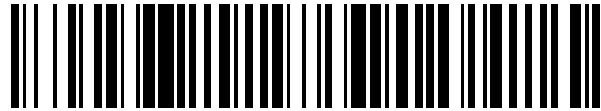


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 341**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)
C05F 11/08 (2006.01)
C12R 1/12 (2006.01)
C12R 1/39 (2006.01)
C12R 1/11 (2006.01)
C12R 1/265 (2006.01)
C12R 1/47 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2002 E 09005034 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 2233458**

54 Título: **Microorganismos para el tratamiento del suelo y procedimiento para obtenerlos**

30 Prioridad:

13.08.2001 HU 0103294

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

26.03.2014

73 Titular/es:

**AGRO.BIO HUNGARY KFT. (100.0%)
HOLLÁN ERNŐ U. 21
9700 SZOMBATHELY, HU**

72 Inventor/es:

**KISS, GYÖRGY BOTOND y
OTT, ISTVÁN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 451 341 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

Microorganismos para el tratamiento del suelo y procedimiento para obtenerlos

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un producto o productos que contienen un microorganismo o microorganismos vivos, adecuados para el tratamiento del suelo, a microorganismos que se multiplican bajo diferentes circunstancias climatológicas y naturales, así como al proceso para la preparación de los productos, además de
10 ello, al proceso para el tratamiento del suelo y plantas con los productos.

De manera más detallada, la invención se refiere a un proceso para preparar los productos a partir de cualquiera de los microorganismos especificados más adelante, o a partir de mezclas de los mismos.

15 Además de ello, la invención se refiere a un proceso para la creación de los cultivos de los microorganismos a utilizar. Objeto de la invención son asimismo los microorganismos propiamente dichos.

La invención se refiere también a un proceso para el tratamiento del suelo y de las plantas con un producto que contiene al menos *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM /P/ B 001291) y, opcionalmente, uno o más de los
20 siguientes microorganismos:

Azospirillum brasilense ssp. SW51 (NCAIM /P/ B 001293),

Azotobacter vinelandii ssp. M657 (NCAIM /P/ B 001292),

Pseudomonas fluorescens var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296),

Bacillus polymyxa var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295/),

25 *Micrococcus roseus* ssp. A21 (NCAIM /P/ B 001294/),

Bradyrhizobium japonicum var. PH25 (NCAIM /P/ B 001302/ y

Streptomyces albus var. 0003 LP (NCAIM /P/ B 001301/),

además, a los productos que se multiplican y existen en el entorno de la planta en cuestión que contienen los
30 microorganismos listados y a su producción.

TÉCNICA DE ANTECEDENTES

El medio natural del suelo es el ecosistema autorregulador de las plantas y microorganismos bajo circunstancias naturales, la existencia del primero determina la de los otros. Cuando se altera el equilibrio desarrollado en el
35 transcurso de la evolución por actividades humanas (arado profundo, fertilización natural y artificial, uso de agentes fitoprotectores, etc.) en su estructura y función, pueden producirse cambios de efecto no predecible. Para el desarrollo de las poblaciones de microorganismos necesarias para el cultivo óptimo de una planta cultivada específica, en los diferentes suelos y bajo diferentes circunstancias climatológicas, se necesita un tiempo de selección que dura muchos años. Los microorganismos determinantes de la población de microorganismos favorable, sin embargo, pueden ser transportados al suelo, y las circunstancias necesarias para el cultivo óptimo
40 se pueden crear en el espacio de uno-dos días. El resultado de ello es un mayor rendimiento, sin la alteración perjudicial del ecosistema natural. Los microorganismos útiles y dominantes que existen en el entorno de una planta dada, importante desde un punto de vista económico, se pueden determinar mediante experimentos de laboratorio, y éstos se pueden multiplicar individualmente, se pueden producir por métodos industriales y se
45 pueden devolver al suelo en una proporción adecuada.

Importantes regularidades se pueden descubrir en el ecosistema del suelo y microorganismos. El número de los microorganismos es diferente, y diferentes especies se pueden identificar en el entorno inmediato del sistema radicular de plantas vivas (rizosfera) y las semillas germinantes (espermatosfera) más alejadas de éstas. La propagación de las bacterias en el entorno de la raíz se ve influenciada por muchos factores. Estos factores dependen de la región, calidad del suelo, composición de la población de microorganismos y de las circunstancias climatológicas.
50

La fuente de carbono encontrada en el suelo procede principalmente, y en la mayoría aplastante al utilizar la energía solar, de la fotosíntesis.
55

El ciclo del nitrógeno es más complicado que el del carbono. En la transformación de nitrógeno, los procesos biológicos y químicos tienen un cierto efecto. En la naturaleza, el nitrógeno gaseoso domina en una así

denominada condición inerte, y el así denominado nitrógeno fijado (nitrato, nitrito, amoníaco) está presente sólo en una cantidad limitada.

5 Para la mineralización del gas nitrógeno, el primer responsable es la unión del nitrógeno biológico. Dado que en más de una hectárea la cantidad del nitrógeno molecular asciende a $6-7 \times 10^8$ toneladas, esto significa una fuente inagotable para el nitrógeno ligado. El interés de los expertos está dirigido hacia los seres vivos que fijan nitrógeno, es decir, hacia organismos que reducen el nitrógeno molecular en amoníaco, dado que, entre otros, el conocimiento de estos microorganismos y la utilización adecuada de sus propiedades puede asegurar, de una manera no contaminante, la erradicación del hambre en todo el mundo.

10 Algunas bacterias que fijan nitrógeno, fijan el nitrógeno en condición viva libre, pero numerosas bacterias son capaces de fijar nitrógeno sólo combinado con otras plantas superiores.

15 El ciclo del fósforo, al contrario del del nitrógeno, es prácticamente cerrado bajo circunstancias naturales. La entrada y salida son idénticas, el flujo es ligero, el aire no se verá contaminado con fósforo. Finalmente, este elemento se acumula en las aguas, mares y solamente una pequeña cantidad del mismo vuelve a la tierra (por ejemplo en forma de guano).

20 En las células vivas del suelo, el fósforo se acumula en compuestos orgánicos, y la mineralización de éstos tiene lugar con una elevada velocidad ($3-8 \text{ g/m}^2/\text{año}$). La solubilidad – así su accesibilidad para las plantas – de los compuestos de fósforo que surgen, es diferente, meramente está disponible el 5% de los 400-1200 mg de fósforo detectable en cada kg de los suelos en promedio. El cambio de determinados compuestos de fósforo es de 500-2000 años.

25 Al transportar algunos grupos de microorganismos fosfonolíticos al suelo, pueden disolverse los compuestos de fósforo complejos, que no son accesibles para la planta. Si los microorganismos llevados al suelo “funcionan”, y los contenidos minerales del suelo son satisfactorios, no es necesario o se puede reducir considerablemente el uso de los fertilizantes que contienen fosfatos.

30 Para el desarrollo las plantas necesitan – especialmente en el momento de la maduración del cultivo – potasio en una cantidad considerable. Los cultivadores de plantas incorporan el potasio en el suelo, mediante la incorporación de fertilizante con contenido en potasio. Este fertilizante puede estar disponible de los minerales de potasio por medio de los microorganismos que liberan el ion potasio.

35 En lo que se refiere a las plantas, los microorganismos que se multiplican en el suelo, biosintetizan compuestos fisiológicamente activos, siendo de estos los compuestos más importantes: fitohormonas, auxina (ácido indol-3-acético), etileno, giberelinas, quinetinas, etc. Algunos grupos de *Pseudomonas*, en presencia de hierro en una ligera cantidad, producen los denominados sideróforos, que pueden recoger el hierro. Como consecuencia de esto, los otros, bacterias fitopatogénicas y hongos, dado que no pueden utilizar el hierro a partir de los sideróforos, adolecen de una inhibición debido a la carencia de hierro, por otra parte, estos sideróforos en el suelo que carece de hierro, estimulan significativamente el desarrollo de las plantas, dado que al fijar el hierro, éstas proporcionan directamente el hierro para la planta.

45 Para la solución de lo que antecede, se han elaborado diversas versiones técnicas; se describen varios microorganismos con todo detalle en la bibliografía especializada.

50 Inventores húngaros describieron la preparación de cultivos de nitrificación en polvo (patente húngara HU 143.391), cultivos de *Azobacter chroococcum* y *Rhizobium meliloti* (patente húngara HU 188.434), cultivos de algas (patente húngara HU 195.068) y de nuevo cultivos de *Azotobacter chroococcum*, así como la preparación de los cultivos de microorganismos *Bacillus megaterium* (patente húngara HU 207.751). El *Azobacter chroococcum* ha sido depositado bajo el número de depósito 00238, el *Bacillus megaterium* bajo el número de depósito No. NCAIM /P/ B 1140. Con mayor detalle, en las patentes húngaras HU 188.434 y HU 207.751, los autores describen la fermentación que procede de la mezcla de los microorganismos arriba depositados. De acuerdo con la patente húngara HU 213 163, los autores completan el cultivo de los microorganismos de HU 207.751 con carboxi-metil-celulosa. Los inventores húngaros en el documento HU 1671/96 describen cultivos que contienen microorganismos *Azospirillum lipoferum* ssp., *Azobacter vinelandi* sp., *Pseudomonas fluorescens* ssp. y *Bacillus megaterium* ssp.

La aplicación y el efecto de los microorganismos empleados en los procesos antes mencionados está limitado por el hecho de que éstos, bajo diferentes circunstancias de cultivo, en suelos de diversas composiciones y bajo diferentes composiciones climatológicas sobreviven sólo durante un breve tiempo, creando el entorno y la rizosfera de las diversas plantas no siempre condiciones óptimas.

5

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

El objetivo básico de la invención consiste en la provisión de cultivos de microorganismos del suelo que, desde un punto de vista del cultivo de plantas y económico, son de un efecto favorable y que, al mismo tiempo, pueden sobrevivir, multiplicarse y ejercer su efecto favorable en diversos suelos y sobre diversas plantas, bajo diferentes circunstancias climatológicas y de cultivo.

10

Sorprendentemente, se ha encontrado que la multiplicación y supervivencia de los microorganismos influye favorablemente sobre el desarrollo de la planta, fijando el nitrógeno, movilizándolo el fósforo, estimulando el crecimiento de la planta, mejorando la estructura del suelo, cultivados en los laboratorios varía en función del carácter del suelo, las condiciones de temperatura y la planta en el entorno inmediato de la planta. Diferentes grupos de microorganismos ejercen su efecto en suelo *ciernozjom*, en suelo de bajo contenido en humus, en limolitas, país o, por ejemplo, en un entorno de suelo arcilloso. En el transcurso de los experimentos llevados a cabo por los autores de la invención, se ha encontrado, sin embargo sorprendentemente, que otros grupos de microorganismos se pueden multiplicar en la rizosfera de las diversas plantas o próximas a la misma y pueden ejercer allí su efecto durante un largo tiempo.

15

20

Por lo tanto, se realizaron experimentos para el aislamiento de microorganismos que tienen un efecto favorable en el entorno de una planta dada que es importante desde un punto de vista económico, en lo que concierne a su cultivo. Adicionalmente, también se llevaron a cabo experimentos para el aislamiento de microorganismos que pueden movilizar los iones potasio y para la preparación de microorganismos de este tipo – aislados a partir del suelo y alterados en el laboratorio mediante procesos de mutación – que pueden propagarse en el momento de incorporarlos en el suelo asimismo a baja temperatura y que – sin embargo, también de forma sorprendente incluso para el experto – pueden ejercer su efecto.

25

30

Además de ello, se ha establecido en el transcurso de los experimentos que determinados microorganismos que producen polisacáridos, de una manera sorprendente, cambian la estructura del suelo, favorablemente desde un punto de vista agrícola, mejorando con ello la resistencia a la sequía.

35

40

Resumiendo, el objetivo del trabajo experimental llevado a cabo por los autores de la invención era diseñar y aislar microorganismos que transmitan nitrógeno, fósforo, potasio a las plantas, biosinteticen hormonas del crecimiento vegetal, biosinteticen polisacáridos que mejoren la estructura del suelo y que sean capaces de propagarse en el período de siembra y también en países de un clima más frío y que ejerzan su efecto sobre diversos suelos y plantas. Además de ello, la invención se extiende a producir este tipo de preparados, los contenidos en microorganismos de los mismos, en el entorno de la planta, en la rizosfera o directamente entre las células vegetales, fijando y movilizándolo elementos de vital importancia, así como mediante la producción de factores de crecimiento vegetal y polisacáridos en el entorno vegetal dado, fomentan el desarrollo de una planta dada o familia de plantas, como consecuencia de lo cual se puede evitar o limitar el uso de un fertilizante de una manera protectora del medio ambiente.

45

La presente invención se refiere al proceso de desarrollo que alude a los microorganismos listados, a los preparados que los contienen, además de ello, a la aplicación del o de los preparados que contienen el o los microorganismos y también específicamente a los microorganismos como tales.

50

55

La presente invención se basa en el reconocimiento de que para producir los preparados diana, *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM /P/ B 001291), *Azospirillum brasilense* ssp. SW51 (NCAIM /P/ B 001293), *Azotobacter vinelandii* ssp. M657 (NCAIM /P/ B 001292), *Pseudomonas fluorescens* var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296), *Bacillus polymyxa* var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295), *Micrococcus roseus* ssp. A21 (NCAIM /P/ B 001294), *Bradyrhizobium japonicum* var. PH25 (NCAIM /P/ B 001302) y *Streptomyces albus* var. 0003 LP (NCAIM /P/ B 001301), son los más convenientes, pueden multiplicarse a bajas temperaturas en el período de siembra, suministran el nitrógeno para las plantas, movilizan fósforo, potasio, biosintetizan hormonas de crecimiento y polisacáridos, por lo que los autores de la invención aislaron los mismos y elaboraron un proceso de desarrollo para los mismos.

En el sentido de lo anterior, entre 1998 y 1999, los autores de la invención aislaron en Europa suelos y el entorno radicular de determinados microorganismos de plantas, sometieron a ensayo in vitro su capacidad de fijar nitrógeno, solubilizar fosfato y potasio, producir polisacáridos y biosintetizar hormonas vegetales, identificaron sistemáticamente los microorganismos seleccionados, prepararon variantes de este tipo mediante tratamiento por mutación, que se propagan asimismo intensamente a temperaturas por debajo de 20°C, para el cultivo de éstos, elaboraron una tecnología de desarrollo y a partir de sus cultivos realizaron preparados y demostraron su efecto sobre el desarrollo vegetal y los rendimientos en experimentos de invernadero y de campo.

Se aislaron especies y subespecies de *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* y *Micrococcus*.

Las especies de *Azospirillum* menos conocidas son las bacterias Gram-negativas de color variable, que viven en el suelo, que, bajo circunstancias micro-aerófilas (en presencia de 1-2% de oxígeno) en estrecha relación con el sistema radicular de las plantas, pueden reducir el nitrógeno del aire en amoníaco, y luego transmitirlo a las plantas. Algunos grupos biosintetizan también hormonas vegetales.

Los grupos de *Azospirillum* se aislaron del entorno de la raíz de maíz, trigo, cebada, centeno, desarrollados en diversos terrenos cultivables de Europa, en diversos suelos y de la hierba de campos de heno. La suspensión de bacterias que se derivan de la muestra de suelo se dispersó en el medio de cultivo Nfb(II) y MM de la composición que se proporciona más adelante y luego se cultivaron bajo condiciones microaerófilas. Después de 72 horas, se identificaron los cultivos de *Azospirillum*. Los cultivos de *Azospirillum* que diferían de los otros cultivos pequeños de bacterias y hongos, alcanzaron un tamaño de aproximadamente 3 mm.

Los cultivos de *Azospirillum* sp., cuando crecen exponencialmente en los medios de agar de blando MM líquido y Nb(II) de la composición que se proporciona más adelante, muestran la característica morfológica de las células de *Azospirillum*. Las células son vibroides y tienen una forma de S, y son de un tamaño de 1-2 x 2-4 µm. Para su aumento, necesitan biotina. Basado en la observación al microscopio, se pueden mover rápidamente. Su movilidad puede ser atribuida a sus flagelos polares. En sus células, éstas acumulan granos de poli-beta-hidroxi-butilato y carotenos. La descoloración rojiza puede ser explicada por el cultivo de envejecimiento. Para su aumento, asimismo pueden utilizar ácidos orgánicos tales como ácido málico, ácido láctico, ácido pirorracémico y ácido butanodioico. La fijación del nitrógeno del aire tiene lugar bajo circunstancias microaerófilas. Bajo circunstancias extremas, tal como en el caso de sequía, a un valor de pH bajo o elevado, en ausencia de fuente de nitrógeno o carbono, las células se transformarán en cistos, en los que no existe flagelo, pero que contienen granos de poli-beta-hidroxi-butilato y están rodeados por polisacárido capsular. El espectro de los microorganismos que utiliza la fuente de carbono varía en relación con la especie: la *A. amazonense* glucosa + sacarosa + inositol + *A. brasilense* glucosa + sacarosa + inositol -, la *A. irakense* utiliza la glucosa (+) y la sacarosa (+), pero no el inositol (-), finalmente la *A. lipoferum* utiliza sólo la glucosa. En medio exento de nitrógeno, el espectro de fuente de carbono que lo utiliza es diferente en gran medida, de modo que se pueden distinguir las cuatro especies anteriores. La fuente de carbono que utiliza el espectro del microorganismo aislado de los autores de la invención, difiere parcialmente de neotipo ATCC 29.731 de *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. brasilense* y *A. irakinense* (Holt, J.G. y colaboradores, Bergeys Manual of Determinative Bacteriology, 9ª edición, 1994). Al contrario de los grupos tipo, éstos aumentan adecuadamente en presencia de cloruro de sodio al 3,5% en agar blando (esto se describirá más adelante), sus imágenes microscópicas son diferentes en los diversos períodos del cultivo, su producción de pigmentos es más intensa, por ejemplo en agar de extracto de patata.

Algunos *Azospirillum* aislados están próximos a las especies *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum brasilense*, así como a la especie *Azospirillum irakense*, los autores de la invención realizaron adicionalmente experimentos en éstos, al tiempo que seleccionaban uno de los grupos de *Azospirillum brasilense*.

A partir de las muestras de suelo anteriores, se aislaron microorganismos *Azotobacter* en agar blando Nfb(II), con un cultivo selectivo, y luego en medio MM y de Fjodorov dispersando y seleccionando una de las subespecies sobre la base de su capacidad de fijación de nitrógeno, y se almacenó para experimentos ulteriores. Las células del grupo son pleomorfas, en forma de cocoide. En presencia de oxígeno, éstas se mueven rápidamente. Son Gram-negativas. Producen en medio exento de nitrógeno un pigmento fluorescente amarillo-verdoso y utilizan adecuadamente la ramnosa y meso-inositol.

Tal como es bien conocido, los *Rhizobium* forman nódulos sobre las raíces de las papilionáceas y luego, dispersándose entre las células vegetales, transmiten directamente el nitrógeno fijado a la planta. Con las diversas

papilonáceas entran en conexión diferentes especies de *Rhizobium*, con el haba de soja del grupo *Bradyrhizobium*. Dado que esta es la única especie de *Rhizobium* de este tipo que muere después de la recolección, es decir, no permanece en una gran cantidad en el suelo, es aconsejable utilizar este grupo para el tratamiento del suelo. Los autores de la invención aislaron el grupo de *Bradyrhizobium* el 13 de julio de la plantación de soja en Subasa cerca de Szeged-Kiskundorozsma. A partir de las plantas que crecen en limonita, se seleccionó una planta de buen desarrollo y se separaron de sus raíces los nódulos bien desarrollados. Se depositó la variante psicrófila del microorganismo aislado según se proporciona en el ejemplo.

En las muestras de suelo recogidas por los autores de la invención, éstos investigaron los microorganismos que movilizan fosfato y sometieron a ensayo los microorganismos seleccionados desde un punto de vista sistemático. Una parte de los microorganismos demostró ser *Pseudomonas* y la otra parte demostró ser especies de *Bacillus*.

Las *Pseudomonas* son células Gram-negativas, aerobias, de una forma de bastón fino, producen en la mayoría de los medios un pigmento fluorescente y son saprofitas. No se puede observar producción de caroteno alguna y no crecen a temperaturas superiores a 40°C. En los agares gelatinosos se puede observar una licuefacción. La glucosa es utilizada por los grupos de los autores de la invención, el almidón no. A pesar de que las variantes en los grupos de *Pseudomonas* fluorescentes están sistemáticamente en estrecha relación, se podía observar una cierta heterogeneidad sistemática entre el microorganismo de los autores de la invención y los grupos tipo: el microorganismo de los autores de la invención – característico de *Pseudomonas* – utiliza adecuadamente glucosa, galactosa, ácido acético, maltosa, glicerol y el ácido pirorracémico. No utiliza fructosa, D-arabinosa, maltosa, lactosa, almidón e inulina. Al contrario de los grupos tipo, sin embargo, son capaces de crecer en xilosa, sacarosa y en determinada medida en sorbitol. Como única fuente de carbono pueden utilizar glicina.

Sobre la base de lo anterior, uno de los microorganismos de los autores de la invención fue identificado como la especie *Pseudomonas fluorescens* y se encontró que estaba próximo a las variantes que pertenecen al grupo Biovar III. Los autores de la invención nombraron al grupo *Pseudomonas fluorescens* ssp.

Sobre la base de los caracteres sistemáticos, de las células de *Bacillus*, que pueden disolver el fosfato insoluble, algunas demostraron ser *Bacillus polymyxa*, algunas demostraron ser *Bacillus megaterium*. Algunos grupos fueron seleccionados para experimentos adicionales.

A partir de los minerales de potasio, para el aislamiento de los microorganismos capaces de movilizar el ion potasio, se aislaron microorganismos de la superficie de minerales que contenían potasio, feldespato y moscovita y luego se sometieron a ensayo tal como se indica en los ejemplos, en medio sólido exento de potasio para demostrar la movilización del potasio. Aplicando el proceso dado en los ejemplos, por medio de tratamientos de mutación, se produjo y depositó un microorganismo identificado como *Streptomyces psychrophilic*.

Los autores de la invención aislaron un microorganismo de este tipo, el cual, después de los ensayos de DNS sistemáticos, morfológicos y ribosomales, demostró ser *Micrococcus roseus* y mostró un efecto ventajoso extraordinario en el transcurso de los ensayos vegetales. Se depositó uno de los grupos de este microorganismo, grupo que había sido transformado en el laboratorio.

La invención se basa también en el hecho de que los microorganismos de efecto favorable, plantados en el suelo, pueden multiplicarse lo más rápidamente posible en el instante del desarrollo inicial de la siembra y las plantas, bajo las condiciones climáticas en otoño y en el inicio de primavera, así como también en países de un clima más frío. Por lo tanto, los microorganismos fueron tratados, aislados y mantenidos de acuerdo con lo que antecede tal como se ilustra en el Ejemplo 4. Mediante procesos reconocidos se aislaron y depositaron en la National Collection of Agricultural and Industrial Micro-organisms los mutantes y variantes que aumentaban a bajas temperaturas.

La invención se refiere a preparaciones y procesos de este tipo, aplicando los cuales puede aumentarse el rendimiento de los cultivos vegetales. La producción comprende cultivar los microorganismos aislados y someterles a ensayo a partir de los diversos terrenos cultivables, del entorno de diversas plantas que existen en el entorno de la familia de plantas dada, durante un largo período, propagando a bajas temperaturas en diversos suelos y disponiendo la preparación que contiene el cultivo en las plantas relevantes, sobre las semillas o en el terreno cultivable del mismo. De acuerdo con la invención, las preparaciones se pueden utilizar tratando el suelo, las plantas o las semillas vegetales con una preparación que contiene *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM /P/ B 001291) y al menos uno de los siguientes microorganismos: *Azospirillum brasilense* ssp. SW51 (NCAIM /P/ B 001293), *Azotobacter vinelandii* ssp. M657 (NCAIM /P/ B 001292), *Pseudomonas fluorescens* var. SW11 (NCAIM

/P/ B 001296), *Bacillus polymyxa* var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295/, *Micrococcus roseus* ssp. A21 (NCAIM /P/ B 001294/, *Bradyrhizobium japonicum* var. PH25 (NCAIM /P/ B 0012.. / y *Streptomyces albus* var. 0003 LP (NCAIM /P/ B 0012/,

5 Como resultado del tratamiento, se acelerará el desarrollo de las plantas, éstas serán más resistentes a patógenos, se mejorará el suministro de agua a la estructura del suelo y las plantas y se proporcionan altos rendimientos de las cosechas incluso con un uso reducido del fertilizante o sin ningún uso de ningún fertilizante en absoluto.

10 Es una de las más importantes ventajas del proceso de acuerdo con la invención el que mediante la implementación del mismo, en el transcurso del cultivo de las plantas, la aplicación de fertilizantes basados en nitrógeno, fosfato y potasio, resultará prácticamente innecesaria o pudiera reducirse en un grado considerable. El efecto de contaminación del medio ambiente por los fertilizantes es evidente. Los compuestos que biosintetizan en las células del microorganismo, que fomentan el desarrollo vegetal, aceleran el desarrollo de la planta tratada, el desarrollo de las raíces y, al mismo tiempo, con ello se mejorará el suministro de agua a las plantas, los microorganismos alimentados reprimen el desarrollo de los microorganismos fitopatogénicos, los polisacáridos que biosintetizan en las células algunos de los microorganismos de los autores de esta invención, mejoran la estructura del suelo, el equilibrio del agua y la vida del suelo de manera especialmente favorable.

20 Los microorganismos de acuerdo con la invención se pueden cultivar en un medio que contiene como fuente de carbono, por ejemplo, glucosa, almidón, sacarosa o melazas, como fuente de nitrógeno líquido de maceración del maíz, caseína, extracto de levadura o sales amonio, además otras sales inorgánicas y sales que se disocian en los iones de oligoelementos, pero como resulta evidente para los especialistas, cualquier fuente asimilable de carbono y nitrógeno, en donde se puedan utilizar las sales inorgánicas que hacen posible la propagación de las bacterias de acuerdo con la invención.

25 El cultivo que contiene los microorganismos de acuerdo con la invención se puede añadir directamente al suelo a tratar o a las plantas en el medio utilizado para el cultivo, pero preparaciones que mantienen el potencial biótico del microorganismo, entre éstos también se pueden preparar preparaciones que contienen soportes que fijan las bacterias a las semillas con fuerzas de adherencia. La cantidad de bacterias añadidas al suelo puede variar entre 5×10^{11} y 5×10^{15} células por hectárea, siendo la cantidad favorable de estas células entre 10^{12} y 10^{13} .

30 En el sentido del Tratado de Budapest, los microorganismos aislados, identificados a partir de diversos entornos vegetales, que se pueden multiplicar a bajas temperaturas, también fueron depositados en la National Collection of Agricultural and Industrial Micro-organisms, en donde estos están registrados bajo los siguientes números de depósito:

35 *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM /P/ B 001291),
Azospirillum brasilense ssp. SW51 (NCAIM /P/ B 001293),
Azotobacter vinelandii ssp. M657 (NCAIM /P/ B 001292),
40 *Pseudomonas fluorescens* var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296),
Bacillus polymyxa var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295/,
Micrococcus roseus ssp. A21 (NCAIM /P/ B 001294/,
Bradyrhizobium japonicum var. PH25 (NCAIM /P/ B 001302/ y
Streptomyces albus var. 0003 LP (NCAIM /P/ B 001301/.

45 El alcance de la protección también se extiende a los organismos depositados y a sus mutantes artificiales y naturales, a variantes o asimismo a las líneas de grupos de los microorganismos anteriores, adquiridos de cualquier manera conocida.

50 En lo que sigue se ilustra la invención en detalle en los ejemplos, sin limitar el alcance de protección a esas realizaciones.

En los ejemplos, los porcentajes se expresan en porcentajes en peso, a menos que se especifique de otro modo.

55 MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

Ejemplo N° 1.

Aislamiento de los microorganismos que fijan el nitrógeno del aire a partir de diversos suelos y a partir del entorno de diversas plantas, y demostración de su capacidad de fijación de nitrógeno

5 Las especies de Azospirillum son las bacterias de coloración variable Gram-negativas, que son capaces de reducir el nitrógeno del aire en amoníaco, bajo circunstancias aerófilicas (en presencia de 1-2% de oxígeno) y de poner a disposición a éste para las plantas.

10 Especies de Azospirillum se aislaron de diversas muestras de suelo (humus, limolita, tierra sódica, parda y negra, etc.) del entorno de las raíces de diversas plantas (cereales, girasol, maíz, hierbas, etc.). Los atrayentes químicos tales como los ácidos orgánicos y azúcares atraen los grupos de Azospirillum mediante quimiotaxis. Ayudados por sus flagelos, las bacterias se mueven hacia las raíces y, cuando llegan a ellas, las colonizan.

15 A partir de diluciones de 10, 100, 1.000 y 10.000 veces de la muestra de suelo dada, preparada con agua estéril destilada, 100-100 µl de suspensión fueron rociados sobre placas de Petri que contenían agar blando MM y Nfb(II). La composición del medio MM es como sigue:

	K ₂ HPO ₄	1,65 g/l	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,007 g/l
	KH ₂ PO ₄	0,87 g/l	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,000125 g/l
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,29 g/l	CoSO ₄ x 7H ₂ O	0,00014 g/l
	NaCl	0,18 g/l	H ₃ BO ₃	0,00003 g/l
20	CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,07 g/l	glucosa	5,0 g/l
	FeCl ₃ x 6H ₂ O	0,01 g/l	sacarosa	5,0 g/l
	NaMoO ₄ x 2H ₂ O	0,005 g/l	agar Bacto	20,0 g/l
	MnSO ₄ x H ₂ O	0,00014 g/l		

25 La glucosa se esterilizó por separado a partir de los otros componentes del medio MM con autoclave (121°C, 30 minutos), y luego se mezcló con ellos después de enfriar hasta la temperatura de 60°C. El medio estéril se ajustó a pH 7,4 con una disolución de NaOH 1 N estéril.

30 La composición del medio Nfb(II) es como sigue:

	Ácido L-málico	5,0 g
	Hidrógeno-fosfato dipotásico	0,5 g
	Sulfato de magnesio x 7 de agua	0,2 g
	Cloruro de sodio	0,1 g
	Cloruro de calcio	0,02 g
35	Disolución de elementos traza*	2,0 ml
	azul de bromotimol (disolución acuosa de 0,5% del material disuelto en KOH 0,2 N)	2,0 ml
	solución de Fe-EDTA al 1,564%	4,0 ml
	Disolución de vitaminas**	1,0 ml
40	Agar	1,75 g

El medio se ajustó con disolución de KOH 1N en agua a pH: 6,8.

* La composición de la disolución de elementos traza es como sigue:

	Sulfato de hierro-II x 7 H ₂ O	200 mg	Tetraborato sódico x 10 H ₂ O	1 mg
45	Cloruro de hierro-III x 6 H ₂ O	10 mg	P ₂ O ₅ x 24 WO ₃ x H ₂ O	0,5 mg
	Sulfato de manganeso x H ₂ O	1 mg	Nitrato de bismuto x 5 H ₂ O	0,1 mg
	Sulfato cúprico x 5 H ₂ O	2 mg	Cloruro de estaño	0,01 mg
	NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	1 mg	Cloruro de selenio	0,01 mg
	Cloruro de cobalto x 6 H ₂ O		2 mg Yoduro de potasio	1 mg
50	Sulfato de zinc x 7 H ₂ O	2 mg		
	Ácido cítrico	100 mg	Agua destilada	1000 ml

** La composición de la disolución de vitaminas es como sigue:

	Vitamina C	50 mg
55	Vitamina B1	5 mg
	Vitamina E	2 mg
	Vitamina A	2 mg
	Biotina	4 mg

Agua destilada

100 ml

5 Las bacterias llevadas al medio encontradas en las placas MM se dispusieron en termostatos anaerobios intercambiando el espacio del aire del termostato por nitrógeno y luego se ajustaron a una concentración de oxígeno de 1,6% con el reflujo de aire de una cantidad satisfactoria. Las placas se incubaron a una temperatura de 32°C y después de 72 horas se identificaron los organismos de Azospirillum. Correspondientes a la línea de dilución, en la placa rociada con la suspensión diluida 10 veces, se ha desarrollado un campo continuo de bacterias, mientras que en la suspensión diluida 10.000 veces se habían desarrollado generalmente 30-50 cultivos. Los cultivos de Azospirillum, que difieren de las otras bacterias pequeñas y los cultivos de hongos, alcanzaron un tamaño de aproximadamente 3 mm. De estos cultivos, varios eran morfológicamente similares a los cultivos de Azospirillum. De éstos, los autores de la invención estudiaron algunos.

15 Los cultivos de agar blando Nfb(II) se colocaron en un termostato aerobio, en el medio anterior y bajo las circunstancias de cultivo anteriores, y primeramente se multiplicó el Azospirillum y con una morfología reconocible y característica.

20 Los diversos grupos de bacterias Azospirillum obtenidos de los medios MM y Nfb(II) se hicieron crecer de acuerdo con la práctica microbiológica de manera que el cultivo de bacterias primario fue rociado dos veces sobre un cultivo sobre un medio de Tag completo. Los grupos de bacterias Azospirillum se purificaron rociando dos veces sobre un cultivo en medio líquido Tag y se almacenaron en el cultivo del grupo. La suspensión de bacterias a la temperatura de -80°C fue considerada como el cultivo grupo y todos los experimentos se iniciaron a partir de este cultivo.

La composición del medio Tag es como sigue:

25	Tryptona Bacto (Difco)	1,0%
	Extracto de levadura (Difco)	0,1%
	NaCl	0,5%
	Agar	2,5%

30 Después de la esterilización, se añadieron las disoluciones acuosas de los siguientes compuestos, en la siguiente concentración final:

CaCl₂ 0,1 M al 0,1% x 6 H₂O
MgCl₂ 0,1 M al 0,1% x 6 H₂O
Glucosa al 0,2% (esterilizada por separado)

35 Después de la esterilización, el pH se ajustó a 7,0-7,2.

40 La colonización de las raíces se puede detectar mediante un simple experimento. En las raíces de plantas de maíz y trigo tratadas con la bacteria Azospirillum, sembradas en perlita estéril (maceta de diámetro de 15 cm) y células de igual número (1×10^{10} células por maceta) sobre la base de un recuento al microscopio, esencialmente se detectaron más células Azospirillum que en los controles. La colonización de las raíces tiene lugar sobre la base de un mecanismo de reconocimiento específico. En el transcurso de la colonización, las células de Azospirillum penetran en la matriz de la raíz y éstas allí – por medio de su fijación de nitrógeno activo – pueden cubrir una parte de la necesidad de nitrógeno de la planta principal (fijación asociativa de nitrógeno). Esto se demostró mediante el crecimiento de una mayor masa verde de maíz y trigo inoculada con grupos Azospirillum en el transcurso de los experimentos de laboratorio de los autores de la invención, cuyo resultados se detallan más adelante. Los Azospirillum producen hormonas vegetales y materiales que fomentan el crecimiento así como el aumento de estos materiales y su efecto favorable sobre la planta principal pueden demostrarse con la eficacia de germinación incrementada y con el crecimiento más intenso de la planta, con experimentos realizados bajo circunstancias de laboratorio.

50 Las características morfológicas de las especies de Azospirillum aisladas se encuentran en la parte general de la descripción.

55 En agar blando Nfb(II) con cultivo selectivo, más que en medio MM exento de nitrógeno con cultivo selectivo, microorganismos de Azospirillum fueron aislados de muestras de suelo de la tierra arada. Se encontró que estos grupos eran Azospirillum brasilense de acuerdo con las características sistemáticas y el espectro de utilización de la fuente de carbono, fijando el nitrógeno molecular del aire en gran medida con SW5-01-07 luego, según se describe más adelante, se aislaron asimismo variantes que se multiplican a bajas temperaturas, que biosintetizan

polisacáridos, y una de éstas se depositó.

Para el aislamiento de los grupos de Azotobacter, además del uso de los medios Nfb(II) y MM de la composición dada anteriormente, las muestras de suelo se cultivaron en medio de Fjodorov también, en donde los Azotobacter muestran propiedades morfológicas características. La composición del medio Fjodorov es como sigue:

5	Dihidrógeno-fosfato potásico	0,03%
	Hidrógeno-fosfato cálcico	0,02%
	Sulfato de potasio	0,02%
	Sulfato de magnesio x 7 equiv.	0,03%
10	Carbonato de calcio	0,5%
	Cloruro de sodio	0,05%
	Cloruro férrico(III)	0,02%
	Molibdato de sodio	0,0002%
	Manitol	2,0%
15	Agar Bacto	2,0%

El pH del medio antes de la esterilización se ajustó a 7,0 con disolución de hidróxido de sodio 1 N.

En agar blando Nbf(II) con cultivo selectivo, luego en medio MM exento de nitrógeno y de Fjodorow con cultivo selectivo, microorganismos Azotobacter se aislaron a partir de las muestras de suelo del terreno arado. Se encontró que estos grupos eran Azotobacter vinelandii de acuerdo con los caracteres sistemáticos y el espectro de utilización de la fuente de carbono, que fijan el nitrógeno molecular del aire en gran medida con la marca M65-01-34, luego, según se describe más adelante, se aislaron variantes que se multiplican a bajas temperaturas y asimismo fue depositada una de ellas por los autores de esta invención.

La capacidad de fijación de nitrógeno de los grupos de Azospirillum y Azotobacter fue determinada también por el método de reducción de acetileno. De acuerdo con el método (Dilworth M. J., J. Biochem. Biophys. Acta, 27, 285, 1996), el acetileno se inyectó en el cultivo en un plato cerrado con un inyector y luego, después de incubación durante 12 horas, se inyectaron 0,25 ml de una mezcla gaseosa en la columna Propak N del cromatógrafo de gases Perkin Elmer. La concentración de acetileno y etileno de la mezcla de gases se determinó mediante un detector de ionización a la llama de hidrógeno. A partir de la altura de los picos de acetileno y etileno, se pudo concluir definitivamente la actividad del complejo de enzima de la nitrogenasa. Los grupos de Azospirillum y Azotobacter de los autores de la invención reducían en el espacio de 1 hora, acetileno en una cantidad entre 15 y 85 nmol en etileno.

El grupo de Bradyrhizobium se aisló el 13 de julio del 2000 de las plantas de soja de Subasa, situada cerca de Szeged-Kiskundorozsma. A partir de las plantas que crecen en lumita se seleccionó una planta de buen desarrollo y de sus raíces se separaron los nódulos bien desarrollados. Los nódulos se lavaron con agua destilada estéril, se aplastaron y luego las partículas se suspendieron en solución salina fisiológica. A partir de la suspensión, bajo condiciones estériles, se prepararon series de dilución y se rociaron sobre medio completo. La capacidad de fijación del nitrógeno de los cultivos que se desarrollan después de la incubación de 48 horas mediante un así denominado ensayo de plantas simbiótico, se determinó como sigue: la superficie de semillas de alfalfa comercial (Medicago sativa) se esterilizaron mediante tratamiento térmico de 2 horas, realizado a una temperatura de 72°C y mediante un cuidadoso aclarado con una disolución Hypo al 20% y luego se germinaron en un medio de agua destilada que contenía 1% de agar. Las plantículas se colocaron en un agar oblicuo de Gibson al 1,5% (véase más adelante) y se hicieron crecer en un invernadero durante una semana. Las plantas de una semana de edad se inocularon con las células de un cultivo de bacterias en cada caso y se hicieron crecer en el invernadero durante ocho semanas más. A partir de los grupos que pertenecen a las tres plantas que muestran un desarrollo predominantemente óptimo (peso en seco de las partes sobre la raíz 22-26 mg, al contrario del peso de las plantas control de 3-5 mg) se seleccionaron tres y sobre la base de sus propiedades que son importantes desde un punto de vista morfológico y sistemático, los autores de la invención las nombraron Bradyrhizobium japonicum var. PH-2-1-3.

Ejemplo Nº 2.

Aislamiento de microorganismos que solubilizan fosfato y potasio

Se recogieron muestras de suelo en diversas partes del mundo, las suspensiones en agua de las muestras se

rociaron sobre medio Tag (véase antes), y luego se sometieron a ensayo los materiales aislados del cultivo de Pseudomonas y Bacillus y la morfología de las células.

5 Los diversos grupos de Pseudomonas y Bacillus se purificaron de acuerdo con la práctica microbiológica, rociando el cultivo de bacterias primario varias veces sobre un cultivo sencillo, en medio completo de TAG. Los grupos de bacterias se aumentaron y se almacenaron de manera purificada con rociado en medio TAG líquido y sólido.

10 Las propiedades movilizantes de fosfato de los microorganismos se sometieron a ensayo en un medio agar nutriente (Oxoid) que contenía hidroxapatita al 1%, completado con Pikovskaya modificado (HP) y trifosfato de calcio al 10% y glucosa (al 0,2%).

La composición de los medios utilizados en el transcurso de los experimentos es como sigue:

Medio Pikovskaya modificado:

15	Hidroxapatita	1,0%	NaCl	0,02%
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,05%	KCl	0,02%
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01%	glucosa (esterilizada	
	Extracto de levadura	0,05%	por separado) 1,0%	
	Agar	1,5%		

20

Las disoluciones de los siguientes compuestos se añadieron al medio después de la esterilización:

20 mg/100 ml de FeSO₄ x 7 H₂O al 1%

40 mg/100 ml de MnSO₄ x H₂O al 1%

25 Antes de la esterilización, el medio se ajustó a pH: 7,2.

Naoxog: agar nutriente (Oxoid) preparado de acuerdo con las instrucciones del fabricante + glucosa al 0,2%.

30 Durante el ensayo de la capacidad solubilizante de fosfato de los grupos seleccionados en el transcurso de los experimentos preliminares en medio de Pikovskaya (HP), los cultivos desarrollados en el espacio de 3-4 días a una temperatura de 30°C, producían anillos de disolución de 29 y 38 mm. Las suspensiones de células de los mismos grupos obtenidos a partir de agar oblicuo TAG, con 1 ml de agua destilada, fueron depositados en agujeros hechos en placas de Naoxog completadas con trifosfato de calcio al 10% (0,1 ml/agujero). Incubando los cultivos a una temperatura de 30°C, se pueden observar en el espacio de 2-3 días anillos de disolución bien visibles. El tamaño de éstos eran de 24 mm cuando se utilizaban los grupos de Pseudomonas sometidos a ensayo en detalle y de 26 mm cuando se utilizaban los grupos de Bacillus, asiendo el tamaño medio a 34 mm.

35

40 Cada uno de los grupos individuales de Pseudomonas y algunos grupos de Bacillus demostraron tener intensas propiedades solubilizantes de fosfato. Los grupos pueden portar variantes de fosfato inorgánicas bien detectables en solución, de modo que se puede establecer que éstas tienen excelentes propiedades solubilizantes de fosfatos.

45 Sobre la base de sus características sistemáticas y del espectro de utilización de carbono, se encontró que los catorce microorganismos de Pseudomonas y veinticinco de Bacillus, seleccionados sobre la base de los ensayos, eran Pseudomonas fluorescens y Bacillus polymyxa así como Bacillus megaterium, que se marcaron en el siguiente orden de secuencia: SW1-1-14, SW17-1-15 y M32-1-10, luego, según se indica posteriormente, se aislaron y depositaron variantes que se multiplican a baja temperatura, así como que biosintetizan polisacáridos en grandes cantidades.

50 El aislamiento de los microorganismos que movilizan los iones potasio se consiguió tal como se describe antes, con la diferencia de excluir el cloruro de potasio en el medio Pikovskaya (HP) de la composición dada anteriormente y añadir 1% de feldespato machacado en un polvo fino y esquisito de mica en lugar del hidroxapatita.

55 En el entorno de los cultivos de microorganismos llevando los minerales insolubles en agua por completo o en parte en disolución, se formará una zona transparente.

Algunos de éstos se seleccionaron, y sobre la base de las características sistemáticas, propiedades morfológicas y el espectro de utilización de la fuente de carbono, se encontró que eran Bacillus y Streptomyces, los 15 grupos de

los autores de la invención fueron marcados como N° 1-015-0003 y luego, según se describe más adelante, se aislaron variantes que se multiplican a baja temperatura también, y una de estas ha sido depositada.

Ejemplo N° 3.

Aislamiento de microorganismos que producen sideróforos y hormonas vegetales

Se sometió a ensayo la capacidad de producción de sideróforos y hormonas de los grupos aislados según se describen en los Ejemplos N°s 1 y 2, utilizando el medio King B. La composición de éste es como sigue:

Peptona 2%
 Glicerol 1%
 K₂HPO₄ 0,15%
 MgSO₄ x 7H₂O 0,15%
 Agar 2%

Antes de la esterilización, el medio se ajustó a pH: 7,2 con disolución de hidróxido de sodio.

Los grupos de Pseudomonas que producen los sideróforos, fijan los iones hierro que luego transmiten asimismo a la planta en un suelo pobre en hierro. Además de ello, estos grupos inhiben la propagación de algunos microorganismos fitopatógenos, tales como Erwinia caratovora, dado que éstos no pueden utilizar el hierro fijado. Los autores de la invención sometieron a ensayo la producción de sideróforos, inhibiendo el crecimiento del grupo de Escherichia coli MC1061. Las suspensiones de células de los dos grupos procedentes del cultivo de agar se prepararon con agua destilada, luego se cultivaron disponiéndolas en una placa King B exenta de hierro y con contenido en hierro (1 µM de FeCl₃ x 7 H₂O) (30-50 µl) durante 48 horas a una temperatura de 28°C, seguido de pulverización de la placa con el cultivo de E. coli MC1061, obtenido de agar TAg y se continuó la incubación durante otras 28 horas a la temperatura de 28°C. Alrededor de los cultivos se pueden observar diversas zonas de inhibición. Los resultados de la media de los cuatro experimentos se muestra en la Tabla N° 1. Como control negativo se utilizó Bacillus megaterium y como control positivo Pseudomonas fluorescens.

Tabla N° 1

Microorganismo	Zona de inhibición King B	Zona de inhibición King B + 1 µM de FeCl ₃
SW1-1-6	+++	-
SW1-1-12	+	-
P. fluores.	++	-
B. megater.	+	-

*Grado de inhibición: - sin, + baja, ++ y +++ alta y muy alta

En el transcurso del ensayo de la producción de sideróforos con el grupo mob4 y control positivo se observó una zona de considerable inhibición que cesaba en presencia de iones hierro.

Tal como se menciona antes, algunos grupos de Pseudomonas producen hormonas vegetales. Se sometieron a ensayo microorganismos seleccionados en cuanto a si estos eran capaces de biosintetizar ácido giberélico en el medio TAg de la composición indicada anteriormente. Los ensayos se realizaron utilizando el patrón de ácido giberélico A (Sigma) mediante cromatografía en capa fina de gel de sílice (Merck) (40 µg/ml), extracción de los cultivos con acetato de etilo, seguido de una extracción con hidróxido-carbonato de sodio de un volumen doble, luego en una disolución de pH: 2,5 con acetato de etilo de nuevo. En el residuo de evaporación del extracto se encontraron los siguientes grupos y un lugar de valor R_f próximo al patrón:

Tabla N° 2

Grupo	R _f	Tamaño del lugar (mm ²)
Estándar	0,41	24
SW1-1-6	0,46	17
M32-1-9	0,42	27

P. fluor.	0,49	14
B. megater.	0,57	7

Se seleccionaron los grupos marcados SW1-1-6 y M32-1-9 (éstos producen aproximadamente 3-15 µg de hormona por milímetro).

- 5 Los grupos, según se describen en la parte general, se sometieron a ensayo e identificaron desde un punto de vista sistemático.

Ejemplo Nº 4

10 Aislamiento de microorganismos productores de polisacáridos extracelulares

4A. Selección de los Bradyrhizobium

- 15 Los grupos de Bradyrhizobium PH2-1-3 se rociaron en medio Tag que contenía glucosa al 1% y sacarosa al 1% (véase antes) y se sometió a ensayo la cantidad de polisacárido (limo) alrededor de los cultivos. Se seleccionaron los grupos PH2-1-1 y -2 que biosintetizan el polisacárido.

4B. Aislamiento de Bacillus

- 20 Los grupos de Bacillus M32-1-10 y SW17-1-15 se rociaron en medio Tag que contenía glucosa al 1% y sacarosa al 1% (véase antes) y se sometieron a ensayo en cuanto a la cantidad de polisacárido (limo) alrededor de los cultivos. Se seleccionaron los grupos M32-1-6,8 y 10 y los grupos SW17-1-7,11 y 15 que biosintetizan el polisacárido.

- 25 El microorganismo aislado demostró ser Micrococcus roseus, en medio completo que contenía glucosa y sacarosa biosintetiza grandes cantidades de polisacárido que transforma el medio de cultivo en un material viscoso.

Los grupos seleccionados, de acuerdo con los ensayos llevados a cabo por los autores de la invención, biosintetizan polisacáridos solubles en agua del tipo succinoglucona, de estructura conocida.

30

Ejemplo Nº 5

Aislamiento de microorganismos que sobreviven al frío

- 35 Los microorganismos seleccionados de acuerdo con los Ejemplos 1-4 se trataron con agente que provoca mutaciones y con radiación. Las suspensiones de los microorganismos preparadas con agua destilada se trataron con 0,01, 0,1, 1,0, 10 y 100 µg/ml de nitroso-guanidina durante 1, 3, 5, 10 y 30 minutos. Después del tratamiento, la suspensión de células se centrifugó, se lavó con agua destilada dos veces y luego las células se rociaron sobre medio de cultivo TAG. El tratamiento se repitió con la suspensión de células en agua destilada que contenía 10⁹
- 40 microorganismos por milímetro, manteniendo las células durante 1, 3, 5, 10 y 30 minutos bajo una lámpara UV de 15 W a una distancia de 10 cm de la misma. Las suspensiones de células se rociaron sobre medio de cultivo Tag con dilución en serie.

- 45 Los cultivos TAG se incubaron a una temperatura de 18°C durante 192 horas, seguido de aislamiento de los cultivos mayores en agar oblicuos TAG incubados a una temperatura de 18°C.

Los siguientes cultivos en desarrollo se controlan y mantienen.

De los microorganismos aislados, seleccionados y que sobreviven al frío se separaron y depositaron:

- 50 Bacillus megaterium var. M326 (NCAIM /P/ B 001291),
Azospirillum brasilense ssp. SW51 (NCAIM /P/ B 001293),
Azotobacter vinelandii ssp. M657 (NCAIM /P/ B 001292),
Pseudomonas fluorescens var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296),
Bacillus polymyxa var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295/),
55 Micrococcus roseus ssp. A21 (NCAIM /P/ B 001294/),
Bradyrhizobium japonicum var. PH25 (NCAIM /P/ B 001302/ y

Streptomyces albus var. 0003 LP (NCAIM /P/ B 001301/.

Ejemplo N° 6

5 Cultivo de microorganismos

6A. Cultivo en medio de cultivo completo:

10 A partir del medio de cultivo TAg se prepararon cultivos de agar oblicuos y luego se incubaron a una temperatura de 30°C durante 48 horas. A partir de Azospirillum, Azotobacter, Bacillus, Bradyrhizobium, Pseudomonas, Streptomyces o Micrococcus se inocularon cultivos en los medios de cultivo, marcados - Ta1i - de la siguiente composición:

15	Glucosa (esterilizada por separado en disolución acuosa al 50%)	0,5%	
	Melazas	1,5%	
	Líquido de maceración de maíz (50% de sustancia seca)	1,5%	
	Extracto de levadura Gistex	0,2%	
	Caseína ácida	0,1%	
20	Sulfato de amonio	0,1%	
	Nitrato de amonio		0,1%
	Carbonato de calcio	0,3%	
	Dihidrógeno-fosfato de potasio	0,1%	
	Cloruro de sodio	0,1%	
25	Sulfato de magnesio x 7 H ₂ O	0,1%	
	Aceite de palma	0,2%	

30 Las porciones de 100-100 ml del medio de cultivo se incorporaron en matraces Erlenmeyer de 500 ml y luego se esterilizaron a una temperatura de 121°C durante 30 minutos. Los medios de cultivo estériles se inocularon con los microorganismos desarrollados en los cultivos de agar oblicuo, y el cultivo de los cultivos se llevó a cabo a una temperatura de 25°C en una mesa de trabajo rotatoria con 260 rotaciones circulares por minuto, durante 36 minutos. El crecimiento se observó con el ensayo al microscopio, y luego utilizando una cantidad de 5% de los inóculos que se inocularon en los medios de cultivo de fermentación principal en la Ta1f de la siguiente composición:

35	Glucosa (esterilizada por separado en disolución acuosa al 50%)	1,5%	Nitrato de amonio	0,2%
	Melazas	2,5%	Carbonato de calcio	0,3%
	Líquido de maceración de maíz (50% de sustancia seca)	1,5%	Dihidrógeno-fosfato de potasio	0,2%
	Extracto de levadura Gistex	4%	Cloruro de sodio	0,1%
	Caseína ácida	0,4%	Sulfato de magnesio x 7 H ₂ O	0,2%
	Sulfato de amonio	0,2%	Disolución de elementos traza*	0,45%
			Aceite de palma	0,2%

*La composición de la disolución de elementos traza está de acuerdo con el ejemplo N° 1.

40 Se esterilizaron los medios de cultivo por cada 100 ml en matraces Erlenmeyer y en fermentadores de laboratorio de un volumen bruto de 10 l y de un volumen neto de 5 l, bajo las circunstancias dadas anteriormente.

45 Los cultivos colocados en los matraces, se cultivaron en una mesa rotatoria, mientras que en los fermentadores en la manera habitual, mediante aireación v/v y haciendo funcionar un turbo mezclador con doble entrada, que gira 360 veces por minuto durante 24 horas, cuando el número de células por milímetro – dependiendo de la bacteria – alcanza los valores 4×10^8 - $1,3 \times 10^9$.

Para la preparación de cultivos de cantidades mayores, se prepararon cultivos de 10 litros en el medio de cultivo Ta1i de la composición dada anteriormente bajo las condiciones de fermentación antes mencionadas y luego 100 litros de medio de cultivo Ta1i esterilizado y 100 litros de medio de cultivo Ta1f se inocularon con 5-5 litros cada uno. El cultivo se continuó durante 24 horas bajo las condiciones de fermentación anteriores y luego el cultivo se

desarrolló en el medio de cultivo Ta1f en el suelo, se utilizaron 50 litros del cultivo desarrollado en el medio de cultivo Ta1i para inocular 1000 litros de medio de cultivo Ta1f esterilizado. El cultivo se llevó a cabo bajo las circunstancias de fermentación anteriores durante 24 horas y luego, después de la inspección, el cultivo estaba listo para ser utilizado. En el caso de una formación de espuma inusualmente intensa, se añadió polipropilenglicol al 0,01% en calidad de agente antiespumante.

6B. Cultivo en medio de cultivo semi-mínimo:

Se repitió el proceso dado en el Ejemplo N° 6, con la diferencia de que en lugar del medio de cultivo Ta1f se utilizó el medio de cultivo Ta2f de la siguiente composición:

Glucosa (esterilizada por separado en disolución acuosa al 50%)	1,5%	
Melazas	0,5%	
Caseína ácida	0,1%	
Sulfato de amonio	0,7%	
Nitrato de amonio		0,5%
Carbonato de calcio	0,3%	
Dihidrógeno-fosfato potásico	0,3%	
Cloruro de sodio	0,1%	
Sulfato de magnesio x 7 H ₂ O	0,2%	
Disolución de elementos traza*	0,35%	
Aceite de palma	0,2%	

* La composición de la disolución de elementos traza está de acuerdo con el Ejemplo N° 1.

Después de la compleción de los cultivos, los cultivos contienen, dependiendo de la bacteria, 1-7 x 10⁸ células por mililitro.

Ejemplo N° 7.

Mejora de la estructura del suelo y de los experimentos de cultivo de plantas

7A. Experimentos para la mejora de las estructuras del suelo

Suelo arenoso recogido en el Danubio, cerca de Somlyósziget y los suelos de arcilla de Esztergom se colocaron en bandejas de 90 x 90 cm, el grosor de capa era de 25 cm. La tierra arenosa se trató con 10 g de nitrato de amonio y 5 g de fosfato de calcio por bandeja. Se sembró maíz en la bandeja, con 104 semillas por bandeja. En la evaluación, los autores de la invención no han tomado los datos de las cinco plantas mayores y de las cinco plantas más subdesarrolladas. Se midió el peso de las raíces lavadas con agua destilada después de desecación durante dos días a una temperatura de 45°C. La bandeja N° 1 fue regada abundantemente con agua, la bandeja N° 2 fue regada abundantemente con agua en la siembra, pero no más tarde. Las bandejas marcadas con "a" se inocularon con microorganismos que biosintetizan los polisacáridos, los cultivos de los grupos de microorganismos *Bacillus polymyxa* var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295/, *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM /P/ B 001291), *Micrococcus roseus* ssp. A21 (NCAIM /P/ B 001294/ y *Bradyrhizobium japonicum* var. PH25 (NCAIM /P/ B 001302/, depositados en la National Collection of the Agricultural and Industrial Micro-organisms, preparados de acuerdo con el Ejemplo N° 6, con 10⁸ células por metro cuadrado de cada una de las bacterias. Las bandejas marcadas con "b" no fueron tratadas con microorganismos.

En la Tabla N° 3 se muestran los resultados obtenidos el 33^{er} día después de la siembra. Los resultados se expresan con los valores medios contados para una planta.

Tabla N° 3

Suelo	Bandeja	Tratamiento	Altura de la planta (cm)	Peso del sistema radicular (mg)
Arenoso	N° 1	A	24	945
		B	17	634
	N° 2	A	18	866

5	Arcilloso	N° 1	B	11	757
			A	27	1095
			B	23	1213
	N° 2	A	20	1012	
		B	19	689	

10 En la Tabla N° 4 se muestra el grado de aplastamiento y de agrietamiento de los suelos arenosos y arcillosos no regados (bandejas N° 2). Por el término de aplastamiento se quiere dar a entender que la mayoría de los fragmentos del suelo dispersados sobre una hoja de papel y que no se desintegran en el transcurso de un ligero sacudimiento es de un tamaño inferior a 2 mm (-), entre 2-5 mm (+) o superior a 5 mm (++). El grado de agrietamiento la superficie del suelo se marca de manera que la ausencia de grietas se marca con ++, las grietas ligeras se marcan con +, mientras que la presencia de grandes líneas de grietas de rotura características de los suelos secos se marca con -.

Tabla N° 4

Suelo	Tratamiento	Grado de aplastamiento	Grado de agrietamiento
Arenoso	A	+	+
	B	-	- o +
Arcilloso	A	++	+
	B	++	++

A partir de los datos de las Tablas N° 3 y N° 4 se puede observar que la presencia de los microorganismos que biosintetizan los polisacáridos mejora el desarrollo de las plantas y la estructura favorable del suelo.

30 7B. Experimentos en el campo

Los experimentos se realizaron en el Improvement and Cultivation Technological Station de la Universidad de Mosonmagyaróvár, en 2000, en disposiciones en bloque aleatorias repetidas cuatro veces, con 10 litros de mezcla de microorganismos por hectárea.

35 Tipo del suelo experimental: región del Danubio, grosor: 120-140 cm, contenido en humus 2,4%, precipitaciones: escasas

40 TRIGO DE PRIMAVERA

% de contenido en proteínas	
Control	11,80
NPK 200 kg/ha	11,87
BactoFil A	11,96
Contenido en proteínas correspondiente a % de sustancia seca	
Control	13,84
NPK 200 kg/ha	13,91
BactoFil A	14,00
% de gluten húmedo	
Control	32,0
NPK 200 kg/ha	31,1
BactoFil A	31,1
Peso de mil granos (g)	
Control	36,4
NPK 200 kg/ha	36,8
BactoFil A	36,4
% de molienda	

ES 2 451 341 T3

Control	50,5	
NPK 200 kg/ha	50,0	
BactoFil A	49,8	
Número de caída (s)		
Control	278,3	
NPK 200 kg/ha	281,5	
BactoFil A	272,5	
Aplanamiento por gluten (cm)		
Control	2,75	
NPK 200 kg/ha	3,25	
BactoFil A	2,75	
Estiramiento por gluten (cm)		
Control	12,5	
NPK 200 kg/ha	11,8	
BactoFil A	12,3	
Índice de Zeleny		
Control	30,0	
NPK 200 kg/ha	30,3	
BactoFil A	30,8	
Capacidad de absorción de agua en el Valirograph (ml)		
Control	31,3	
NPK 200 kg/ha	31,6	
BactoFil A	31,4	
Valor del Valirograph		
Control	57,3	
NPK 200 kg/ha	53,1	
BactoFil A	48,0	
Masa de la hogaza (cm ³)		
Control	962,5	
NPK 200 kg/ha	977,5	
BactoFil A	1055,0	
Relación morfológica de pan		
Control	2,38	
NPK 200 kg/ha	2,46	
BactoFil A	2,32	
Rendimiento de proteínas (kg/ha)		
Control	469,8	
NPK 200 kg/ha	498,6	
BactoFil A	510,3	
Altura de la planta (cm)		
Control	56,3	
NPK 200 kg/ha	57,7	
BactoFil A	55,4	
Cosecha de granos recontada para una humedad del 13% (g/parcela)		
	cosecha de granos t/ha	% de control
Control	3,366	100,0
NPK 200 kg/ha	3,552	105,5
BactoFil A	3,617	107,5
Cosecha de granos (g/parcela)		
	cosecha de granos t/ha	% de control
Control	3,398	100,0
NPK 200 kg/ha	3,584	105,5
BactoFil A	3,646	107,3
% de contenido en humedad en la recolección		

ES 2 451 341 T3

Control	14,08
NPK 200 kg/ha	14,00
BactoFil A	13,93
Peso de ensayo (kg)	
Control	69,8
NPK 200 kg/ha	70,4

MAÍZ

Cosecha bruta en mazorcas (kg/parcela)		
	Cosecha bruta en mazorcas (t/ha)	% de control
Control	5,725	100,0
NPK 200 kg/ha	6,848	119,6
BactoFil A	6,495	113,4
Cosecha de granos recontada en 14% (kg/parcela)		
	Cosecha bruta en mazorcas (t/ha)	% de control
Control	5,496	100,0
NPK 200 kg/ha	6,614	120,3
BactoFil A	6,175	112,3
% de contenido en humedad del grano		
Control	18,40	
NPK 200 kg/ha	17,78	
BactoFil A	19,63	
Peso del tallo (kg/parcela)		
	Peso del tallo (t/ha)	% de control
Control	2,672	100,0
NPK 200 kg/ha	3,016	112,9
BactoFil A	2,886	108,0
% del contenido en humedad del tallo		
Control	26,1	
NPK 200 kg/ha	25,6	
BactoFil A	25,9	
Peso del tallo contado en 14% (kg/parcela)		
	Peso del tallo (t/ha)	% de control
Control	2,416	100,0
NPK 200 kg/ha	2,740	113,4
BactoFil A	2,613	108,2
Número de tallos (mil pcs/ha)		
Control	38,41	
NPK 200 kg/ha	39,13	
BactoFil A	39,86	
Número de mazorcas por tallo (pcs/parcela)		
Control	1,04	
NPK 200 kg/ha	1,10	
BactoFil A	1,05	
Número de mazorcas (mil pcs/ha)		
Control	39,86	
NPK 200 kg/ha	42,93	
BactoFil A	42,03	
Peso de mil granos de grano bruto (g)		
Control	255,2	
NPK 200 kg/ha	259,2	
BactoFil A	263,3	
Peso de mil granos de grano para 14% de humedad (g)		
Control	245,6	
NPK 200 kg/ha	250,9	

ES 2 451 341 T3

BactoFil A	251,0	
Peso de ensayo (kg) bruto		
Control	65,9	
NPK 200 kg/ha	65,1	
BactoFil A	64,6	
Peso de una mazorca (kg) para una humedad del 14%		
Control	0,121	
NPK 200 kg/ha	0,136	
BactoFil A	0,131	
Número de granos por mazorca (db)		
Control	493,5	
NPK 200 kg/ha	545,1	
BactoFil A	523,1	
% de contenido en humedad de la mazorca		
Control	19,4	
NPK 200 kg/ha	20,7	
BactoFil A	18,9	
Peso de la mazorca (g)		
Control	22,3	
NPK 200 kg/ha	22,3	
BactoFil A	22,4	
Índice de recolección		
Control	44,1	
NPK 200 kg/ha	41,5	
BactoFil A	42,3	

REMOLACHA AZUCARERA

Remolacha pcs/ha		
Control	79891	
NPK 200 kg/ha	81159	
BactoFil B	83696	
Cosecha de las partes aéreas (kg/parcela)		
	cosecha de las partes aéreas (t/ha)	% de control
Control	13,41	100,0
NPK 200 kg/ha	13,96	104,1
BactoFil B	15,38	114,7
Cosecha de las raíces (kg/parcela)		
	Cosecha de las raíces (t/ha)	% de control
Control	30,46	100,0
NPK 200 kg/ha	36,74	120,6
BactoFil B	39,35	129,2
Proporción de partes aéreas-raíces		
	Proporción de partes aéreas-raíces	% de control
Control	0,443	100,0
NPK 200 kg/ha	0,381	85,9
BactoFil B	0,391	88,2
Peso medio de la raíz (dkg)		
	Peso medio de la raíz (dkg)	% de control
Control	38,2	100,0
NPK 200 kg/ha	45,3	118,6
BactoFil B	47,1	123,5
% de digestión		
	% de digestión	% de control

Control	11,61	100,0
NPK 200 kg/ha	11,07	95,3
BactoFil B	10,59	91,3
Contenido en Na (mg/100 g de remolacha)		
Control	1,94	
NPK 200 kg/ha	2,28	
BactoFil B	2,08	
Contenido en alfa-amino-N (mg/100 g de remolacha)		
Control	1,20	
NPK 200 kg/ha	1,02	
BactoFil B	1,02	
Contenido en K (mg/100 g de remolacha)		
Control	2,52	
NPK 200 kg/ha	1,89	
BactoFil B	2,10	
% de deducción		
Control	2,95	
NPK 200 kg/ha	2,68	
BactoFil B	2,68	
% en contenido de azúcar purificado		
	% en contenido de azúcar purificado	% de control
Control	8,66	100,0
NPK 200 kg/ha	8,39	96,9
BactoFil B	7,92	91,4
Rendimiento de azúcar bruto (t/ha)		
	Rendimiento de azúcar bruto (t/ha)	% de control
Control	3,557	100,0
NPK 200 kg/ha	4,081	114,7
BactoFil B	4,181	117,5
Rendimiento de azúcar neto (t/ha)		
	Rendimiento de azúcar neto (t/ha)	% de control
Control	2,656	100,0
NPK 200 kg/ha	3,091	116,4
BactoFil B	3,125	117,7

Ejemplo N° 8

5 Producción de preparaciones que contienen los microorganismos de acuerdo con la invención

8A. Preparación de mezcla de microorganismos:

10 Los cultivos de *Azospirillum brasilense* ssp. SW51 (NCAIM /P/ B 001293), *Azotobacter vinelandii* ssp. M657 (NCAIM /P/ B 001292), *Pseudomonas fluorescens* var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296), *Bacillus polymyxa* var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295), *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM /P/ B 001291), *Micrococcus roseus* ssp. A21 (NCAIM /P/ B 001294), *Bradyrhizobium japonicum* var. PH25 (NCAIM /P/ B 001302/ y *Streptomyces albus* var. 0003 LP (NCAIM /P/ B 001301/, preparados de acuerdo al Ejemplo N° 6 se mezclaron, óptimamente en proporciones iguales, y se aplicaron al suelo a tratar en una cantidad entre 5 litros y 50 litros, óptimamente en una cantidad de 12 litros/ha, en cualquier período del año exento de rocío, óptimamente entre marzo y octubre.

8B. Preparación para el tratamiento de monocotiledóneas

20 Siguiendo el proceso de acuerdo con el Ejemplo N° 6 se hizo una preparación, con la diferencia de que se utilizaron los siguientes microorganismos:

Azospirillum brasilense ssp. SW51 (NCAIM /P/ B 001293), *Azotobacter vinelandii* ssp. M657 (NCAIM /P/ B

001292), *Pseudomonas fluorescens* var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296), *Bacillus polymyxa* var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295/, *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM /P/ B 001291/ y *Streptomyces albus* var. 0003 LP (NCAIM /P/ B 001301/.

5 8C. Preparación para el tratamiento de dicotiledóneas

Siguiendo el método de acuerdo con el Ejemplo N° 6 con la diferencia de que se utilizaron los siguientes microorganismos:

10 Azospirillum brasilense ssp. SW51 (NCAIM /P/ B 001293), *Azotobacter vinelandii* ssp. M657 (NCAIM /P/ B 001292), *Pseudomonas fluorescens* var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296), *Bacillus polymyxa* var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295/, *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM /P/ B 001291/, *Micrococcus roseus* ssp. A21 (NCAIM /P/ B 001294/, *Bradyrhizobium japonicum* var. PH25 (NCAIM /P/ B 001302/, se preparó la preparación de acuerdo con la invención.

15 8D. Producción de preparación secada en condición congelada

20 2 litros de la suspensión acuosa de microorganismos de acuerdo con el Ejemplo N° 6 se liofilizaron en un equipo de liofilización Gelman SP54, actuando de acuerdo con las instrucciones de uso del equipo. El polvo de microorganismos seco se utilizó por sí solo o, dependiendo del uso, se mezcló con carbonato de calcio, almidón, glucosa o celulosa en proporciones entre 1:1 y 1:100 y luego se almacenó la preparación hasta el uso a una temperatura entre 4 y 10°C.

8E. Producción de la preparación que contiene soporte:

25 Una proporción óptimamente igual de los cultivos preparados en el medio de cultivo de acuerdo con el Ejemplo N° 6, se mezclaron con abono orgánico, harina de soja (tamaño del grano general de malla 4), metil-celulosa o fécula de patata, de modo que la preparación debería contener 5×10^8 - 10^{10} , óptimamente 5×10^9 células de microorganismos, y luego la preparación húmeda o la preparación secada a una temperatura por debajo de 40°C en una cantidad de 2 y 20, óptimamente una cantidad de 5 kg/ha, se aplicó al suelo a tratar. Óptimamente, se incorporaron al suelo al menos 10^{13} células de microorganismos por hectárea.

35 Con el proceso de acuerdo con la invención, un producto será transportado al suelo, producto que contiene al menos uno de los grupos de bacterias del suelo que transforman el nitrógeno del aire en compuestos disponibles para las plantas, solubilizando los compuestos de fosfato y potasio mineralizados y biosintetizando los materiales mejorando el desarrollo vegetal, produciendo polisacáridos que influyen óptimamente en la estructura del suelo, aislados de diversos suelos y alterados en el laboratorio, de modo que se alcanzarán rendimientos satisfactorios, excluyendo prácticamente la aplicación de los costosos fertilizantes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Preparaciones adecuadas para el tratamiento del suelo y de semillas de plantas que contienen un microorganismo o microorganismos vivos capaces de propagarse en diferentes tipos de suelos en el entorno de una planta, caracterizadas por que contienen, en una cantidad de $5 \times 10^6 - 10^{11}$, preferiblemente $10^7 - 10^{10}$ células/g, el cultivo de *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM /P/ B 001291) y, opcionalmente, uno o más de los siguientes microorganismos:
- 10 *Azospirillum brasilense* ssp. SW51 (NCAIM /P/ B 001293),
Azotobacter vinelandii ssp. M657 (NCAIM /P/ B 001292),
Pseudomonas fluorescens var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296),
Bacillus polymyxa var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295/),
Micrococcus roseus ssp. A21 (NCAIM /P/ B 001294/),
Bradyrhizobium japonicum var. PH25 (NCAIM /P/ B 001302/ y
15 *Streptomyces albus* var. 0003 LP (NCAIM /P/ B 001301/),
propagándose dichos microorganismos también a baja temperatura, preferiblemente por debajo de 20°C, así como en suelos con un pH bajo, estando depositados dichos microorganismos en la National Collection of the Agricultural and Industrial Microorganisms, Budapest, Hungría, con soportes húmedos o secos aceptables en agricultura, aceptables desde un punto de vista agrícola, y no tóxicos para los microorganismos.
- 20 2. Preparaciones según la reivindicación 1, que en calidad de soporte contienen agua y/o harina de soja y/o almidón y/o celulosa y/o glucosa.
3. Preparaciones según las reivindicaciones 1 ó 2, que como microorganismos contienen:
- 25 *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM /P/ B 001291),
Azospirillum brasilense ssp. SW51 (NCAIM /P/ B 001293),
Azotobacter vinelandii ssp. M657 (NCAIM /P/ B 001292),
Pseudomonas fluorescens var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296),
Bacillus polymyxa var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295/ y
30 *Streptomyces albus* var. 0003 LP (NCAIM /P/ B 001301/).
4. Preparaciones según las reivindicaciones 1 ó 2, que como microorganismos contienen:
- 35 *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM /P/ B 001291),
Azospirillum brasilense ssp. SW51 (NCAIM /P/ B 001293),
Azotobacter vinelandii ssp. M657 (NCAIM /P/ B 001292),
Pseudomonas fluorescens var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296),
Bacillus polymyxa var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295/),
Micrococcus roseus spp. A21 (NCAIM/P/ B 001294/),
Bradyrhizobium japonicum var. PH25 (NCAIM /P/ B 001302/ y
40 *Streptomyces albus* var. 0003 LP (NCAIM /P/ B 001301/).
5. Preparaciones según las reivindicaciones 1 ó 2, que como microorganismos contienen:
- 45 *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM /P/ B 001291),
Azospirillum brasilense ssp. SW51 (NCAIM /P/ B 001293),
Azotobacter vinelandii ssp. M657 (NCAIM /P/ B 001292),
Pseudomonas fluorescens var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296),
Bacillus polymyxa var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295/),
Micrococcus roseus spp. A21 (NCAIM/P/ B 001294/ y
50 *Bradyrhizobium japonicum* var. PH25 (NCAIM /P/ B 001302/).
6. Preparaciones según las reivindicaciones 1 ó 2, que como microorganismos contienen:
- 55 *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM /P/ B 001291),
Bacillus polymyxa var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295/),
Micrococcus roseus spp. A21 (NCAIM/P/ B 001294/ y
Bradyrhizobium japonicum var. PH25 (NCAIM /P/ B 001302/).
7. Procedimiento para la preparación de productos adecuados para el tratamiento del suelo y semillas de plantas y/o preparaciones que contienen un microorganismo o microorganismos vivos capaces de propagarse en diferentes tipos de suelos en el entorno de una planta, también a bajas temperaturas, preferiblemente por debajo

de 20°C y pH bajo, caracterizado por cultivar por separado o juntos, en un medio de cultivo que contiene una fuente de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, el microorganismo *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM /P/ B 001291) y, opcionalmente - por separado o juntos - uno o más de los siguientes microorganismos:

5 *Azospirillum brasilense* ssp. SW51 (NCAIM /P/ B 001293),
Azotobacter vinelandii ssp. M657 (NCAIM /P/ B 001292),
Pseudomonas fluorescens var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296),
Bacillus polymyxa var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295),
Micrococcus roseus ssp. A21 (NCAIM /P/ B 001294),
10 *Bradyrhizobium japonicum* var. PH25 (NCAIM /P/ B 001302/ y
Streptomyces albus var. 0003 LP (NCAIM /P/ B 001301/,

depositados en la National Collection of the Agricultural and Industrial Microorganisms, hasta alcanzar un número de células entre 5×10^7 y 5×10^9 por mililitro, opcionalmente mezclar el cultivo o los cultivos obtenidos en una proporción especificada u, opcionalmente, depositar el o los cultivos sobre un soporte o mezclarlos con el mismo y, opcionalmente, liofilizar de una manera tradicional.

15 8. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que como fuente de carbono se utiliza glucosa y/o sacarosa y/o melazas, como fuente de nitrógeno se utiliza cloruro de amonio y/o nitrato de amonio y/o sulfato de amonio y/o líquido de maceración de maíz y/o hidrolizado de caseína y como sal inorgánica se utiliza carbonato de calcio y sales que disocian iones sodio, potasio, magnesio, calcio, hierro, nitrato, cloruro, sulfato, carbonato, fosfato, y
20 elementos traza.

9. Microorganismos que óptimamente se propagan también a una temperatura por debajo de 20°C y pH bajo, depositados en la National Collection of the Agricultural and Industrial Microorganisms, Budapest, Hungría, bajo los siguientes números:

25 *Azospirillum brasilense* ssp. SW51 (NCAIM /P/ B 001293),
Azotobacter vinelandii ssp. M657 (NCAIM /P/ B 001292),
Pseudomonas fluorescens var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296),
Bacillus polymyxa var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295),
Bacillus megaterium var. M326 (NCAIM/P/B 001291)
30 *Micrococcus roseus* ssp. A21 (NCAIM /P/ B 001294/),
Bradyrhizobium japonicum var. PH25 (NCAIM /P/ B 001302/ y
Streptomyces albus var. 0003 LP (NCAIM /P/ B 001301/.

35 10. Procedimiento para la preparación de los microorganismos según la reivindicación 9, caracterizado por tomar una muestra de suelo del entorno de plantas, de la capa superior (de arriba) de 40 cm de un tipo de suelo dado, identificar los microorganismos seleccionados, aplicar un tratamiento con agentes de mutación y aislar las variantes que también se multiplican a baja temperatura.

40 11. Procedimiento para el tratamiento del suelo con las preparaciones de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por aplicar las preparaciones que contienen la célula/las células de microorganismos en cantidades entre 10^{10} y 10^{14} , óptimamente entre 10^{11} y 10^{12} por hectárea sobre o en el suelo en el periodo exento de rocío.

45 12. Procedimiento para el tratamiento de semillas de plantas con las preparaciones según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por tratar las semillas con un producto líquido que contiene uno de los microorganismos o la mezcla de los mismos.