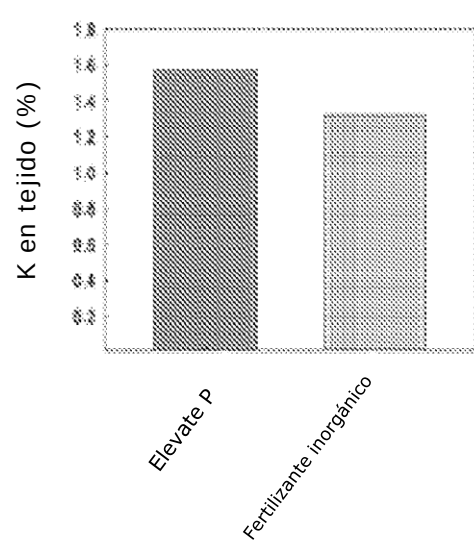


Fig 11D

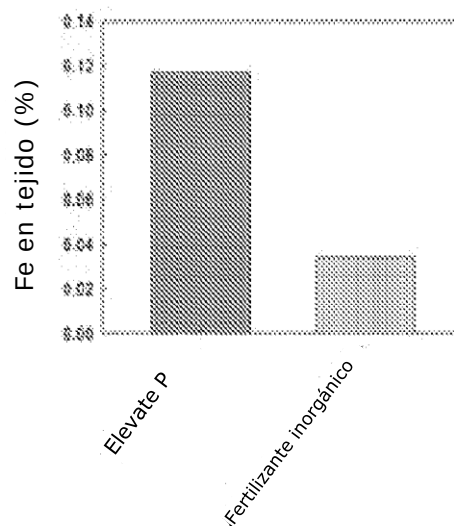


Fig 11E

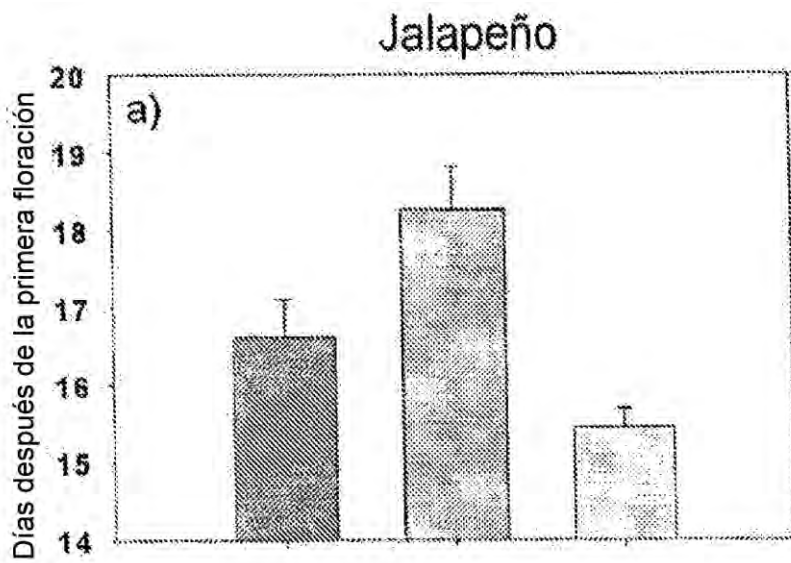


Fig 12A

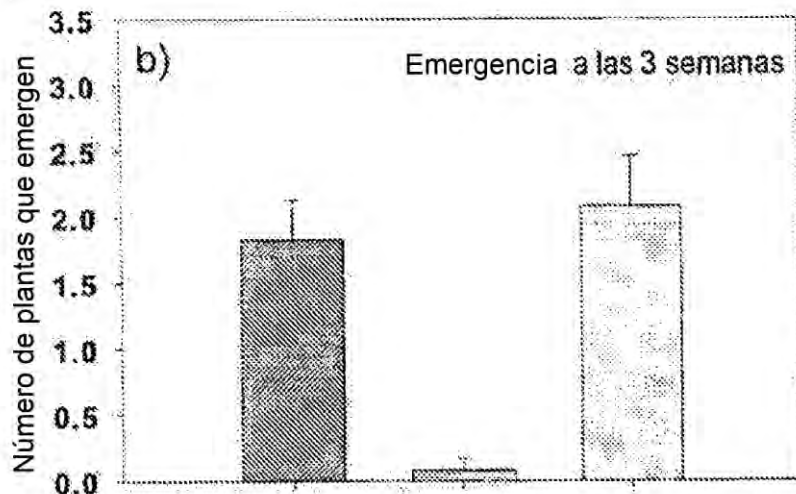


Fig 12B

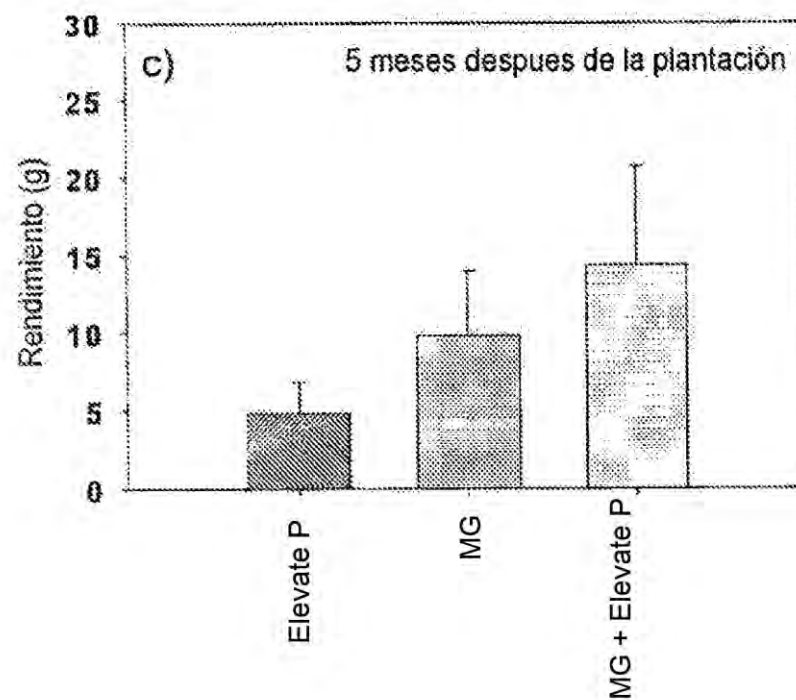


Fig 12C

Productividad de los tomates cereza

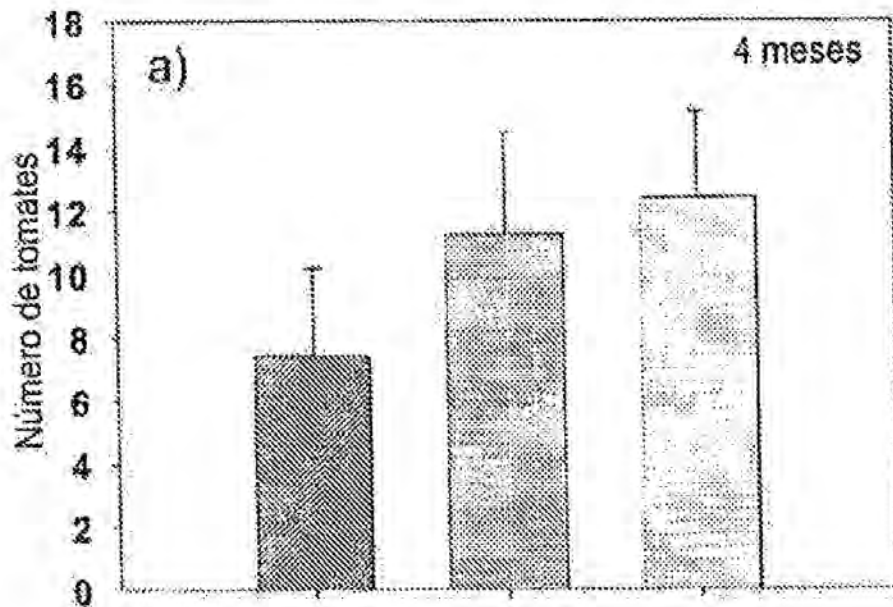


Fig 13A

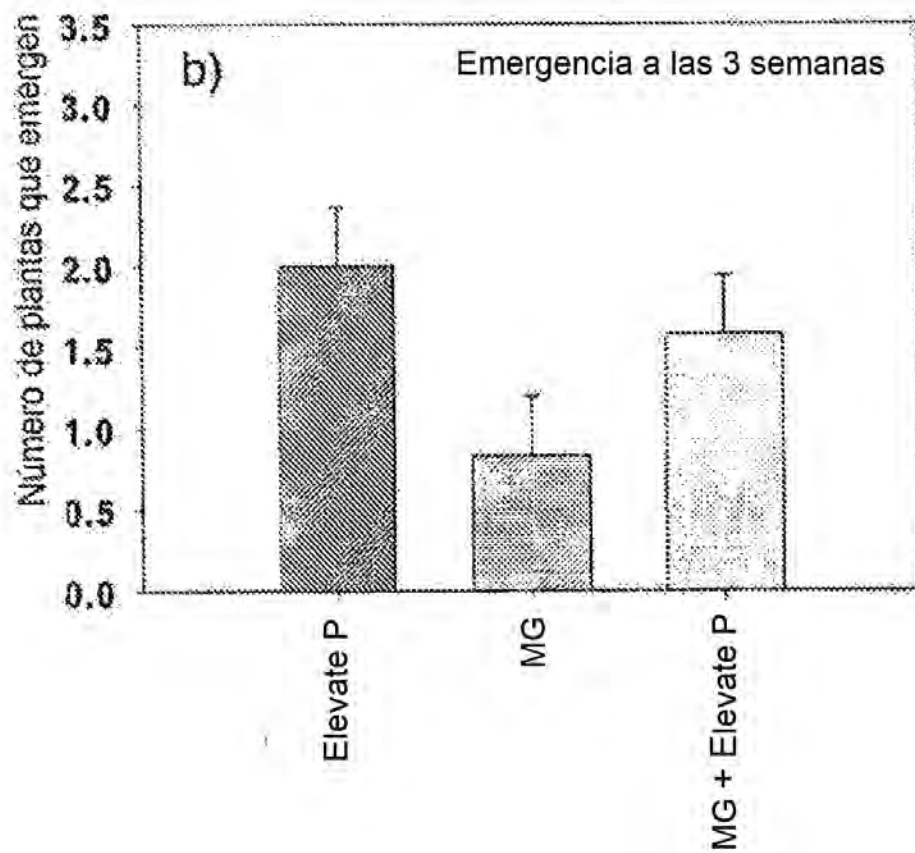


Fig 13B

Tomate - Brandywine

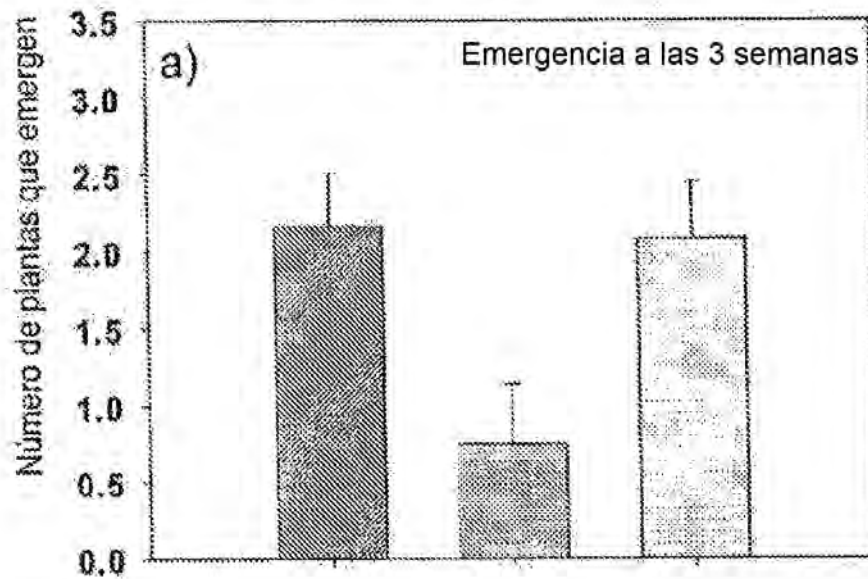


Fig 14A

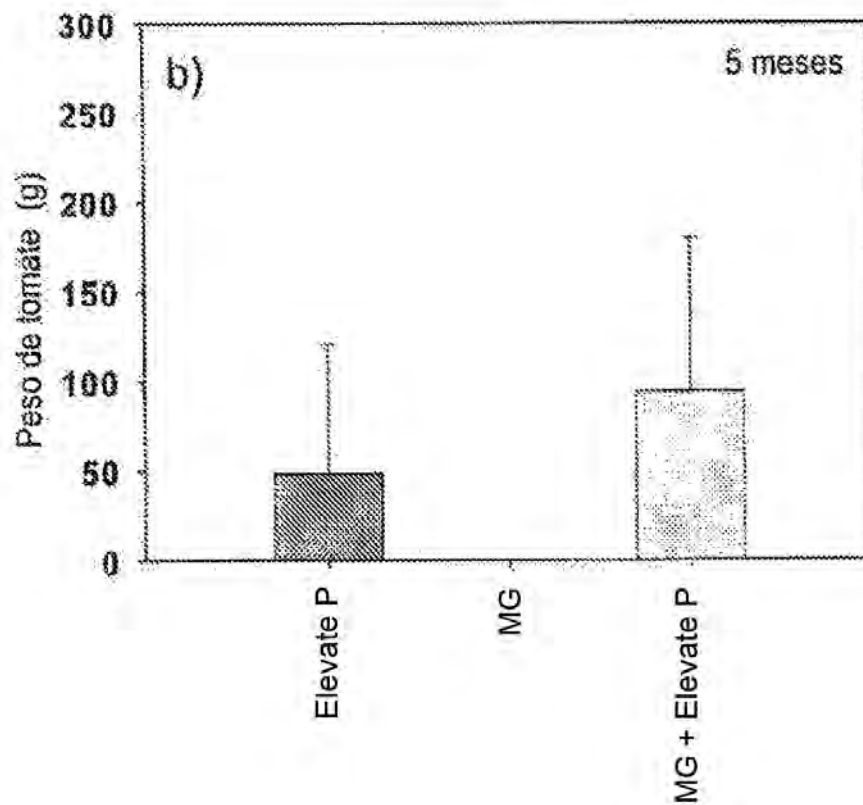


Fig 14B

Albahaca

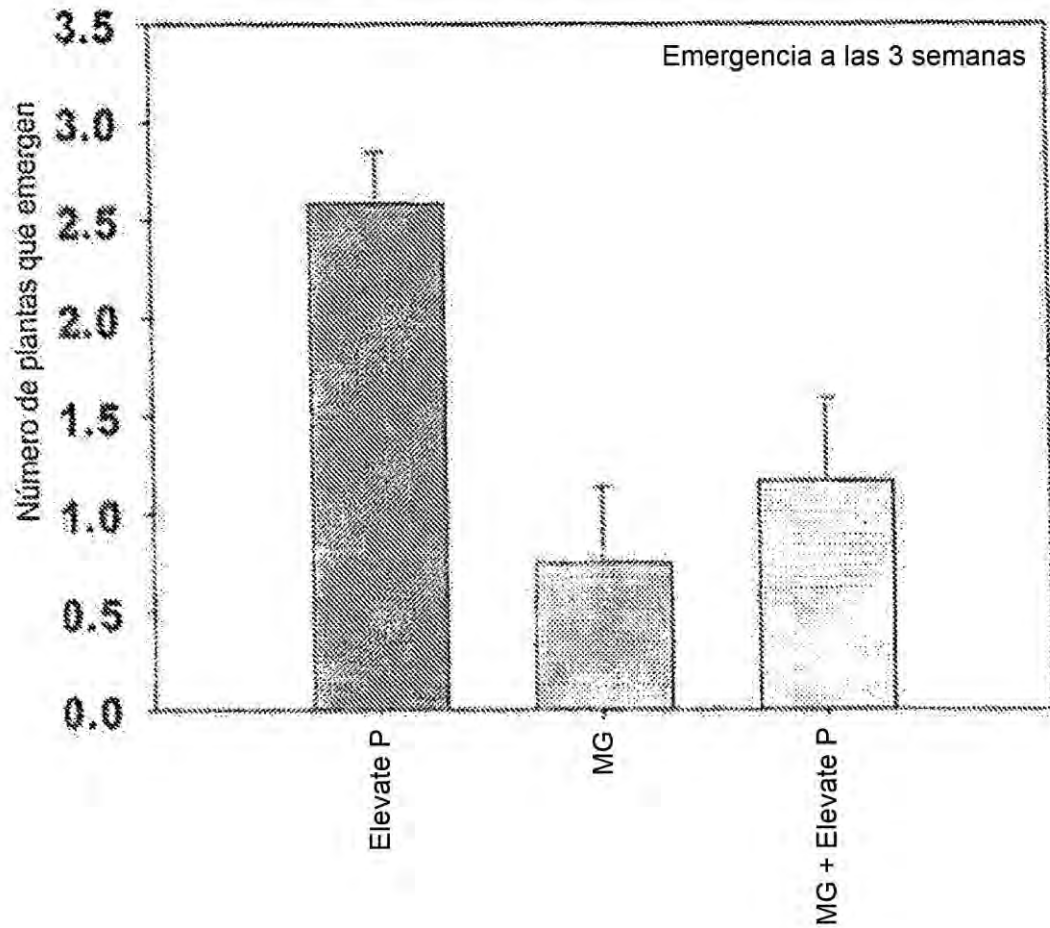


Fig 15

Caléndula

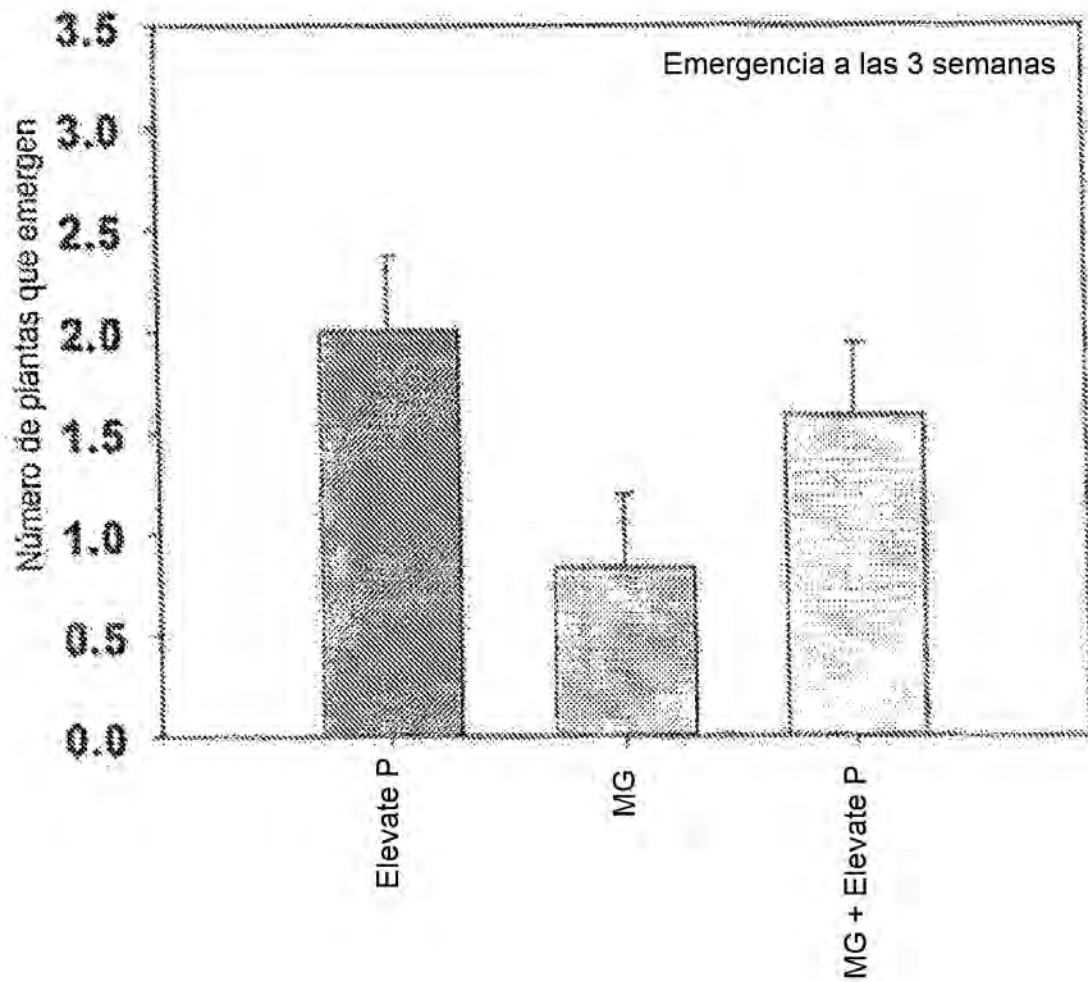


Fig 16

Tabla 4.1 Análisis elemental de hierba de césped demostró absorción mejor de nutrientes en la planta para varios macro y micronutrientes cuando se inocularon con bioestimulantes (tasas más altas se indican en negritas) *T = Tratamiento; M = Humedad*

T	M	P	Ca	Mg	Na	K	Al	Fe	Mn	Ti	Cu	Zn	Ni	Mo	Cd	Cr	Sr	B	Ba	Pb	Si	V
Agrostis																						
1	90.14	1.43	0.393	0.176	0.07	1.19	0.062	0.035	37.8	13.7	41.5	27	4.48	1.37	1.08	3.97	27.4	51.2	52	0.843	24.2	2.83
2	88.94	1.36	0.573	0.169	0.049	1.25	0.107	0.058	38.5	29.7	136	30.8	3.92	1.33	0.98	1.63	26.6	56.1	34.8	1.18	27.1	4.11
3	97.39	1.37	0.687	0.183	0.038	1.19	0.136	0.07	65.9	40.4	64.6	28.1	3.43	2.08	0.942	2.18	33.3	57.8	63.2	0.965	32.3	7.42
Pasto azul																						
1	81.38	1.74	0.694	0.231	0.045	1.57	0.196	0.117	45.5	55.5	28.4	32.7	5.78	0.89	1.58	2.3	30.9	83.2	70.5	1.256	29.3	8.63
2	95.27	2.2	0.328	0.16	0.038	1.04	0.03	0.022	26.4	8.01	26.7	43.3	4.07	0.69	0.983	1.26	30.1	30.5	84	0.801	33.8	4.27
3	88.68	1.82	0.508	0.178	0.028	1.32	0.056	0.034	23.6	17.1	30.5	32.9	4.32	0.7	1.29	2.17	27.3	48.1	60.3	0.581	28.4	6.45
Festuca																						
1	85.53	1.83	0.607	0.322	0.057	1.65	0.057	0.031	20.1	13.7	33.2	27.3	2.39	1.02	0.314	1.22	36.9	45.4	27.2	0.471	24.5	5.76
2	87.21	2.01	0.761	0.332	0.092	1.86	0.034	0.053	38.1	20.1	34.1	28	3.27	0.94	1.09	1.58	32.8	54.2	27.7	1.702	38.9	5.84
3	92.38	2.01	0.868	0.31	0.104	1.58	0.244	0.132	46.9	63	48.1	77.2	3.13	1.73	0.531	2.62	56.3	51.3	42.0	1.398	35.8	13.1
Ballica																						
1	87.2	1.89	0.843	0.221	0.064	1.51	0.042	0.025	46.2	12.3	36.7	31.5	3.91	1.09	0.668	1.72	37.6	56.8	48.6	0.842	23.4	6.68
2	81.64	1.91	0.671	0.193	0.108	1.18	0.065	0.038	56.8	16.5	146	71.4	4.48	1.01	0.734	2.39	30.3	60.4	48.3	1.102	21.7	6.9
3	90.42	1.83	0.894	0.208	0.039	1.35	0.09	0.057	55.1	28.5	35.3	28.2	2.97	1.1	0.712	1.72	22.3	53.4	57.6	0.923	22.8	9.45
Consortios microbianos que movilizan P de la presente descripción																						
Tratamiento 1																						
Tratamiento 2																						
Tratamiento 3																						
Medio estéril correspondiente al tratamiento 1 (usando 0.2 µM) sin actividad microbiana																						
Fertilizante vegetal inorgánico común rico en nutrientes usado como control (solución Hoagland)																						

Fig 17

Tabla 4.2 Análisis elemental de nutrientes en suelo demostró niveles más altos de macro y micronutrientes cuando se inocularon con bioestimulantes (tasas más altas se indican en **negrita**) *T = Tratamiento*

T	pH	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Zn	Cu	Mn	Mo	Co	Cr	Sr	Ba	Pb	As	V
Agrostis																		
1	0.013	1.5	1.09	0.323	0.224	0.23	0.613	0.245	4	16.7	5.3	0.13	0.255	2.55	22.9	61.4	5.42	89.1
2	0.016	0.22	1.01	0.305	0.213	0.79	0.375	0.239	0.32	15.5	5.05	0.12	0.337	3.55	51.4	57.3	4.85	35.2
3	0.025	1.53	0.3	0.293	0.202	0.76	0.542	0.27	0.04	18	4.33	0	0.232	3	29.3	53.5	4.81	57.3
Pasto azul																		
1	0.012	1.4	1.22	0.411	0.304	1.11	0.609	124	354	22.3	6.72	0.54	0.473	6.409	36.5	88.1	7.33	15.2
2	0.038	1.7	1.04	0.343	0.253	0.91	0.422	36.3	242	17.5	5.33	0.22	0.251	4.51	32.2	61.4	4.69	72.5
3	0.035	1.6	1.37	0.366	0.26	0.96	0.549	115	282	18.8	6.34	0.22	0.433	3.83	37.7	73.8	7.11	75.2
Festuca																		
1	0.018	1.3	0.97	0.327	0.237	0.33	0.621	34.5	330	17.2	5.73	0.24	0.353	4.23	28.2	81	4.79	74.5
2	0.018	1.04	1	0.356	0.23	0.32	0.677	103	445	13.4	5.87	0.27	0.376	3.27	69.2	5.94	70.8	13.4
3	0.02	1.36	1.08	0.379	0.273	1.01	0.725	102	524	20.2	6.47	0.41	0.434	4.41	32.8	73.1	6.23	37.5
Ballica																		
1	0.027	1.73	1.51	0.438	0.309	1.24	1.047	170	905	19.3	9.2	0	0.607	5.46	82.5	102	9.24	178
2	0.022	1.6	1	0.355	0.253	0.97	0.553	107.5	502	10.3	6.01	0.31	0.307	3.35	91.3	70.5	6.58	80.8
3	0.024	1.53	1.43	0.427	0.347	1.12	0.77	122	511	12.3	7.35	0.34	0.422	3.41	45.3	82	6.38	51.5
Suelo sin vegetación																		
1	0.017	2.02	0.9	0.32	0.237	0.36	0.665	101	393	16.8	5.23	0.25	0.267	3.32	27.9	61.3	6.83	10.3
2	0.016	2	0.86	0.318	0.229	0.33	0.607	97	302	18.7	5.33	0.32	0.32	3.32	27	65.7	5.22	32.7
3	0.022	2.08	1.08	0.327	0.255	0.33	0.723	102	436	18.3	5.75	0.26	0.44	4.34	32.9	67.2	6.23	10.2

Fig 18

Tratamiento 1	Consortio microbiano que moviliza P de la presente descripción
Tratamiento 2	Medio estéril correspondiente al tratamiento 1 (empleando 0.2 µM) sin actividad microbiana
Tratamiento 3	Fertilizante vegetal inorgánico común rico en nutrientes usado como control (solución de Hoagland)

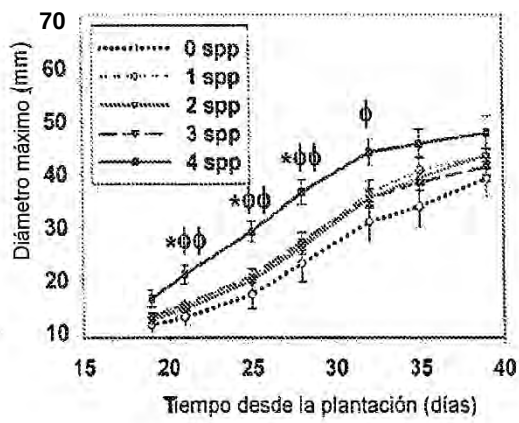


Fig 19A

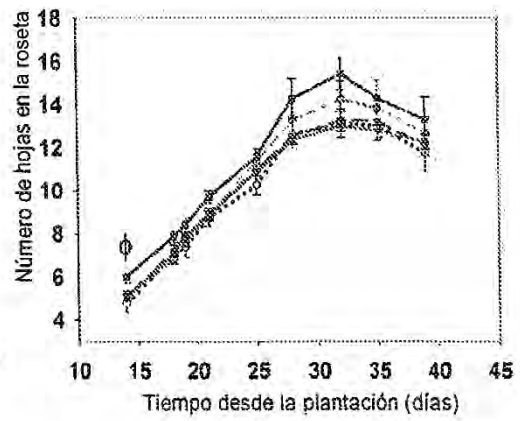


Fig 19B

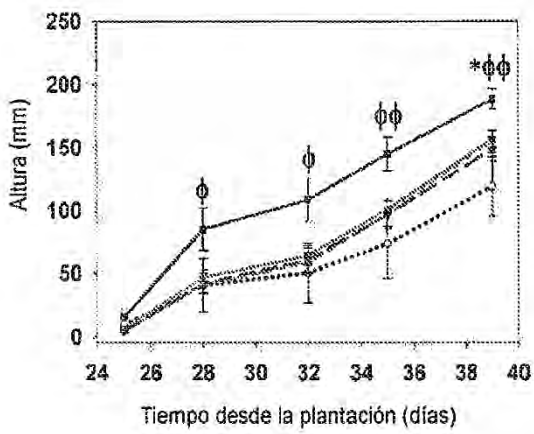


Fig 19C