



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0811002-6 B1



(22) Data do Depósito: 29/04/2008

(45) Data de Concessão: 27/09/2022

(54) Título: MÉTODO PARA ESTIMULAR O CRESCIMENTO E O DESENVOLVIMENTO FENOLÓGICO DE PLANTAS

(51) Int.Cl.: C05F 11/08.

(30) Prioridade Unionista: 30/04/2007 CU 2007-0092.

(73) Titular(es): CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGIA.

(72) Inventor(es): JESÚS MENA CAMPOS; EULOGIO PIMENTEL VÁZQUEZ; MARIETA MARÍN BRUZOS; ARMANDO TOMÁS HERNÁNDEZ GARCÍA; ILEANA SÁNCHEZ ORTIZ; YAMILKA RAMÍREZ NÚÑEZ; SONIA GONZÁLEZ BLANCO; MARIANELA GARCÍA SIVERIO; CARLOS GUILLERMO BORROTO NORDELO.

(86) Pedido PCT: PCT CU2008000002 de 29/04/2008

(87) Publicação PCT: WO 2008/131699 de 06/11/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 28/10/2009

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO BIOFERTILIZANTE A presente invenção refere-se a uma composição para estimulação do desenvolvimento de plantas compreendendo pelo menos uma linhagem Tsukamurella paurometabola, um agente biofertilizante que otimiza o uso e material orgânico pelas, facilitando a assimilação de nitrogênio e fósforo. O dito agente pode aumentar o crescimento e desenvolvimento de plantas quando aplicado diretamente ao solo ou a um substrato natural ou artificial contendo um material orgânico, ou quando aplicado a qualquer tipo de solo ou substrato contendo um complemento orgânico.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para " **MÉTODO PARA ESTIMULAR O CRESCIMENTO E O DESENVOLVIMENTO FENOLÓGICO DE PLANTAS** ".

CAMPO DA TÉCNICA

[001] A presente invenção – dentro do ramo de microbiologia do solo – refere-se a uma nova aplicação de biofertilizantes microbianos que são capazes de favorecer e estimular crescimento em plantas sem afetar o ambiente.

TÉCNICA ANTERIOR

[002] Biofertilizantes são definidos como produtos baseados em micro-organismos que geralmente vivem no solo. Ao aumentar sua população através de inoculação artificial, a resposta é que esses micro-organismos reforçam sua atividade biológica. Então, fornecimento das plantas com nutrientes importantes que aumentam seu crescimento. Ainda, os micro-organismos são acreditados fornecer às plantas substâncias hormonais que são essenciais para seu desenvolvimento (Martínez, J. S. e outros, 1985, "Manual Práctico de Microbiologia". Ed: Pueblo y Educación, Cuba).

[003] Vários estudos foram realizados sobre este tema, particularmente sobre um grupo de micro-organismos bem conhecidos que será analisado a seguir:

[004] É estimado que a fixação simbiótica de nitrogênio, inerente ao *Rhizobium*, seja um dos meios mais prováveis de recuperar nitrogênio e retornar para o ecossistema. Foi calculado que 175 milhões de toneladas de nitrogênio por ano são biologicamente fixadas; das quais 70% vão para o solo (Burity, H.A. e outros, 1989. "Estimation of nitrogen fixation and transfer from alfalfa to associated grasses in mixed swards under Field conditions". *Plant and Soil*, 114:249-255). Cinquenta por cento dessa fixação vêm de associações nodulares como aquelas

causadas por *Rhizobium* (Carrera, M. e outros, 2004, "Nodulación natural en leguminosas silvestres del Estado de Nuevo León").

[005] A fixação simbiótica de nitrogênio acontece quando as bactérias (*Rhizobium*) reconhecem seu hospedeiro causando sua infecção através dos pelos radiculares e na matriz das células corticais, induzindo então meiose e mitose aceleradas. Isto leva a um tecido superatrofiado: "o nódulo", uma estrutura típica das raízes de leguminosas. Dentro deste nódulo o *Rhizobium* perde sua parede celular e se torna um bacteróide que devido à ação da sua enzima nitrogenase fixa nitrogênio (N_2), transformando-o em amônio (NH_3), este último sendo transferido para o ribossoma vegetal para a síntese de proteína. Ao mesmo tempo, por meio da fotossíntese, o CO_2 é reduzido em carboidratos pela planta leguminosa, que vai servir como uma fonte de carbono e energia para o *Rhizobium*, então ele é mantido ativo no nódulo satisfazendo então a necessidade de nitrogênio das plantas (Bauer, T., 2001, "Micro-organismos Fijadores de Nitrógeno: familia Rhizobiaceae". Em:

<http://www.microbiologia.com.ar/suelo/rhizobium.html>). Isto constitui a associação mais elaborada e eficiente entre plantas e micro-organismos. É por esse motivo que ela tem sido estudada amplamente até agora.

[006] Bactérias do gênero *Azotobacter* formam um grupo de micro-organismos de fixação de nitrogênio especial. Em vista que eles são os únicos unicelulares e aparentemente capazes de fixar nitrogênio em condições aeróbicas (Andresson, A.J. e outros, 1994. "Effecto de la inoculación con *Azotobacter* y MVA en vitroplantas de ñame (*Dioscorea alata*"). Cultivos Tropicales, 15 (3): 66). Do ponto de vista histórico, é o *Azotobacter*, na verdade, o micro-organismo mais amplamente usado na agricultura. A primeira aplicação desta bactéria data de 1902, obtendo grande utilização durante as décadas de 40, 50 e 60,

particularmente nos países da Europa oriental (González, J. e Llunch, C., 1992. "Biología del Nitrógeno. Interacción Planta-Micro-organismo". Ed. Rueda, Madrid. España).

[007] Outros micro-organismos biofertilizantes são feitos de várias linhagens do gênero *Pseudomonas*, que contribuem para o aumento da biodisponibilidade do fósforo alcançável (Lawrence, A.R., 2002. *Biofertilizers for rice cultivation*. Agricultural Universities of India. Em:

<http://www.hinduonnet.com/thehindu/seta/2002/04/04/stories/2002040400120400.htm>).

[008] A aplicação combinada de três espécies de bactérias: *Bacillus pumilus* Meyer e Gothei, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn e *Curtobacterium flaccumfaciens* (Hedges) Collins e Jones, a sementes de pepino (*Cucumis sativus*, L.), proveu resultados melhores comparado com a inoculação de cada uma separada (Raupach, G.S. e Kloepper, J.W., 1998. "Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens". *Phytopathology*, 88:1158-1164). O efeito positivo das linhagens do fungo micorrizogênio, em combinação com *Azotobacter* sp. e húmus de minhoca da terra, sobre o crescimento de mudas de café (*Coffea arabica*) foi relatado. A combinação de *Glomus fasciculatum* e *Glomus peúú* com *Azotobacter* passou a ser superior aos tratamentos controle (Sánchez, C. e outros, 1994. "Utilización de lãs Micorrizas VA y *Azotobacter* sp. en la producción de posturas de *Coffea arabica* L.". *Cultivos tropicales*, 15 (3):69).

[009] No cultivo de tomates, acelga, alface, vagem e rabanete, essas foram inoculadas com *Glomus* sp. e *Azotobacter*, resultados positivos corroboraram a eficácia desta combinação que mostra claramente que ambos os organismos reagiram de um modo sinérgico (quando eles foram adicionados simultaneamente) (Terry, E. e outros, 2000. "Efectividad de *Azotobacter chroococcum* y HFMA em diferentes

cultivos hortícolas en condiciones de organopónico". XII Seminario Científico, Programa y Resúmenes. La Habana. INCA, 1170.

[0010] A atividade nematocida da linhagem *Tsukamurella paurometabola* C-924 foi previamente descrita como um controle útil contra parasitas de ambos os animais e plantas (Mena, J. e outros, Patente EP 0774906 B1). O controle biológico de nematóides é uma alternativa eficaz ao uso de pesticidas químicos na agricultura. O mecanismo de ação deste bionemática foi relacionado ao efeito combinado de atividades de dessulfurase e quitinase sobre os nematóides e seus ovos. Até agora, nenhuma influência benéfica sobre plantações foi conhecida, a não ser a derivada de sua ação direta sobre nematóides.

[0011] Embora o efeito rápido de fertilizantes químicos sobre o crescimento de planta seja um fato, eles causam distúrbios nutricionais às plantas mais efeitos colaterais negativos ao solo. Por causa disso a obtenção de novos biofertilizantes é uma necessidade. Eles têm como objetivo a promoção do crescimento e desenvolvimento de plantas sem causar consequências prejudiciais indesejadas, ou ao ambientes ou às pessoas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0012] A presente invenção tem como objetivo resolver o problema acima mencionado ao prover uma composição biofertilizante que compreende pelo menos uma linhagem de *Tsukamurella paurometabola*, ou um mutante derivado dela, ou um metabólito derivado de tal linhagem, em um carreador apropriado. Tudo isso tem o efeito de estimular o crescimento e desenvolvimento fenológico de plantas. Ainda, a presente composição contribui para o aumento da fertilidade de solo, criando as condições para um desenvolvimento de plantas mais favorável.

[0013] Em uma modalidade básica da mesma, a composição

biofertilizante compreende as bactérias conhecidas como linhagem *Tsukamurella paurometabola* C-924 (Mena, J. e outros, 2003. *Biotecnologia Aplicada* 20(4):248-252) cuja capacidade em influenciar positivamente a fenologia em várias espécies de plantas cultivadas é claramente demonstrada. Consequentemente, com base nos resultados obtidos, é possível estabelecer um método para estimular o desenvolvimento de plantas através de um biofertilizante a ser usado em agricultura que ajuda as plantas a otimizar a aquisição de matéria orgânica, favorecendo então a apropriação de nitrogênio e fósforo, elementos relacionados com a atividade da linhagem *T. paurometabola* C-924 no solo ou em um substrato natural ou artificial. Eventualmente, a aplicação de fertilizantes químicos é reduzida ou eliminada. Apesar do efeito imediato que os fertilizantes exercem sobre o desenvolvimento de planta, eles causam outros distúrbios nutricionais e efeitos colaterais indesejados.

[0014] O efeito de bioestimulação de *T. paurometabola* em plantas é gerado pela produção de amoníaco (NH_3), associado com o crescimento desta bactéria interagindo com a matéria orgânica e amino ácidos presentes no solo ou substrato onde as plantas são cultivadas, ou na matéria orgânica e amino ácidos adicionados a qualquer mistura, aplicados simultaneamente ou em combinação com esta bactéria. Ao mesmo tempo, este micro-organismo participa na solubilização de fósforo, então mudando-o de não-absorvível para absorvível pelas plantas.

[0015] A aplicação da linhagem *T. paurometabola* C-924 ao solo, sobre um carreador substrato (natural ou artificial) ou uma matéria orgânica e/ou amino ácidos, é feita por meio de uma suspensão celular tendo entre $1,0 \times 10^7$ unidades de formação de colônia (cfu)/ml e $5,0 \times 10^{12}$ cfu/ml ou através de um pó concentrado de aproximadamente 10^{12} CFU/g de composição.

[0016] A composição contendo a linhagem *T. paurometabola* C-924 (carreada pela matéria orgânica, amino ácidos e outros carreadores orgânicos), aplicada em combinação com outros biofertilizantes e bioestimuladores, ou independentemente, aumenta o desenvolvimento de plantas de maneira similar a ou até mesmo melhor que outros micro-organismos de promoção de crescimento de plantas usados na agricultura.

[0017] Com os resultados obtidos, pode ser estabelecido um método para estimular o crescimento de plantas com base no uso de um agente biofertilizante para uso agricultura que otimiza a aquisição de matéria orgânica pelas plantas, o que favorece a assimilação de nitrogênio e fósforo, elementos ligados à atividade da linhagem *T. paurometabola* C-924 aplicada ou ao solo ou a um substrato natural ou artificial.

[0018] Em outra modalidade da presente invenção, o metabolito compreendido na composição de biofertilizante pode ser obtido de uma maneira ou natural, recombinante ou sintética. A composição de biofertilização da dita invenção pode ter vários tipos de carreadores, tais como: um fertilizante orgânico, um solo pré-embalado, uma cobertura de semente, um pó, uma formulação granulada, um nebulizador, um líquido, uma suspensão ou qualquer uma das variantes acima mencionadas em uma forma encapsulada.

[0019] Em outra modalidade da presente invenção, a linhagem *T. paurometabola* é combinada ou misturada com outros micro-organismos biofertilizantes, tais como: *Bacillus subtilis*, *Rhizobium leguminosarum*, *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Glomus fasciculatum* e *Glomus clarum*, ou um mutante derivado de tais organismos, bem como outros princípios ativos ou metabolitos obtidos de tais linhagens, através de uma maneira ou natural, recombinante ou sintética, em um carreador adequado.

[0020] É também um objetivo da presente invenção um método para estimular o crescimento de plantas, caracterizado por compreender: a) obtenção de um agente biofertilizante que compreende uma cultura de uma linhagem *Tsukamurella paurometabola* ou um metabolito derivado de tal linhagem, obtido através de modo natural, recombinante ou sintético; e b) contato do solo de um substrato ou natural ou um artificial com uma quantidade eficaz de tal biofertilizante ou de um metabólito derivado desta linhagem. Em uma modalidade da invenção, o método descrito acima é caracterizado pelo fato da linhagem *Tsukamurella paurometabola* ser a linhagem C-294. A quantidade eficaz do agente biofertilizante é aplicada ao solo ou substrato em uma suspensão aquosa em uma concentração de aproximadamente entre 10^6 e 10^9 cfu por mililitro de suspensão, e o agente biofertilizante é aplicado pelo menos uma vez ao solo ou misturado com o substrato.

[0021] O agente biofertilizante e o método de estimulação do crescimento de planta da presente invenção são eficazes para plantas de produção de alimento empregadas com o objetivo de obtenção de alimento para seres humanos, tais como frutas e vegetais, ou para plantas obtidas para alimentação de animais, tais como, pasto, cereais, etc. Eles são também aplicáveis a plantas ornamentais.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0022] Figura 1. Cinética da formação de amoníaco durante a cultura de *T. paurometabola* C-924 em um biorreator de 5 L. A temperatura de trabalho era 28°C e o pH inicial era de 7,0 com um agitação de 500 rpm.

[0023] Figura 2. Correlação resultante do amoníaco acumulado e do peso seco da biomassa produzida no biorreator de 5 L sob as ditas condições.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Amoníaco produzido pela linhagem *T. paurometabola* C-924, cultivada em um biorreator de 5L

[0024] Uma vez criadas as condições, o processo de cultivo da linhagem *T. paurometabola* C-924 em um biorreator de 5 L foi iniciado. A temperatura foi ajustada em 28°C em uma velocidade de agitação de 500 rpm. As amostras de meio de cultura foram obtidas em intervalos de tempo diferentes durante o processo de fermentação (2, 4, 6, 8, 10, 12 e 13 horas). Cinco mL de cada amostra (três vezes) foram centrifugados e filtrados através de um filtro de 0,2 µm. A mistura filtrada foi submetida à análise de amônio de acordo com o Método Reagente de Nessler. Para sua determinação espectrofotômetro, o espectrofotômetro Pharmacia Biotech foi usado, com um comprimento de onda de 450 nm.

[0025] A produção de amoníaco durante a cultura da *Tsukamurella paurometabola* linhagem C-924 é representada na figura 1, onde a cinética na formação de amoníaco no biorreator de 5 L (até 14 horas de cultura) é mostrada. A temperatura de trabalho era de 28°C, e o pH inicial era de 7,0. A produção de amoníaco, foi notado, estava associada com o crescimento da C-924, que mostra a desaminação oxidativa do organismo de uma maneira constitutiva na presença de substrato de amino ácido. O aumento do pH (com o tempo) era notável quase atingindo o valor de 9,0, e a concentração de NH₃ de até 934 µg/ml. Então, a linhagem C-924 de *T. paurometabola* pode ser considerada como uma produtora de muito amoníaco comparado com outros micro-organismos (Hoffmann, T., 1998. "Ammonification in *Bacillus subtilis* utilizing dissimilatory nitrate reductase is dependent on resDE". *Journal of Bacteriology*, vol. 180,1:186-189; Takahasi, N., 2000. "Metabolic Pathways for cytotoxic end product formation from glutamate and a aspartate containing peptides by *Porphyromonas gingivalis*". *Journal of Bacteriology*, vol. 182, 17:4704-4710).

[0026] A produção de NH_3 deve ser sustentada pelo processo de desaminação oxidativa sofrido pelos amino ácidos que participam do meio de cultura (Vanhook, J.L. e outros, 1999. "Phenylalanine dehydrogenase from *Rhodococcus* sp. M4: high-resolution X-ray analysis of inhibitory ternary complexes reveal key features in the oxidative deamination mechanism. *Biochemistry*", 38: 2326-2329; Paustina, T., 2001. *Microbiology Webbed Out*. University of Wisconsin, Madison). É importante destacar que por meio deste processo, os amino ácidos são desaminados dando amoníaco e um resíduo de carbono (um α -acetoácido), como mais carbono energético do que nitrogênio assimilável é necessário, geralmente acontece acúmulo de amoníaco no meio (Salle, A. J., 1966. *Bacteriologia*, Edición Revolucionaria, La Habana, Cuba). Presumivelmente, este mecanismo se encaixa no que aconteceu no processo de acúmulo de amoníaco pela linhagem *Tsukamurella paurometabola* C-924.

[0027] Na figura 2 é mostrada a correlação experimental entre os níveis de amoníaco no meio extracelular e a concentração celular expressa como um peso seco para a biomassa produzida no biorreator de 5 L. Uma relação linear acontece entre ambas as variáveis, o que indica uma produção de NH_3 associada com o crescimento de micro-organismo cuja velocidade é constante com relação à concentração de biomassa.

Biomassa: Solubilização de fosfato pela linhagem *Tsukamurella paurometabola* C-924.

[0028] O fósforo é um dos principais nutrientes para o desenvolvimento de plantas, mas na maioria dos casos ele é encontrado em uma forma insolúvel no solo. Uma alta porcentagem do fosfato inorgânico aplicado ao solo como fertilizante é rapidamente imobilizada após a aplicação e é mantida pelas plantas de uma maneira não-disponível. Consequentemente, a liberação dessas formas insolúveis de

fosfato será importante para aumentar a disponibilidade deste elemento nos solos.

[0029] Com propósitos experimentais, a linhagem C-924 foi inoculada no meio NBRIP (Nautiyal, C., 1999. "An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms". *FEMS Microbiology Letters* 170: 265-270), útil na determinação de micro-organismos de solubilização de fosfato. Ele foi incubado a 30°C durante 10 dias. Tendo passado todos esses dias, o halo transparente característico deste meio apareceu.

[0030] Foi demonstrado que vários isolamentos que não mostram nenhum halo no meio sólido ou que formam um halo muito pequeno são capazes de solubilizar fosfatos insolúveis em meios líquidos (Leyval, C. e Barthelin, J., 1999, *Plant Soil*, 17: 103-110). Por esta razão, o teste foi realizado em um meio líquido. Como um controle positivo, *Pseudomonase aeruginosa* ATCC 25922 foi empregada.

[0031] As duas linhagens foram inoculadas separadas no meio líquido NBRIP e elas foram incubadas a 30°C com agitação a 180 rpm por cinco dias. Ainda, um meio estéril (não-inoculado) foi usado a fim de validar o teste. As amostras foram analisadas a cada 24 horas. As culturas de cada amostra foram centrifugadas a 3000 rpm por 25 minutos e o sobrenadante foi filtrado com um filtro de 0,45 µm. Para cada caso, a concentração de fosfato solúvel foi estabelecida, o método Fiske e Subbarow foi usado (Fiske, H. e Subbarow, Y., 1925. "The colorimetric determination of phosphorus". *J. Biol. Chem.* 66:375-400). Os dados são mostrados na tabela 1. Embora ambos os micro-organismos mostrassem a capacidade em solubilizar fosfatos, a linhagem *Tsukamurella paurometabola* C-924 provou ser mais eficiente.

TABELA 1. Resultados da medição de solubilização de fosfato em linhagens estudadas

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

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

[0032] Um "Solo Marrom Macio Médio-Carbonado " foi escolhido (Instituto de Suelos, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministerio de la Agricultura. Editorial AGRINFOR, Cuba). O dito solo foi peneirado em uma peneira de 0,5 cm (diâmetro) para eliminar partículas indesejáveis. 5% de humus de minhoca da terra foram aplicados ao solo a fim de aumentar o teor orgânico do solo acima de 3% de matéria orgânica lábil e 12% de matéria orgânica total.

[0033] Em seguida, potes de 15 cm de diâmetro superior e 1,0 L de capacidade foram cheios, para serem usados nos experimentos de atividade biológica. Mudanças de tanchagem (híbrido de *Musa sp.*, cultivar "Macho") de cultura de tecido *in vitro* foram plantadas nos ditos potes. para cada um dos tratamentos que seguem, 10 réplicas foram usadas:

[0034] Controle: Meio Luria Bertani (LB) + H₂O em uma concentração de 1/1000, aplicado para uma razão de 50 mL/pote.

[0035] Linhagem *Bacillus subtilis* F 16/95 [ajustar para 1x10⁷ esporos/mL), aplicada para uma razão de 50 mL/pote.

[0036] Linhagem *Tsukamurella paurometabola* C-924 [ajustar para 1x10⁷ cfu/mL], aplicada para uma razão de 50 mL/pote.

[0037] Depois de três meses do experimento começar, a avaliação

final foi feita direcionada a esses parâmetros: peso da folhagem, peso das raízes e a soma total, dada em gramas. O experimento foi realizado em uma estufa sob condições semicontroladas. A Análise de Variância (ANOVA) foi aplicada aos dados resultantes dos pesos. A fim de encontrar os tratamentos onde as diferenças significantes se encontrassem ($p < 0,05$), teste de faixas múltiplas Tukey foi aplicado. Além disso, o programa SYSTAT 7.0 para Windows foi aplicado para realizar os cálculos estatísticos. Três meses após o transplante e aplicação dos tratamentos, os resultados foram como segue:

TABELA 2. Média das medições em 10 plantas

Peso (gramas)	Controle	C-924	F 16/95
Raízes	3,3 ^b	26,8 ^a	30 ^a
Folhagem	10,9 ^b	47,9 ^a	59,4 ^a
Total	14,2 ^b	74,7 ^a	89,4 ^a

[0038] Valores médios com letras diferentes diferem entre eles significativamente, de acordo com o teste de faixa múltipla de Tukey, para $p \leq 0,05$.

[0039] Ambos os micro-organismos usados eram capazes de reforçar o crescimento de plantas de tanchagem. Diferenças em crescimento entre os tratamentos com a linhagem *T. paurometabola* C-924 e linhagem *Bacillus subtilis* F16/95 (como a bactéria controle positivo) não foram notadas. A última é bem conhecida por aumento de crescimento de plantas (Mc Spadden, B. B. e Fravel, D., 2002. *Biological Control of Plants Pathogens: Research, Commercialization and Application in the USA*. Em:

http://www.phcmexico.com.mx/apsnet_biological_control.html).

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

[0040] Um "Solo Marrom Macio Médio-Carbonado" (Instituto de Suelos, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministerio de la Agricultura. Editorial AGRINFOR, Cuba). O dito solo foi peneirado em uma peneira de 0,5 cm (diâmetro) para eliminar partículas indesejáveis. 5% de humus de minhoca da terra foram aplicados ao solo a fim de aumentar o teor orgânico do solo acima dos 3% de matéria orgânica lábil e 12% de matéria orgânica total.

[0041] Em seguida, potes de 15 cm de diâmetro superior e 1,0 L de capacidade foram cheios, para serem usados nos experimentos de atividade biológica. Muda de banana (híbrido *Musa sp.*, cultivar Cavendish) da cultura de tecido *in vitro* foram plantadas nos ditos potes. Para cada um dos tratamentos que seguem, 10 réplicas foram usadas:

1- Controle: Meio Luria Bertani (LB) + H₂O em uma concentração de 1/1000 aplicado para uma razão de 50 mL/pote.

2- Linhagem *Bacillus subtilis* F16/95 [ajustar para 1×10^7 esporos/mL] aplicada para uma razão de 50 mL/pote.

3- Linhagem *Tsukamurella paurometabola* C-924 [ajustar para 1×10^7 cfu/mL] aplicada para uma razão de 50 mL/pote.

[0042] Depois de cinco meses do início do experimento, a avaliação final foi feita se direcionando a esses parâmetros: peso da folhagem, peso das raízes e a soma total, dada em gramas. O experimento foi realizado em uma estufa sob condições semicontroladas. A Análise de Variância (ANOVA) foi aplicada aos dados resultantes dos pesos. A fim de encontrar os tratamentos onde diferenças significantes se encontrassem ($p < 0,05$), teste de faixas múltiplas foi aplicado. Além disso, o programa SYSTAT 7.0 para Windows foi aplicado para realizar os cálculos estatísticos. Cinco meses após o transplante e aplicação dos tratamentos, os resultados foram como segue:

TABELA 3. Médias para medições em 10 plantas

Peso (gramas)	Controle	C-924	F 16/95
Raízes	25,06 ^b	31,34 ^a	36,04 ^a
Folhagem	42,48 ^b	65,12 ^a	63,32 ^a
Total	67,54 ^b	96,46 ^a	99,36 ^a

[0043] Valores médios com letras diferentes diferem entre eles significativamente, de acordo com o teste de faixas múltiplas de Tukey, para $p \leq 0,05$.

[0044] Como no exemplo 3, os dois organismos sendo aplicados relataram um crescimento significativo nas plantas de banana. Quaisquer diferenças entre os tratamentos com a linhagem C-924 e com a linhagem controle F 16/95 foram relatadas.

Exemplo 5. Efeito de *Tsukamurella paurometabola* C-924 sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas de soja (*Glycine max*)

[0045] Um solo "Vermelho Ferralítico" (Instituto de Suelos, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministerio de la Agricultura. Editorial AGRINFOR, Cuba). O dito solo foi peneirado em uma peneira de 0,5 cm (diâmetro) para eliminar partículas indesejáveis. Este solo tinha um teor de 2,6% de matéria orgânica lábil e 10,7% da matéria orgânica total.

[0046] Potes de 15 cm de diâmetro superior e 1,0 L de capacidade foram cheios, para serem usados nos experimentos de atividade biológica. Sementes de soja pré-germinadas foram usadas (*Glycine max*). As sementes foram plantadas em números de três em cada pote. Vinte potes com três plantas cada um foram empregados com os tratamentos que seguem:

1. Controle: Meio Luria Bertani (LB) + H₂O em uma concentração 1/1000 aplicado para uma razão de 100 mL/pote.

2. Linhagem *Tsukamurella paurometabola* C-924 [ajustar para 1×10^6 cfu/mL] aplicada para uma razão de 100 mL/pote.

[0047] Os tratamentos foram aplicados um dia antes da semeadura das sementes pré-germinadas. Então, sete dias após a semeadura delas, foi feita uma avaliação testando os parâmetros que seguem: o peso das raízes, caules e folhas foi monitorado bem como o peso total das plantas (dado em gramas). As plantas de 10 potes foram avaliadas (30 ao todo).

[0048] O experimento foi realizado em uma estufa sob condições semicontroladas. A Análise de Variância (ANOVA) foi aplicada aos dados resultantes dos pesos. A fim de encontrar os tratamentos onde diferenças significantes se encontrassem ($p < 0,05$), teste de faixas múltiplas de Tukey foi aplicado. Além disso, o programa SYSTAT 7.0 para Windows foi aplicado para realizar os cálculos estatísticos.

[0049] Os valores médios resultantes (por plantas) obtidos dos pesos líquidos para cada avaliação e sua significância são mostrados na tabela 4.

TABELA 4. Valores médios das medições em 30 plantas

Tratamento	Peso das raízes (g)	Peso dos caules (g)	Peso das folhas (g)	Peso da planta (g)
Controle	0,388	0,783	0,564	1,735
C-924	0,367	1,066	0,680	2,113

[0050] Após sete dias de crescimento, diferenças significantes entre as plantas foram notadas, tais como: aumento no peso líquido dos caules como nas folhas e no peso total das plantas. Consequentemente, a conclusão leva à declaração que o tratamento com a composição contendo a linhagem C-924 dá resultados satisfatórios no aumento do crescimento e desenvolvimento de plantas.

Exemplo 6. Efeito de *Tsukamurella paurometabola* linhagem C-924 sobre o crescimento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. variedade FA-180) em condições de muda

[0051] Deste modo, uma estufa adaptada para cultivo de mudas foi empregada. Como um substrato para a muda, uma mistura de humus

de minhoca da terra (50%), grama (25%) e Zeólito (25%) foi usada.

[0052] Dois tratamentos para o substrato foram aplicados ao solo, três dias antes do plantio das sementes pré-germinadas:

a) Um tratamento com uma suspensão concentrada ($5,0 \times 10^{11}$ cfu/mL) da linhagem *T. paurometabola* C-924 em uma razão de 20 mL por 100 kg de substrato. Uma bomba de pulverização manual foi usada com uma adição de 10 L de água para ajudar a tornar homogênea a distribuição de suspensão bacteriana.

b) Tratamento de controle onde apenas água foi usada.

[0053] No dia 22 de sua semeadura, quando as mudas estavam prontas para serem transplantadas, o peso de 40 plantas de cada tratamento foi medido. As plantas foram pegadas aleatoriamente, em 10 locais diferentes dentro do leito de semente. A tabela 5 mostra os valores de peso médios por plantas. Diferenças significantes ($p \leq 0,05$, ANOVA) foram observadas entre os tamanhos obtidos em ambos os tratamentos, uma influência clara da linhagem C-924 é observada. O efeito de aumento da dita linhagem foi substancial para as mudas de tomate no substrato com muita matéria orgânica.

TABELA 5. Média de medições em 40 plantas

Tratamentos das mudas	Médias de altura no dia 22 (cm)
C-924	16,22
Controle	13,57

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

[0054] Uma estufa (0,09 ha de superfície) com um "Solo Marrom Não-carbonado" (Instituto de Suelos, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministerio de la Agricultura. Editorial AGRINFOR, Cuba) foi usada. O dito solo tinha um teor de matéria lábil

de 3% e matéria orgânica total de 12%. Em seguida, a estufa foi separada em 16 lotes onde uma elaboração experimental foi ajustada com quatro tratamentos e a mesma quantidade de réplicas. O procedimento foi como segue:

- Tratamento com uma suspensão concentrada ($5,0 \times 10^{11}$ cfu/ml) de *T. paurometabola* linhagem C-924, em uma razão de 10L/ha aplicada através de um tratamento de irrigação. Isto foi feito sete dias antes de seu transplante.

- Tratamento com uma suspensão concentrada ($5,0 \times 10^{11}$ cfu/ml) de *T. paurometabola* linhagem C-924, em uma razão de 4L/ha, aplicada através do sistema de irrigação. Isto foi feito sete dias antes de seu transplante.

- Tratamento químico: Basamida (Dazomete) a 600 kg/ha.

- Controle (nenhum tratamento químico ou biológico).

[0055] Os dois tratamentos com a linhagem C-924 foram feitos por meio de uma bomba auxiliar ligada ao sistema de irrigação por gotejamento, com um resultado de irrigação total de 1L por metro quadrado de acordo com os parâmetros estabelecidos para irrigação em estufas (Casanova, A., 1999. "Guia técnica para la producción protegida de hortalizas en Casas de Cultivo Tropical con efecto de sombrilla". MINAGRI, Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova", Cuba).

[0056] Quinze dias após o transplante, os procedimentos de medição e contagem foram feitos (10 plantas por pote) incluindo os parâmetros que seguem:

- Altura das plantas (cm).
- Número de folhas por planta.
- Largura da base do caule (mm).
- Número de buquê de flores.
- Números de flores por planta.

[0057] A Tabela 6 mostra um sumário de resultados. Na realidade, foi claramente estabelecido que a altura, o número de folhas pequenas e o número de flores eram significativamente superiores em ambos os tratamentos (com duas doses diferentes) com a linhagem C-924. Então, as propriedades de aumento deste agente biofertilizante estão fora de qualquer dúvida.

TABELA 6. Valores médios de medições aplicadas a 10 plantas

Tratamento	Altura (cm)	Folhas pequenas	Largura (mm)	Buquês	Flores
C-924, 10 L/ha	36,39 ^a	8,78 ^a	10,33 ^a	1,15 ^{ab}	653 ^{ab}
C-924, 4L/ha	36,03 ^a	9,08 ^a	9,83 ^a	1,33 ^a	8,13 ^a
Controle	25,42 ^b	7,50 ^b	9,70 ^{ab}	1,03 ^{bc}	4,58 ^c
Bas. 600 Kg/ha	29,10 ^b	7,85 ^b	8,65 ^b	0,93 ^c	5,23 ^b

[0058] Valores médios com letras diferentes para cada parâmetro diferem significativamente de acordo com o Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

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

[0059] Cada tratamento incluía cinco réplicas e quatro plantas por réplica. Uma semente por leito foi plantada, atingindo quatro leitos por pote com uma profundidade de 3 cm nos potes de capacidade de 1 L. Para cada unidade ou pote experimental, 1,2 kg de "Solo Marrom Carbonado" (Instituto de Suelos, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministerio de la Agricultura. Editorial AGRINFOR, Cuba) foi usado, com uma matéria orgânica lábil de 3,74% e uma matéria orgânica total de 14,2%, mais fósforo solúvel: 19,14 mg de P_2O_5 /100 g de solo.

[0060] O experimento foi realizado em uma estufa sob condições semicontroladas. Os tratamentos foram como segue:

- 1- Controle sem nenhuma inoculação.

2- *T. paurometabola* linhagem C-924 inoculada sete dias antes do plantio e sete dias após plantio das culturas. A dose aplicada foi de 100 mL por pote com uma concentração de 1×10^9 cfu/mL.

3- *R. leguminosarum* foi inoculada (com uma concentração de $2,5 \times 10^8$ cfu/mL em uma formulação sólida) misturada com humus previamente peneirado. A quantidade atingiu 1 kg de biofertilizante por 45 kg de sementes.

4- Combinação dos tratamentos 2 e 3.

[0061] Seguindo as recomendações agroquímicas do "Instituto de Suelos" (Cuba), cada pote foi fertilizado de acordo com os teores no solo de P_2O_5 e K_2O . Os carregadores usados foram: Uréia, Super Fosfato Triplo (TSF) e Cloreto de Potássio (KCl), para nitrogênio, fósforo e potássio, respectivamente. Fertilização foi aplicada quatro dias antes do momento do plantio (no caso de fósforo e potássio) enquanto para Uréia, ela foi aplicada 15 dias após a germinação. Para o último cultivo, a quantidade aplicada foi 217 kg/ha. Enquanto para TSF, e KCl, fertilização atingiu o máximo de 11,5 kg/ha e 60 kg/ha, respectivamente.

[0062] As variantes fenológicas avaliadas foram o número de folhas a cada sete dias bem como seu peso seco (MINAG, 1988. Suelos. *Análisis Químico*. "Determinación de peso seco, materia orgánica y los índices del grado de acidez". NRAG. 892 y 878, Cuba). As variáveis foram estatisticamente avaliadas através de ANOVA (classificação simples). O teste comparativo múltiplo de Duncan foi utilizado a fim de comparar as médias de tratamento (valores médios). O pacote de estatística SPSS versão 8.0 (1997) foi aplicado resultando nas medições especificadas na tabela 7.

TABELA 7. Resultados derivados da aplicação de linhagens inoculadas nos parâmetros fenológicos no cultivo de feijões (*Phaseolus vulgaris* L.)

Tratamentos	Folhas, 36 dias	Peso seco (%), 43 dias
Controle	7,0 ^c	5,91 ^b
C-924	12,10 ^a	6,25 ^{ab}
Rhiz. leguminosarum	10,60 ^b	6,57 ^a
C-924+Rhiz.	10,10 ^b	6,62 ^a

[0063] Média com letras diferentes são significantemente diferentes entre elas mesmas (para cada medição) de acordo com o teste de faixas múltiplas de Duncan, $p \leq 0,05$.

[0064] Como para o número de folhas, os melhores resultados foram obtidos no dia 36 com a aplicação de *T. paurometabola* linhagem C-924. Diferenças significantes com o resto dos tratamentos foram claramente mostradas. No caso onde ambas as linhagens foram usadas, este parâmetro era similar ao tratamento com *R. leguminosarum*, no entanto para o controle, os resultados foram diferentes.

[0065] Com relação à porcentagem de matéria seca, os valores maiores foram relatados para a aplicação em conjunto das duas *T. paurometabola* linhagem C-924 e a *R. leguminosarum*. No entanto, estatisticamente falando, ela não diferiu dos tratamentos onde o biofertilizante foi aplicado e onde não foi inoculado (Controle). Este fato é devido à presença de linhagens nativas de *R. leguminosarum* no solo e seu efeito positivo sobre o crescimento do cultivo de feijões.

Exemplo 9. Comparação e interação de *T. paurometabola* linhagem C-924 com *Azotobacter chroococum* e *Pseudomonas fluorescens* no cultivo de milho (*Zea mais*)

[0066] Havia quatro réplicas para cada tratamento e quatro plantas para cada réplica. As sementes foram tratadas em uma profundidade

de 3 cm, que resultou em uma semente por leito. Cada pote (capacidade de 1L) tendo quatro leitos. Para cada pote experimental, 1,2 kg de "Solo Marrom Carbonado" foi usado. O último contendo 3,74% de matéria orgânica lábil (total 14%), fósforo solúvel de 19,14 mg de P_2O_5 /100 g de solo (Instituto de Suelos, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministerio de la Agricultura. Editorial AGRINFOR, Cuba).

[0067] O experimento foi realizado em uma estufa sob condições semicontroladas. Os tratamentos foram o que segue:

1. Controle sem inoculação.
2. *T. paurometabola* linhagem C-924: inoculada sete dias antes do plantio das sementes e sete dias após plantio, de acordo com as necessidades de aplicação de campo. A quantidade aplicada foi de 100 mL/pote com uma concentração de 1×10^9 cfu/mL.
3. *A. chroococcum* com uma concentração de $4,5 \times 10^{10}$ cfu/mL em uma formulação sólida, misturada com humus previamente peneirado. A dose usada foi de 2 kg/ha.
4. *P. fluorescens* com uma concentração de $2,7 \times 10^{10}$ cfu/mL em uma formulação sólida, misturada com humus previamente peneirado e uma dose de 2 kg/ha.
5. Combinação dos tratamentos 2 e 3.
6. Combinação dos tratamentos 2 e 4.

[0068] Cada pote teve sua fertilização necessária conforme requerido pelos teores de P_2O_5 e K_2O do solo e de acordo com a recomendação agroquímica feita pelo "Instituto de Suelos" (Cuba). Os carreadores usados foram: Uréia, Super Fosfato Triplo (TSF) e Cloreto de Potássio (KCl), para nitrogênio, fósforo e potássio, respectivamente. No caso de fósforo e potássio, a fertilização foi aplicada 4 dias antes do plantio das sementes, e para uréia, a fertilização foi aplicada 15 dias após o estágio de germinação. O cultivo de milho teve uma fertilização

aplicada em uma taxa de 185 kg/ha de uréia, 121 kg/ha de TSP e 45 kg/ha de KCl.

[0069] As variáveis fenológicas avaliadas foram o diâmetro do caule, a altura da planta, o número de folhas (contado a cada sete dias) e também o peso seco (MINAG, 1988. Suelo. Análisis Químico. "Determinación de peso seco, materia orgánica y los índices del grados de acidez". NRAG. 892 y 878, Cuba). A tabela 8 é uma soma dos resultados de medição.

TABELA 8. Dados resultantes após a aplicação das linhagens inoculadas sob os parâmetros fenológicos e a matéria seca na cultura de milho (*Zea mays* L.)

Tratamentos	Diâmetro do caule, 36 dias	No. de folhas, 36 dias	Altura (cm), 36 dias	Peso seco (%)
Controle	8,56 ^b	6,30 ^b	69,79 ^b	4,80 ^b
C-924	10,71 ^a	11,70 ^a	77,70 ^a	5,08 ^a
<i>Azotobacter</i>	8,84 ^b	6,80 ^b	71,70 ^{ab}	5,12 ^a
<i>Pseudomonas</i>	8,69 ^b	6,30 ^b	75,15 ^{ab}	5,25 ^a
C-924+Azoto.	10,09 ^a	7,10 ^b	77,05 ^a	5,10 ^a
C-924+Pseud.	10,70 ^a	7,20 ^b	69,20 ^b	5,16 ^a

[0070] Valores médios com letras diferentes diferem significativamente entre eles de acordo com o teste de faixas múltiplas de Duncan, $p \leq 0,05$.

[0071] Os melhores valores para cada um dos parâmetros fenológicos estudados foram conseguidos onde *T. paurometabola* linhagem C-924 foi aplicada, ou sozinha ou em combinação com outros estimuladores de crescimento. Como para o número de folhas, o resultado derivado da aplicação de apenas C-924 foi maior, de uma maneira estatística (teste de Duncan, $p \leq 0,05$), comparado com o resto dos tratamentos.

[0072] Os melhores resultados no desenvolvimento das culturas

durante a aplicação de *T. paurometabola* linhagem C-924 indicam que há elementos adicionais para o crescimento das plantas que são devido aos compostos nitrogenados que são liberados durante a degradação da matéria orgânica.

[0073] Com relação à porcentagem de matéria seca de plantas de milho, uma vez terminado o estudo, era evidente que todas as variantes inoculadas com um ou outro micro-organismo mostram valores similares, mas sempre maiores do que o controle não-inoculado. Isto está de acordo com a eficácia dos biofertilizantes estudados no crescimento de culturas (Haggag, W.M., 2002. "Sustainable Agriculture Management of Plant Diseases". *Online Journal of Biological Science*, 2:280-284).

Exemplo 10. Interação de *T. paurometabola* linhagem C-924 com micorrizas arbusculares no cultivo de alface (*Lactuca sativa*)

[0074] Um "Solo Vermelho Púrpuro Ferrítico" (Instituto de Suelos, 1999. "Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba". Ministerio de la Agricultura. Ed.: AGRINFOR, Cuba) foi usado para este experimento. O dito solo continha 2,9% de matéria orgânica lábil e 11,8% de matéria orgânica total, distribuídos em potes de capacidade de 1 L. Sementes da variedade Blask Simpson de alface pré-germinada (*Lactuca sativa*) foram empregadas.

[0075] A linhagem C-924 foi usada na maneira de um pó umectante concentrado em 2×10^{12} cfu/mL. Ela foi inoculada sete dias antes do plantio da semente, usando uma suspensão aquosa em concentração de 3×10^7 cfu/mL. Uma irrigação adequada diária foi seguida de modo a não atingir a capacidade de retenção de umidade do solo.

[0076] As micorrizas arbusculares (AM) *Glomus fasciculatum* e *Glomus clarum* previamente formuladas no "Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de Cuba". Essas foram aplicadas no momento do plantio das sementes, com uma quantidade de 200 g/m² (20 g por pote).

Um elaboração experimental de seis tratamentos com quatro réplicas foi usada, cada uma delas com 4 plantas de alface. As plantas foram mantidas (durante 30 dias) sob condições semicontroladas em uma estufa. Os tratamentos foram como segue:

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

[0077] Depois de 30 dias do plantio, o peso líquido da folhagem para cada planta foi checado em todos os tratamentos. A tabela 9 mostra um sumário dos resultados.

[0078] Tratamentos onde *T. paurometabola* linhagem C-924 estava envolvida foram significativamente melhores do que o Controle (Solo sem inoculação). Para ambos os casos, as combinações de *T. paurometabola* linhagem C-924 + *G. clarum* e *T. paurometabola* linhagem C-924 + *G. fasciculatum* mostraram resultado superior àqueles tratamentos onde a mesma AM foi aplicada separada. Isto foi com relação ao aumento do peso da folhagem das plantas.

TABELA 9. Comparação dos valores de peso médio da parte aérea de plantas de alface em cada tratamento

Tratamentos	Peso da folhagem das plantas (g)
Controle	0,9835 ^a
C-924	13,56425 ^b
C-924 + <i>G. fasciculatum</i>	23,0545 ^c
<i>G. fasciculatum</i>	17,2235 ^b
C-924 + <i>G. clarum</i>	29,503 ^d
<i>G. clarum</i>	25,30975 ^c

[0079] Valores médios com letras diferentes apresentaram diferenças estatísticas significantes, $p \leq 0,05$ (Tukey).

Exemplo 11. Testes de compatibilidade entre *T. paurometabola* linhagem C-924 e *G. fasciculatum* em pepino (*Cucumis sativus*. var. Poinset) cultivadas em estufas

[0080] Duas estufas com um "Solo Marrom Não-carbonado" (Instituto de Suelos, 1999. Nueva clasificación genética de los suelos de Cuba. Ministerio de la Agricultura. Editorial AGRINFOR, Cuba) estavam disponíveis. O dito solo tinha um teor de 3,1% da matéria orgânica e um total de matéria orgânica de 12,3%. Uma elaboração experimental com lotes de tamanhos iguais (30 m²) foi feita; quatro tratamentos com quatro réplicas foram realizados da maneira que segue:

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

[0081] A linhagem C-924 e AM foram aplicadas sete dias antes do plantio das sementes e em dois outros momentos em intervalos de 21 dias após sua primeira aplicação, de acordo com as doses requeridas por m², conforme aplicado no exemplo 10. O rendimento (peso) das frutas comerciais colhidas foi avaliados durante o ciclo de cultivo (98 dias) para cada tratamento. Os resultados podem ser vistos na tabela 10.

[0082] Em referência ao Grupo controle, um aumento significativo no peso das frutas foi conseguido para as plantas sob o tratamento com *T. paurometabola* linhagem C-924 bem como aquelas tratadas com *Glomus fasciculatum*. Além disso, a aplicação combinada dos micro-organismos resultou em um peso maior das frutas comparado com a

aplicação separada. Esta diferença provou ser estatisticamente significativa.

TABELA 10. Comportamento do rendimento em estufa com aplicação combinada de C-924 e o fungo micorrizogênico *G. fasciculatum*

Tratamentos	Peso médio das frutas por lotes (kg)
<i>G. fasciculatum</i> + C-924	501,5 ^a
<i>Glomus fasciculatum</i>	448,5 ^b
<i>T. paurometabola</i> cepa C-924	443,0 ^b
Controle	303,5 ^c

[0083] Valores médios com letras diferentes apresentaram diferenças significantes,
 $p \leq 0,05$ (Tukey)

REIVINDICAÇÕES

1. Método para estimular o crescimento de plantas, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) obter um agente biofertilizante que compreende uma cultura de uma linhagem *Tsukamurella paurometabola* ou um metabólito derivado desta linhagem obtido de modo natural, recombinante ou sintético;

b) contatar o solo, ou um substrato natural ou artificial, com uma quantidade eficaz do dito agente biofertilizante ou o metabólito derivado da dita linhagem, em que a dita quantidade eficaz está na faixa de 10^6 a $5,0 \times 10^{12}$ unidades formadoras de colônia (cfu) de *Tsukamurella paurometabola* por mililitro ou grama de meio de cultura.

2. Método para estimular o crescimento de plantas de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a linhagem *Tsukamurella paurometabola* é a linhagem C-924.

3. Método para estimular o crescimento de plantas de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz do agente biofertilizante a ser aplicada ao solo ou substrato em uma suspensão aquosa está em uma concentração de aproximadamente 10^6 e 10^9 cfu por mililitro de suspensão.

4. Método para estimular o crescimento de plantas de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o agente biofertilizante é aplicado pelo menos uma vez ao solo ou misturado com o substrato.

FIG. 1

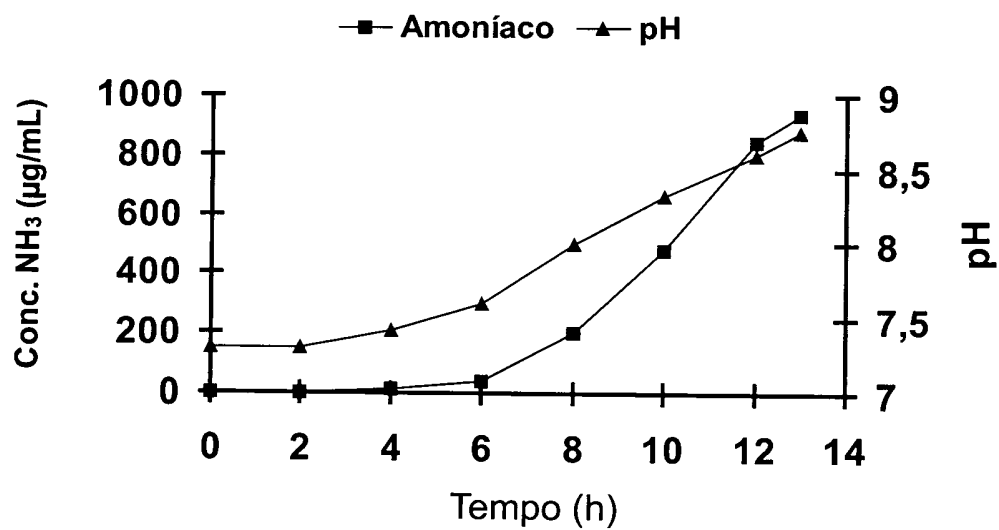


FIG. 2

