

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 898**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20	(2006.01)
A01C 1/06	(2006.01)
A01H 5/10	(2008.01)
A01N 63/02	(2006.01)
A01P 21/00	(2006.01)
C05F 11/08	(2006.01)
C05F 3/00	(2006.01)
C12N 11/00	(2006.01)
A01H 3/00	(2006.01)
C12R 1/07	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2013 PCT/CA2013/050805**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2014 WO14082167**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2013 E 13859211 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2925855**

54 Título: **Rizobacterias Bacillus firmus solubilizadoras de fosfato como biofertilizante para aumentar el rendimiento de la colza**

30 Prioridad:

30.11.2012 US 201261731706 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.04.2018

73 Titular/es:

**XITEBIO TECHNOLOGIES INC. (100.0%)
3194 St. Mary's Road
Winnipeg, Manitoba R2N 4A8, CA**

72 Inventor/es:

BANERJEE, MANAS RANJAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 665 898 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

Rizobacterias *Bacillus firmus* solubilizadoras de fosfato como biofertilizante para aumentar el rendimiento de la colza

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere de manera general al campo de la biofertilización y los inoculantes vegetales. Más específicamente, la presente invención se refiere a la aplicación de rizobacterias solubilizadoras de fosfato existentes en la naturaleza para aumentar el crecimiento, desarrollo y rendimiento de la colza.

Antecedentes de la invención

10 El fósforo (P) es un nutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, que constituye hasta 0,2% en peso seco. El fósforo es típicamente insoluble o poco soluble en los suelos. Aunque el contenido medio de P de los suelos es aproximadamente 0,05% (en peso), solo 0,1% del P total existe en una forma accesible para la planta (Illmer et al., 1995, *Soil Biology and Biochemistry* **27**: 260-270). Como resultado, se aplican grandes cantidades de formas solubles de fertilizantes de P para cumplir los requerimientos de cultivo para alcanzar la máxima producción. Los cultivos necesitan más P del que está disuelto en la disolución del suelo para crecer económicamente, por lo tanto esta "reserva" de P debe ser repuesta muchas veces durante el período de crecimiento. La capacidad de un suelo de mantener niveles adecuados en la fase de disolución es la clave para el estado del P disponible para las plantas de un suelo. Sin embargo, las formas solubles aplicadas de fertilizantes de P precipitan fácilmente en formas insolubles, tales como fosfato de tricalcio [Ca₃(PO₄)₂], fosfato férrico (FePO₄) y fosfato de aluminio (AlPO₄) (Achal et al., 2007, *Soil Biology and Biochemistry* **39**: 695-699). El P inorgánico está cargado negativamente en la mayor parte de los suelos. Debido a su química particular, el P reacciona fácilmente con los iones de calcio (Ca), hierro (Fe) y aluminio (Al) cargados positivamente y forma sustancias relativamente insolubles. Cuando esto sucede, se considera que el P está "fijado" o "atado". Por tanto, el P se fija en el suelo bloqueándose, y se hace inaccesible a las plantas. Este es el caso también en la región occidental de Canadá, puesto que la mayor parte de los suelos occidentales de Canadá son de pH neutro a alcalino, y los minerales de fosfato de calcio son los precipitados inorgánicos predominantes. Se ha encontrado que aproximadamente 75-90% del fertilizante de P aplicado es precipitado por los cationes de Ca, Fe y Al. Estas formas insolubles no son absorbidas eficazmente por las plantas, y por tanto conducen a una aplicación excesiva de fertilizante de P a los campos de cultivo (Khan et al., 2007, *Agronomy and Sustainable Development* **27**: 29-43). La aplicación de fertilizante de P se suma inicialmente a los niveles de P disponible ya presente en el suelo. Una parte del P aplicado es usado en el año de la aplicación (10-30%), y el P no utilizado restante revierte a formas de P en el suelo que se hacen cada vez menos disponibles para la planta.

35 De acuerdo con Goldstein et al. (1993, *Bio/Technology* **11**: 1250-1254), los fosfatos no disponibles acumulados en los suelos serían adecuados para sustentar rendimientos máximos de los cultivos globalmente durante aproximadamente 100 años. Además, el exceso de aplicación de P también intensifica el potencial de pérdida de P hacia las aguas superficiales a través de la escorrentía o las corrientes subterráneas, lo que acelera la eutrofización de las aguas dulces. Este es el proceso que ocurre en las masas de agua, por el cual se estimula el crecimiento de algas que, en última instancia, mueren y se descomponen en el agua, y disminuyen el oxígeno disponible. Los niveles de oxígeno reducidos dan como resultado en última instancia una disminución de las poblaciones de plantas y animales acuáticos de orden superior. El P que puede contribuir al enriquecimiento de las masas de agua y, de esta forma, conducir a la eutrofización, es una combinación del P que está unido a las partículas del suelo menores que 0,45 µm de tamaño que son transportadas durante el movimiento del suelo. El riesgo de pérdidas de P hacia el medio ambiente a través de escorrentía superficial es mayor en las tierras en pendiente, y donde el fertilizante se aplica a la superficie, seguido después de lluvia o riego. Los lagos de agua dulce de Manitoba son uno de tales ejemplos de eutrofización. La eutrofización de la mayor parte del agua dulce de todo el mundo es acelerada por los aportes de P y, por lo tanto, el P suele ser el elemento limitante, y su control es de fundamental importancia para reducir la eutrofización acelerada de las aguas dulces (USDA, 2003 en *Agricultural phosphorus and eutrophication*, segunda edición (Sharpley, Daniel, Sims, Lemunyon, Stevens y Parry, eds.), ARS-149, pág. 38).

50 El fósforo es vital para los sistemas estables de producción de alimentos y para proteger contra los efectos del cambio climático sobre el suelo. Esto es importante tanto para la producción de cultivos como la de ganado (AIC, 2010, *Agriculture Institute of Canada Notes*, 3 de junio, número **22**). No siempre se advierte que el fosfato es una materia prima escasa, probablemente la de mayor importancia. Las reservas de P de alta calidad están disminuyendo y el costo de los fertilizantes está aumentando con rapidez. Las reservas mundiales de fosfato (con >20% de contenido de P₂O₅) parecen estar en el entorno de los 10.000 millones de toneladas. Con un consumo futuro anual de 40-50 millones de toneladas de P₂O₅ estas reservas durarían menos de 200 años (FAO, 2006, *FAO (Food and Agriculture Organization) Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin* **16**, pág. 348). Por consiguiente, el uso de fertilizantes de fósforo necesita ser lo más sensato posible, y es necesario mejorar considerablemente la eficiencia en el uso de nutrientes de los fertilizantes de fósforo. Este es un tema particularmente relevante e importante a la luz de la creciente población mundial.

55 El fósforo está presente en el suelo tanto en formas orgánicas como inorgánicas que difieren en gran medida en términos de solubilidad y movilidad. El fósforo aplicado mediante fertilizantes minerales está en formas inorgánicas

de variada solubilidad. Incluso en dosis óptimas, el uso de fertilizantes minerales y abonos orgánicos puede conducir con el tiempo a la acumulación de P en el suelo. Las plantas absorben el fosfato inorgánico en dos formas solubles: iones monobásicos (H_2PO_4^-) y dibásicos (HPO_4^{2-}) (Vessey, 2003, *Plant and Soil* **255**: 571-586; Banerjee *et al.*, 2006 en *Hand Book of Microbial Biofertilizers* (Rai, ed.) págs. 137-181). Algunos microorganismos del suelo pueden solubilizar estas formas insolubles de P mediante el proceso de producción de ácidos orgánicos, quelación, reacciones de intercambio iónico y formación de sustancias poliméricas, y hacen al P disponible para las plantas (Vessey, 2003; Delvasto *et al.*, 2006, *Indian J. Mar. Sci.* **29**: 48-51; Chang y Yang, 2009, *Bioresour. Technol.* **100**: 1648-1658). Las inoculaciones con microbios solubilizadores de fosfato en las semillas o el suelo se han usado ampliamente para mejorar la producción y el crecimiento de los cultivos mediante la solubilización de fosfatos fijos y aplicados (Nautiyal *et al.*, 2000, *FEMS Microbiology Letters* **182**: 291-296; Adesemoye y Kloepper, 2009, *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**: 1-12). Las bacterias solubilizadoras de fosfato desempeñan una función en la nutrición de P potenciando su disponibilidad para las plantas mediante la liberación de las reservas de P inorgánico y orgánico del suelo mediante solubilización y mineralización. El mecanismo principal en el suelo para la solubilización de los fosfatos minerales es la reducción del pH del suelo mediante la producción microbiana de ácidos orgánicos y la mineralización del P orgánico por la enzima fosfatasa ácida (Sharma *et al.*, 2011, *J. Microbiol. Biotech. Res.* **1(2)**: 90-95). La existencia de microorganismos capaces de solubilizar diversas formas de fosfatos se ha descrito con frecuencia en otros lugares (p.ej., Khan *et al.*, 2009, *J. Agric. Biol. Sci.* **1(1)**: 48-58; Chakkaravarthy *et al.*, 2010, *J. Biol. Sci.* **10(6)**: 531-535) pero aún está por determinar apropiadamente el éxito de utilizar rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) solubilizadoras de P como bioinoculante comercial en diferentes condiciones agroclimáticas en Canadá (así como en EE.UU.). Las PGPR y las bacterias de la rizosfera son organismos libres del suelo que benefician el crecimiento vegetal mediante diferentes mecanismos (Glick, 1995, *Canadian Journal of Microbiology* **41**: 109-117). La capacidad de los microorganismos de solubilizar el fósforo se considera una de las características más importantes asociadas a la nutrición vegetal con P (Chen *et al.*, 2006, *Applied Soil Ecology* **34**: 33-41). Por tanto, un tratamiento biológico de las semillas o un bioinoculante con la formulación adecuada de PGPR naturales solubilizadoras de P tiene un enorme potencial para mejorar la producción de los cultivos agronómicos de pradera, como la colza (*Brassica napus* L.) con un menor coste de insumos (p.ej., Banerjee y Yesmin, 2000, *Agronomy Abstracts*, Annual Meeting, Soil Science Society of America, pág. 257). La colza es uno de los principales cultivos comerciales de las praderas canadienses (aprox. 81.000 kilómetros cuadrados (20 millones de acres)), y cualquier mejora en su potencial de rendimiento sería sustancial para los agricultores así como para la economía de Canadá. Por lo tanto, sería de enorme importancia mejorar la producción de colza con un bioinoculante de PGPR solubilizador de fosfato de rendimiento consistente. En general, la fertilización biológica o los biofertilizantes se basan en el uso de insumos naturales como microorganismos (p.ej., bacterias, hongos), y se usan para mejorar la disponibilidad de los nutrientes del suelo, estimular el crecimiento vegetal, mejorar la estabilidad del suelo, reciclar los nutrientes, promover la simbiosis de las micorrizas y desarrollar un proceso de biorreparación en el suelo (Carvajal-Muñoz y Carmona-García, 2012, *Livestock Research for Rural Development* **24(3)**: págs. 1-7). Por lo tanto, las PGPR solubilizadoras de fosfato naturales podrían tener un potencial real para ser usadas como biofertilizante de la colza para mejorar la producción de colza en la parte occidental de Canadá y en otros lugares.

En la patente de EE.UU. 5.503.652 se explica el aislamiento de cepas que son capaces de promover el alargamiento de las raíces en plantas.

40 En la patente de EE.UU. 5.503.651 se explica el uso de cepas de PGPR en la promoción del crecimiento de cereales, semillas oleaginosas y maíz en base a las capacidades quimiotácticas y de colonización de raíces de las cepas.

En la patente de EE.UU. 6.406.690B1 se explica el uso de la cepa *Bacillus firmus* CNCN I-1582 y de la cepa *Bacillus cereus* CNCN I-1562 para controlar los nematodos patogénicos para las plantas.

45 En la patente de EE.UU. 20060083725A1 se explica el uso de una cepa de *Bacillus firmus* para reducir la enfermedad bacteriana y fúngica en raíces y tubérculos.

En las patentes de China 1355292-A y 1142268-C se explica el uso de la cepa *Bacillus firmus* BC9 KCCM 10865P que tiene una gran capacidad de eliminar olores desagradables y metales pesados de aguas residuales y restos de comida del ganado.

50 En la patente de EE.UU. 5.244.658 se explica el aislamiento de la cepa *Pseudomonas cepacia* que controla la putrefacción de las raíces causada por el hongo *Aphanomyces* en los guisantes.

En la patente de EE.UU. 4.849.008 se explica la aplicación de *Pseudomonas* a las raíces, plantas, semillas, partes de semillas o el suelo de cultivos de tubérculos para mejorar el rendimiento de cultivos de tubérculos.

55 En la patente de EE.UU. 6.194.193 se explica el uso de una formulación para mejorar el crecimiento vegetal, que comprende una mezcla de cepas de *Bacillus* y *Paenbacillus* que producen fitohormonas.

En la patente de EE.UU. 5.589.381 se explica el aislamiento de un elemento de biocontrol que comprende una cepa de *Bacillus licheniformis*, que controla la plaga por *Fusarium* en las plántulas del maíz.

En la patente de EE.UU. 6.232.270 se explica el tratamiento de plantas mediante una composición que contiene un

ingrediente activo desde el punto de vista agrícola y un aditivo potenciador que contiene un cultivo puro de bacterias seleccionadas del género *Bacillus* o bacterias del suelo, y el cultivo añadido puede ser añadido como células, esporas o suspensiones.

5 En la solicitud de patente de Alemania 20110257009 se explica un método que controla de forma curativa hongos fitopatógenos de plantas usando una composición de ditiino-tetracarboximida y un agente de control biológico beneficioso desde el punto de vista agrícola.

En la patente de Canadá 2720739 se explica una formulación acuosa estable desde el punto de vista agrícola que comprende esporas bacterianas, esporas fúngicas y un disolvente orgánico.

10 En la patente de EE.UU. 8.008.545 se explica un método de producción de productos químicos refinados como aminoácidos, vitaminas, carbohidratos, ácidos grasos y carotenoides en un microorganismo, planta, célula vegetal y tejido vegetal.

15 El requisito básico de la producción de cultivos rentables es producir un rendimiento agronómico que pueda maximizar los ingresos netos. Ni siquiera el rendimiento más alto sería de interés si su producción no fuera rentable. A la mayoría de los agricultores les gustaría maximizar las ganancias netas de cualquier inversión que pudieran hacer en insumos. Sin embargo, también se dan cuenta de que las mejores ganancias solo son posibles con una inversión óptima, junto con las decisiones correctas sobre los insumos adecuados e innovadores (como bioinoculantes solubilizadores de P).

20 Se ha realizado mucha investigación sobre el uso de organismos para aumentar la disponibilidad de P en los suelos "desbloqueando" el P presente en formas que, por lo demás, son escasamente solubles. Estos microbios ayudan en la solubilización del P a partir de roca fosfática y otras formas insolubles de P del suelo, y en el proceso que disminuye su tamaño de partícula, reduciéndolo a formas casi amorfas. Datta et al. (1982, *Plant and Soil* **69**: 365-373) informaron de una *Bacillus firmus* solubilizadora de fosfato que produce fitohormonas en el aumento del rendimiento del arroz paddy en los suelos ácidos de Nagaland. DeFreitas et al. (1997, *Biology and Fertility of Soils* **24**: 358-364) mostraron que el uso de bacterias solubilizadoras de fosfato potencia el crecimiento y el rendimiento de la colza, pero la absorción de P de la colza no aumentó. Además de las bacterias, se ha demostrado que el hongo *Penicillium bilaii* aumenta la disponibilidad de P a partir de suelos nativos y fuentes de roca fosfática en suelos calcáreos (Kucey, 1983, *Canadian Journal of Soil Science* **63**: 671-678; Kucey y Leggett, 1989, *Canadian Journal of Soil Science* **69**: 425-432). De hecho, solo hay un producto en América del Norte que contiene un solubilizador de P fúngico de acción única, lo que hace difícil que el inoculante pueda hacer frente a las tensiones medioambientales y sea competitivo. Las bacterias son más eficaces que los hongos en la solubilización del P (Alam et al., 2002, *Intl. J. Agric. Biol.* **4**: 454-458). Entre toda la población microbiana presente en el suelo, las bacterias solubilizadoras de P constituyen 1-50%, mientras que los hongos solubilizadores de P son solo 0,1-0,5% en cuanto al potencial de solubilización de P (Chen et al., 2006, *Appl. Soil Ecol.* **34**: 33-41). Además, generalmente los inoculantes fúngicos son menos competitivos en comparación con los inoculantes bacterianos, y además, las esporas fúngicas tampoco son fáciles de producir en masa. Sin embargo, en algunos otros países (tales como India, Taiwán) las bacterias solubilizadoras de P se están haciendo populares (Zaidi et al., 2009, *Acta Microbio Immunol Hung* **56** (3): 263-284; Chang y Yang, 2009, *Bioresour Technol* **100** (4): 1648-1658; Ekin, 2010, *African Journal of Biotechnology* **9** (25): 3794-3800), y se sitúan a continuación en importancia a los inoculantes de *Rhizobium* fijadores de nitrógeno y además se usa generalmente más de un tipo de organismo en la preparación de los biofertilizantes solubilizadores de P. La presente invención introduce no solo un cultivo puro sino también una estrategia a base de consorcios con múltiples cepas de bacterias solubilizadoras de P. Muestra la viabilidad del uso potencial de bacterias combinadas para formar consorcios sinérgicos, y generará una capacidad competitiva mayor para rendir consistentemente en diferentes condiciones de crecimiento (Yesmin y Banerjee, 2001, en *Proceedings of Saskatchewan Soils and Crops Workshop 2001*, págs. 314-319).

45 Aunque el inoculante del cultivo puro o del consorcio pueda revelar enormes posibilidades para la colza, para que un inoculante biológico sea eficaz desde el punto de vista comercial debe producirse en masa de forma eficiente y formularse de manera rentable, uniforme y de fácil aplicación (Walter y Paau, 1997 en *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*, Metting, Jr., [ed.], págs. 579-594). Los estudios han aportado mucho a la identificación de los posibles agentes microbiológicos activos, sin embargo, se ha investigado poco sobre estos aspectos particulares. El beneficio de la inoculación microbiana para aumentar la producción de los cultivos depende significativamente del número de células vivas introducidas en el suelo (Duquenne et al., 1999, *FEMS Microbiology Ecology* **29**: 331-339). Además, la actividad biológica de los microbios también puede descender rápidamente con los procedimientos de manipulación y almacenamiento. Daza et al. (2000, *Soil Biology and Biochemistry*, **32**: 567-572) evaluaron un inoculante a base de turba y perlita, y demostraron que el adhesivo de sacarosa junto con el vehículo de perlita dieron una mejor viabilidad de las bacterias en las semillas. Una limitación clave para comercializar con éxito microorganismos beneficiosos es superar las dificultades en la creación de un producto final viable, rentable y fácil de usar (Xavier et al., 2004 en *Crop Management Network, Symposium Proceedings Great Plains Inoculant Forum*, Saskatoon, Saskatchewan, págs. 1-6). Por lo tanto, es fundamental determinar la duración de la capacidad de supervivencia bacteriana una vez que se hace el tratamiento bacteriano a las semillas y lograr el nivel necesario de población bacteriana para que el inoculante sea eficaz.

En la mayoría de las tierras canadienses dedicadas a la colza, se usan regularmente semillas tratadas como componente fundamental para controlar las enfermedades vegetales. Estos fungicidas/insecticidas (p.ej., Helix Xtra, Prosper FX, etc.) formulados como suspensión se usan como tratamientos para las semillas para controlar el marchitamiento fúngico (*damping off*) previo a la emergencia, la putrefacción de las semillas y otras enfermedades que se transmiten en el suelo. Se prevé que puede que los cultivos bacterianos no sobrevivan con estos pesticidas aplicados a las dosis recomendadas, debido a su alta toxicidad para las bacterias (Yesmin y Banerjee, 2000, *Agronomy Abstracts*, Annual Meeting, Soil Science Society of America, pág. 257; Yesmin y Banerjee, 2001). La innovadora estrategia de los autores de la invención de formulaciones solubilizadoras de P permitirá una alta capacidad de supervivencia de las bacterias introducidas a través de diversas limitaciones medioambientales, asegurando de este modo un rendimiento más alto y una productividad mayor. Esto también resolverá problemas relacionados con los productos químicos para el tratamiento de las semillas y dará flexibilidad a los agricultores en términos de elección de productos químicos para el tratamiento de las semillas. Asegurar una alta capacidad de supervivencia de estas bacterias asegurará en última instancia una mayor disponibilidad de P y una menor utilización de costosos fertilizantes de P para los cultivos.

15 Compendio de la invención

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un cultivo bacteriano que consiste en un cultivo biológicamente puro de XSB375, identificado como *Bacillus firmus* (ATCC# PTA-120309).

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un cultivo bacteriano que consiste en un cultivo biológicamente puro de XSB375, identificado como *Bacillus firmus* (ATCC# PTA-120309), capaz de solubilizar el fosfato.

Según un tercer aspecto de la invención, se proporciona un método para aumentar el crecimiento y rendimiento vegetales, que comprende:

inocular en un entorno de suelo o mezcla para macetas un cultivo biológicamente puro de XSB375, identificado como *Bacillus firmus* (ATCC# PTA-120309), y

25 cultivar una planta en dicho entorno de suelo o mezcla para macetas.

Según un cuarto aspecto de la invención, se proporciona una composición de materia que comprende una PGPR solubilizadora de fosfato XSB375, identificada como *Bacillus firmus* (ATCC# PTA-120309); y

un vehículo compatible desde el punto de vista agrícola.

Según un quinto aspecto de la invención, se proporciona una composición de materia que comprende una PGPR solubilizadora de fosfato XSB375, identificada como *Bacillus firmus* (ATCC# PTA-120309), en suspensión líquida.

También se describe una semilla recubierta con la PGPR solubilizadora de fosfato XSB375, identificada como *Bacillus firmus* (ATCC# PTA-120309).

También se describe una aplicación en semillas o aplicación en suelos o aplicación foliar o aplicación posterior a la emergencia con una PGPR solubilizadora de fosfato XSB375, identificada como *Bacillus firmus* (ATCC# PTA-120309).

También se describe una PGPR solubilizadora de fosfato XSB375, identificada como *Bacillus firmus* (ATCC# PTA-120309), para ser utilizada como biofertilizante.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Cepa de PGPR XSB375, que muestra una zona de aclaramiento mediante solubilización de fosfato. Por lo tanto, la cepa es una rizobacteria solubilizadora de fosfato.

Figura 2: Se representó la emergencia de semillas de colza en suelo después de la inoculación de la cepa de PGPR XSB375 en las semillas de colza, en comparación con un control durante un máximo de 10 días. La cepa bacteriana potenció la emergencia de las semillas de colza en comparación con el control sin inocular.

Figura 3: Se representó el crecimiento de pelos radiculares finos de colza después de la inoculación de cepas de PGPR XSB375 en las semillas de colza, en comparación con el control a los 3 días. La cepa potenció el crecimiento de la raíz en comparación con el control.

Figura 4: Se representó el crecimiento de la raíz y el hipocótilo de colza a los 7 días para semillas en las que se había inoculado la cepa de PGPR XSB375, en comparación con el control en una bolsa de crecimiento. El crecimiento de la raíz y los hipocótilos mejoró considerablemente debido a la inoculación de la cepa XSB375 en comparación con el control.

Figura 5: Se midió el crecimiento de la raíz y el hipocótilo de colza a los 7 días para las semillas en las que se había

inoculado la cepa de PGPR XSB375, en comparación con el control en una bolsa de crecimiento. El crecimiento de la raíz y los hipocótilos mejoró considerablemente debido a la inoculación de la cepa XSB375 en comparación con el control.

5 Figura 6: Viabilidad de la cepa de PGPR XSB375 en suspensión líquida. El recuento bacteriano mostró que estaba muy por encima de 1×10^9 ufc/ml a los 244 días. Por lo tanto, la capacidad de supervivencia bacteriana en la suspensión líquida sería de más de 244 días.

10 Figura 7: Rendimientos de colza en los centros de estudios de campo en Regent, Dakota del Norte; Hazen, Dakota del Norte; y Bottineau, Dakota del Norte, en el año 2012. El tratamiento con la PGPR XSB375 aumentó el rendimiento de la colza en 19,4% en comparación con el control en el centro de Regent, Dakota del Norte. El tratamiento con la PGPR XSB375 aumentó el rendimiento de la colza en 14,6% en comparación con el control en el centro de Hazen, Dakota del Norte. El tratamiento con la PGPR XSB375 aumentó el rendimiento de la colza en 6,6% en comparación con el control en el centro de Bottineau, Dakota del Norte. Por lo tanto, el tratamiento con la PGPR XSB375 aumentó el rendimiento de la colza en un promedio de 13,5% en comparación con el control sin inocular.

Descripción de las realizaciones preferidas

15 A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece la invención.

Definiciones

20 Como se emplea en la presente memoria, "biológicamente puro" se refiere a un cultivo en donde prácticamente todas las células presentes son de la cepa seleccionada.

Como se emplea en la presente memoria, "inocular" se refiere a introducir al menos una bacteria en un medio; por ejemplo, un medio líquido, granular, polvo de turba, semilla o un entorno de suelo.

Como se emplea en la presente memoria, "PGPR" o "rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal" se refiere a aislamientos beneficiosos para las plantas que habitan en el área que rodea las raíces de las plantas.

25 Como se emplea en la presente memoria, "entorno de suelo" se refiere al suelo en el que se cultiva o está creciendo una planta.

Como se emplea en la presente memoria, "XSB375" se refiere a *Bacillus firmus*, depositada en la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de depósito PTA-120309 el 23 de abril de 2013.

30 Como apreciará un experto en la técnica, como se emplea en la presente memoria, "PGPR solubilizadoras de fosfato" se refiere a cultivos y aislamientos bacterianos beneficiosos, así como extractos celulares (extracelulares o intracelulares) o enzimas purificadas o genes aislados a partir de los mismos, o ADN aislado a partir de los mismos derivado a partir de los mismos que tienen la capacidad de solubilizar el fosfato, promover la absorción de fósforo, mejorar el crecimiento y el desarrollo vegetales y/o mejorar el rendimiento vegetal.

35 En la presente memoria se describe el aislamiento e identificación de una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR) solubilizadora de fosfato: XSB375, identificada como *Bacillus firmus* (ATCC# PTA-120309). La PGPR es capaz de solubilizar el fosfato, lo cual aumenta el fósforo disponible para las plantas. La PGPR XSB375 potencia la germinación de las semillas, la emergencia temprana, el vigor de las plantas, el crecimiento de las raíces y los brotes, y el rendimiento de los cultivos. Este aumento del rendimiento de los cultivos se atribuye no solo a la mayor solubilización del fosfato (que hace que la planta tenga más fósforo disponible) sino también al hecho de que aumenta la disponibilidad de otros nutrientes vegetales esenciales para la planta. La aplicación de esta PGPR solubilizadora de fosfato puede hacerse como suspensión líquida o como materiales sólidos aplicados al suelo, mezcla para macetas, semillas, partes de semillas, plántulas, follaje, materiales de vehículo, raíces y suelo de siembra. Por ejemplo, las PGPR solubilizadoras de fosfato pueden usarse para recubrir una semilla o parte de una semilla, pueden aplicarse como polvo, pueden aplicarse como líquido, pueden usarse para aplicación foliar o aplicarse como suspensión a un entorno de suelo o pueden mezclarse en un entorno de suelo antes del uso del entorno de suelo para plantar.

45 Por consiguiente, en un aspecto de la invención, se proporciona un cultivo bacteriano biológicamente puro de XSB375 (*Bacillus firmus*).

50 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para aumentar el crecimiento o rendimiento vegetales que comprende inocular la PGPR solubilizadora de fosfato XSB375 (*Bacillus firmus*) en un entorno de suelo o mezcla para macetas; y cultivar una planta en dicho entorno de suelo o mezcla para macetas.

Como se discute en la presente memoria, en algunas realizaciones, el entorno de suelo o la mezcla para macetas incluye fósforo como fertilizante. Específicamente, la presencia de PGPR XSB375 dará como resultado una mayor y más eficaz absorción del fósforo por las plantas. Es decir, la aplicación de XSB375 al entorno de suelo o la mezcla

- para macetas logra al menos uno de los siguientes: promover la absorción de P en una planta; aumentar la solubilización de fosfato a H_2PO_4^- dentro del entorno de suelo; aumentar la solubilización de fosfato a HPO_4^{2-} en el entorno de suelo; paliar una deficiencia de P en una planta; paliar la deficiencia de P en un suelo con deficiencia de P fertilizado con fertilizantes de P; promover la absorción de macronutrientes en una planta; y promover la absorción de micronutrientes en una planta. Como apreciará un experto en la técnica, también pueden observarse o lograrse otros beneficios mediante la aplicación de la PGPR XSB375 al entorno de suelo o la mezcla para macetas. Tales beneficios adicionales serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.
- 5 Como apreciará un experto en la técnica, la planta puede ser cualquier planta adecuada; por ejemplo, una planta que se beneficiaría de una absorción de P aumentada, como se discutió anteriormente.
- 10 En algunas realizaciones, la planta se selecciona del grupo que consiste en semillas oleaginosas, leguminosas, no leguminosas, cereales, raíces, hortalizas, gramíneas, forraje, césped, frutales y plantas de florecimiento.
- Alternativamente, en otras realizaciones, la planta se selecciona del grupo que consiste en colza, soja, girasol, lino, cáñamo, trigo, cebada, maíz, mijo, avena, guisante, lenteja, frijoles, cacahuets, alfalfa, trébol, remolacha, patatas, zanahorias, repollos, tomates, rábanos, pimiento, pepino, gramíneas, césped, melón cantalupo, melón, frutas y flores. Las flores pueden seleccionarse del grupo que consiste en rosa, crisantemo, lirio y gerbera.
- 15 Como se discutió en la presente memoria, la XSB375 puede mezclarse en el entorno de suelo o la mezcla para macetas. Por ejemplo, la XSB375 puede aplicarse al suelo como suspensión líquida, por ejemplo, en una planta, en una planta posemergente, en una semilla, en una plántula o en materiales de vehículo, como se discutió en la presente memoria.
- 20 En algunas realizaciones, la XSB375 se aplica al entorno de suelo como recubrimiento en una semilla, como se discutió anteriormente.
- En otras realizaciones, se proporciona una composición de materia que comprende una PGPR solubilizadora de fosfato XSB375 (*Bacillus firmus*) y un vehículo compatible desde el punto de vista agrícola.
- 25 Como apreciará un experto en la técnica, el vehículo puede ser una semilla recubierta de XSB375. La semilla puede estar recubierta de turba, arcilla, mineral, vermiculita o polímero.
- Alternativamente, el vehículo puede ser una suspensión líquida, por ejemplo, un aceite compatible desde el punto de vista agrícola.
- En otras realizaciones, el vehículo puede ser un material granular, por ejemplo, turba, arcilla o gránulos de perlita o una mezcla de los mismos.
- 30 Como apreciará un experto en la técnica, la XSB375 puede co-aplicarse, simultáneamente o bien en serie, con otros tratamientos adecuados aplicados al entorno de suelo para mejorar adicionalmente el crecimiento vegetal. Por ejemplo, la XSB375 puede aplicarse con otra cepa de PGPR o con un herbicida o fungicida o insecticida o tratamiento para semillas compatible.
- 35 En los ejemplos, la planta es colza, que, como se discutió anteriormente, es un cultivo que requiere mucho fósforo. Sin embargo, como será evidente para un experto en la técnica, como se discutió anteriormente, la PGPR solubilizadora de fosfato descrita en la presente memoria puede usarse para promover el crecimiento de cualquier planta adecuada, por ejemplo, cereales, por ejemplo maíz, trigo, cebada, avena y similares; semillas oleaginosas, por ejemplo colza, lino, cáñamo, girasol y similares; legumbres, por ejemplo, soja, guisante, lenteja y similares; raíces, por ejemplo, remolachas, patatas, rábanos y similares; forrajes, por ejemplo, alfalfa, trébol, gramíneas y similares; hortalizas, por ejemplo, tomate, pimiento, pepino y similares; césped, por ejemplo, agrostis, pasto azul de Kentucky y similares. Es decir, la PGPR solubilizadora de fosfato puede potenciar el crecimiento de cualquiera y todas las plantas adecuadas que tengan requerimientos de fósforo como nutriente.
- 40 De manera similar, en algunas realizaciones de la invención, las PGPR solubilizadoras de fosfato se usan en un entorno de suelo que tiene niveles bajos de fósforo o niveles bajos de fósforo disponible para la planta o fósforo sumamente bloqueado. Es de apuntar que, como se discutió anteriormente, las PGPR solubilizadoras de fosfato pueden usarse en todas las condiciones de suelo adecuadas, ya que la presencia de PGPR solubilizadoras de fosfato promoverá un uso más eficiente del fósforo en las plantas cultivadas en un entorno de suelo y promoverá de este modo el crecimiento de las plantas cultivadas en el entorno de suelo. Por lo tanto, las PGPR descritas anteriormente son capaces de solubilizar el fosfato; promover la absorción de P en las plantas; capaces de paliar una deficiencia de P en las plantas; y capaces de paliar la deficiencia de P en un suelo deficiente en P fertilizado con un fertilizante de P.
- 45 50 Las PGPR solubilizadoras de fosfato pueden aplicarse a un entorno de suelo que se ha tratado o se tratará con un fertilizante que contiene fósforo; por ejemplo, fosforita. Es de apuntar también que las PGPR solubilizadoras de fosfato pueden promover la absorción del fósforo y otros macro- y micronutrientes dentro del entorno de suelo, ya sea proporcionado por un fertilizante o no.
- 55

En otras realizaciones, las PGPR solubilizadoras de fosfato están en combinación con un material de vehículo. El material de vehículo puede ser un líquido, gránulo, masa granular, polvo, mineral u otro elemento similar, o puede ser una semilla de planta. Específicamente, una semilla puede recubrirse con PGPR solubilizadoras de fosfato usando métodos conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, las PGPR solubilizadoras de fosfato pueden mezclarse con turba, arcilla, perlita, vermiculita, mineral, polímero o aceite compatible desde el punto de vista agrícola.

Las PGPR solubilizadoras de fosfato pueden liofilizarse hasta un polvo. Alternativamente, se puede secar una suspensión acuosa de las PGPR solubilizadoras de fosfato hasta un polvo a una temperatura que no afecte de manera adversa a la viabilidad bacteriana. El polvo microbiano puede mezclarse con materiales térreos, minerales, arcilla, talco, turba u otros materiales compatibles desde el punto de vista agrícola. También puede usarse una suspensión líquida de las PGPR solubilizadoras de fosfato para recubrir las semillas o aplicarse a un material absorbente, por ejemplo, un material granular, o aplicarse como pulverización foliar en el suelo o las plantas.

Como apreciará un experto en la técnica, la capacidad de supervivencia del cultivo bacteriano aplicado es uno de los factores críticos para la colonización con éxito de la rizósfera y el rizoplaneo que da como resultado el crecimiento, desarrollo y rendimiento vegetales. Por ejemplo, la variabilidad de escala del suelo y el paisaje, el estado de los nutrientes y las condiciones climáticas pueden afectar a la capacidad de supervivencia bacteriana y el rendimiento de los cultivos. Por lo tanto, la cepa bacteriana XSB375, identificada como *Bacillus firmus*, es eficaz a nivel individual en la promoción del crecimiento vegetal, como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, pueden usarse mezclas de XSB375 y cualesquiera otras PGPR en las realizaciones de la invención descrita en la presente memoria. Es de apuntar también que algunas combinaciones pueden funcionar mejor en condiciones físico-químicas específicas del suelo, tales como el pH del suelo, temperatura de crecimiento, momento de la plantación y especie de cultivo. Estas combinaciones están dentro del alcance de la invención y de los experimentos de rutina en la técnica.

Como apreciarán los expertos en la técnica, las PGPR solubilizadoras de fosfato pueden aplicarse con otros agentes pesticidas adecuados; por ejemplo, herbicidas, fungicidas, insecticidas, productos químicos para el tratamiento de las semillas u otras PGPR, y usarse en las realizaciones descritas en la presente memoria. Es decir, aplicar las PGPR solubilizadoras de fosfato con otros agentes PGPR biopesticidas o pesticidas puede potenciar adicionalmente el crecimiento vegetal. De manera similar, combinar las PGPR solubilizadoras de fosfato descritas anteriormente con otras PGPR promotoras del crecimiento vegetal puede tener un efecto sinérgico en la promoción del crecimiento vegetal. Es de apuntar que estas combinaciones pueden usarse en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, por ejemplo, para recubrir semillas o aplicación foliar líquida.

La invención se describirá ahora mediante ejemplos. Sin embargo, es de entender que los ejemplos son para fines ilustrativos, y la invención no se limita necesariamente a los ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1 - aislamiento de rizobacterias solubilizadoras de fosfato:

Se aislaron bacterias del suelo de la rizósfera y del rizoplaneo de colza de Elm Creek, Manitoba, mediante una técnica de dilución seriada y un método de extensión en placa. Los medios basales de laboratorio usados fueron agar tripticasa de soja (TSA, 1/10 de concentración), y las placas se incubaron durante 3 días a 28°C. Todos los aislamientos rizobacterianos se seleccionaron para representar tipos diferenciados en base a la morfología de las colonias, lo que incluye forma de las colonias, elevación, opacidad y producción de pigmentos. Los aislamientos rizobacterianos volvieron a sembrarse en estrías en placas de TSA, se verificó su pureza y se almacenaron en tubos inclinados de TSA a 4°C. Las supuestas rizobacterias solubilizadoras de fosfato se aislaron sembrando en estrías los aislados sobre placas con medio PDYA (agar de extracto de patata, dextrosa, levadura) modificado (de Freitas et al., 1997). El medio modificado consiste en el medio PDYA con fosfato de calcio recién precipitado (es decir, 50 ml de K_2HPO_4 estéril al 10% [p/vol] y 100 ml de $CaCl_2$ estéril al 10% [p/vol]) añadido por litro de PDYA estéril para producir un precipitado de $CaHPO_4$ (Katznelson y Bose, 1959, *Can J Microbiol* 5: 79-85).

Ensayo de solubilización de fosfato:

Se evaluó cualitativamente la capacidad de los aislamientos rizobacterianos de solubilizar el fosfato usando medio modificado de PDYA (de Freitas et al., 1997). El medio modificado consiste en el medio de PDYA con fosfato de calcio recién precipitado (es decir, 50 ml de K_2HPO_4 estéril al 10% [p/vol] y 100 ml de $CaCl_2$ estéril al 10% [p/vol]) añadido por litro de PDYA estéril de modo de producir un precipitado de $CaHPO_4$ (Katznelson y Bose, 1959). Cada aislamiento rizobacteriano se sembró en estrías en placa de PDYA-CaP, placa de TSA-CaP y placa de TY (extracto de levadura tripton)-CaP modificado, y se incubó a 28°C. Se evaluó la capacidad de solubilización de fosfato durante un máximo de 14 días midiendo la zona de aclaramiento (área de solubilización) que rodea a la colonia bacteriana. Entre las presuntas cepas rizobacterianas solubilizadoras de fosfato aisladas del rizoplaneo y la rizósfera de colza, la cepa bacteriana XSB375 produjo la zona de aclaramiento más temprana y más grande en las placas con fosfato precipitado (Figura 1).

Ejemplo 2 - efecto de la inoculación en la emergencia de las semillas de colza:

La cepa bacteriana XSB375 se cultivó en 100 ml de caldo de TY durante 48 horas en un agitador rotatorio. El cultivo de células bacterianas se concentró por centrifugación y se lavó con agua destilada y se suspendió en disolución de NaCl. La suspensión bacteriana se inoculó a continuación en las semillas de colza desinfectadas en superficie. Las semillas inoculadas se colocaron en placas de agar para observar el efecto bacteriano sobre la emergencia de las semillas de colza (Tabla 1). Un conjunto de semillas sin inocular se colocaron también en placas de agar como control. También se plantaron semillas inoculadas en macetas de tierra y bolsa de crecimiento para examinar el efecto bacteriano en la tierra (Figura 2) y en la bolsa de crecimiento (Tabla 2). Los resultados ilustraron que la cepa XSB375 inoculada en las semillas de colza potenció la emergencia de las semillas en la placa de agar, en la tierra y en la bolsa de crecimiento en comparación con el control (Tablas 1 y 2, Figuras 2 y 3).

10 Ejemplo 3 - efecto de la inoculación en la promoción del crecimiento de colza en bolsa de crecimiento:

La suspensión bacteriana se inoculó en semillas de colza desinfectada en superficie. Las semillas inoculadas se plantaron en bolsas de crecimiento para examinar el efecto bacteriano sobre la promoción del crecimiento de la colza (Figura 4). Un conjunto de semillas sin inocular se colocaron también en bolsas de crecimiento como control. Se midió la longitud de las raíces y los hipocótilos de las plantas después de 7 días (Figura 5). Los resultados ilustraron que la cepa XSB375 inoculada en las semillas de colza potenció la promoción del crecimiento en las bolsas de crecimiento en comparación con el control (Figuras 4 y 5). La cepa bacteriana XSB375 potenció considerablemente el crecimiento de la raíz (media de longitud de 14,26 cm) y del hipocótilo de colza (media de longitud de 7,11 cm) en comparación con la raíz (5,94 cm) y el hipocótilo (media de longitud de 5,14 cm) del control.

Ejemplo 4 - viabilidad de las bacterias en semillas, en polvo de turba y en suspensión líquida:

20 El beneficio de la inoculación microbiana para una mayor producción de los cultivos es afectado considerablemente por el número de células vivas introducidas en el suelo (Duquenne et al., 1999). Además, la actividad biológica de los microbios también puede descender rápidamente con los procedimientos de manipulación y almacenamiento. Es importante evaluar la duración de la viabilidad bacteriana en el tratamiento de las semillas o en los materiales de vehículo para obtener el nivel deseado de población microbiana para que el inoculante sea eficaz. Las semillas con la cepa XSB375 inoculada conservaron un recuento celular viable muy por encima del nivel deseado hasta 21 días después de la inoculación (Tabla 3). El recubrimiento de las semillas aumentó generalmente la viabilidad bacteriana, ya que el recubrimiento impide que las células se sequen y mantiene a las bacterias vivas por un período mucho más prolongado.

30 Se ensayó la cepa XSB375 en cuanto a la viabilidad y vida útil con diferentes materiales de vehículo inoculantes, tales como medios líquidos, polvo de turba, etc. La cepa bacteriana XSB375 se cultivó en caldo de TY modificado durante 48 horas y se mezcló con medios líquidos formulados específicamente, usados como vehículo líquido. Las bacterias cultivadas en el caldo de TY también se usaron directamente para inocular polvo de turba esterilizado disponible en el mercado. La viabilidad bacteriana se ensayó periódicamente tanto para la suspensión líquida como para el polvo de turba. Se demuestra que cuando la cepa rizobacteriana XSB375 se inoculó en bolsas de turba estéril, la capacidad de supervivencia de la cepa aumentó hasta 244 días en más de 10^9 ufc por gramo de material de vehículo (Tabla 4). Además, cuando las bacterias XSB375 se inocularon y se mantuvieron en suspensión líquida en una bolsa estéril, el análisis mostró que la cepa bacteriana XSB375 siguió siendo viable durante más de 240 días y el recuento bacteriano viable se situó en más de 1×10^9 ufc/ml (Figura 6). Se encontró que tanto la formulación líquida como la de turba son materiales de vehículo eficaces para la cepa de PGPR XSB375, para mantener la vida útil deseada del producto.

Ejemplo 5 - efecto de la inoculación de PGPR sobre el rendimiento de la colza en estudios de campo:

En 2012, se llevaron a cabo tres estudios de campo usando la cepa de PGPR XSB375. En estos estudios, la colza se plantó mediante una sembradora comercial, y se aplicó un tratamiento foliar bacteriano durante la primera aplicación de herbicidas posemergencia usando mezcla en tanque. Se usó un cultivar de colza tolerante a los herbicidas, y todos los estudios de campo se hicieron conforme a un diseño de parcelas divididas; cada parcela tenía un tamaño de 0,04 kilómetros cuadrados (10 acres), con un tratamiento bacteriano junto a un control, replicado tres a cuatro veces. Los tratamientos se diseñaron para evaluar la capacidad bacteriana de potenciar el rendimiento de la colza. Las parcelas se cosecharon en la madurez, las semillas se recolectaron y se limpiaron, y el rendimiento se midió en base a una humedad de las semillas de 8,5%. En la Figura 7 se presentan los datos del rendimiento de la colza de los centros de Regent, Dakota del Norte; Hazen, Dakota del Norte y Bottineau, Dakota del Norte. En la Figura 7 se muestra que el tratamiento con la cepa de PGPR XSB375 aumentó el rendimiento de la colza en 19,4% en comparación con el control en Regent, Dakota del Norte; 14,6% en comparación con el control en Hazen, Dakota del Norte; y 6,6% en comparación con el control en Bottineau, Dakota del Norte; mientras que el tratamiento con la PGPR XSB375 aumentó el rendimiento de la colza en un promedio de 13,5% en comparación con el control sin inocular en todos los centros de Dakota del Norte.

Ejemplo 6 - identificación de la cepa rizobacteriana:

La cepa bacteriana XSB375 se cultivó en medios de TY modificados durante 48 horas. A continuación, se extrajo el ADN bacteriano de las bacterias para la identificación del 16S ADN y 500 bp (pares de bases) usando los servicios

de MIDI LABS (Newark, Delaware). La cepa se identificó como *Bacillus firmus* XSB375.

Tabla 1. Efecto de la inoculación bacteriana sobre la emergencia de las semillas de colza en placa de agar

Tratamiento	Emergencia porcentual (%)			
	2 días	4 días	6 días	8 días
Control	60	99	99	99
Semilla inoculada	80	100	100	100

Tabla 2. Efecto de la inoculación bacteriana sobre la emergencia de las semillas de colza en bolsa de crecimiento

Tratamiento	Emergencia porcentual (%)			
	2 días	4 días	6 días	8 días
Control	60	94	99	99
Semilla inoculada	80	100	100	100

5

Tabla 3. Viabilidad de las rizobacterias XSB375 en semillas de colza inoculadas

Tratamiento	UFC X 10 ⁵ por semilla			
	4 días	7 días	14 días	21 días
Control	0	0	0	0
Semilla inoculada	63	42	34	12

Tabla 4. Viabilidad de las rizobacterias XSB375 en polvo de turba inoculada

Cepa bacteriana	Período de incubación (días)	UFC/g de vehículos de turba
XSB375	32	>10 ⁹
	64	>10 ⁹
	125	>10 ⁹
	244	>10 ⁹

10

REIVINDICACIONES

1. Un cultivo bacteriano biológicamente puro de XSB375 (*Bacillus firmus*) ATCC# PTA-120309.
2. Un método para aumentar el crecimiento y/o rendimiento vegetales, que comprende:
 - 5 inocular la rizobacteria PGPR solubilizadora de fosfato XSB375 (*Bacillus firmus*) ATCC# PTA-120309 en entorno de suelo o mezcla para macetas; y
 - cultivar una planta en dicho entorno de suelo o mezcla para macetas.
3. El método según la reivindicación 2, en donde el entorno de suelo o la mezcla para macetas incluye fósforo como fertilizante.
4. El método según la reivindicación 2, en donde las PGPR promueven la absorción de P en una planta.
- 10 5. El método según la reivindicación 2, en donde la PGPR es capaz de solubilizar el fosfato a $H_2PO_4^-$ o HPO_4^{2-} .
6. El método según la reivindicación 2, en donde la PGPR es capaz de paliar una deficiencia de P en una planta o suelo o suelo deficiente en P fertilizado con fertilizante de P.
7. El método según la reivindicación 2, en donde las PGPR promueven la absorción de macronutrientes o micronutrientes en una planta.
- 15 8. El método según la reivindicación 2, en donde la planta es una semilla oleaginosa, legumbre, no legumbre, cereal, raíz, hortaliza, gramínea, forraje, césped, frutas y planta de florecimiento.
9. El método según la reivindicación 2, en donde la planta se selecciona del grupo que consiste en colza, soja, girasol, lino, cáñamo, trigo, cebada, maíz, mijo, avena, guisante, lenteja, judías, cacahuete, alfalfa, trébol, remolachas, patatas, zanahorias, repollos, tomates, rábanos, pimiento, pepino, gramíneas, césped, melón cantalupo, melón, frutas y flores.
- 20 10. El método según la reivindicación 2, en donde la PGPR solubilizadora de fosfato se aplica al entorno de suelo como suspensión líquida.
11. El método según la reivindicación 10, en donde la suspensión líquida se aplica sobre planta, sobre planta posemergente, sobre semilla, sobre plántula o sobre materiales de vehículo.
- 25 12. El método según la reivindicación 2, en donde la PGPR solubilizadora de fosfato se aplica al entorno de suelo como una semilla recubierta.
13. Una composición de materia que comprende una PGPR solubilizadora de fosfato XSB375 (*Bacillus firmus*) ATCC# PTA-120309; y
- un vehículo compatible desde el punto de vista agrícola.
- 30 14. La composición de materia según la reivindicación 13, en donde el vehículo es una semilla.
15. La composición de materia según la reivindicación 14, en donde la semilla se recubre con PGPR solubilizadora de fosfato.
16. La composición de materia según la reivindicación 15, en donde la semilla se recubre con turba o arcilla o mineral o vermiculita o polímero.
- 35 17. La composición de materia según la reivindicación 13, en donde el vehículo es una suspensión líquida.
18. La composición de materia según la reivindicación 17, en donde el vehículo es un aceite compatible desde el punto de vista agrícola.
19. La composición de materia según la reivindicación 13, en donde el vehículo es un material granular.
20. La composición de materia según la reivindicación 13, en donde el material granular es turba o arcilla o gránulos de perlita o mezcla de los mismos.
- 40 21. El método según la reivindicación 2, que incluye aplicar a dicho entorno de suelo un producto químico herbicida o fungicida o insecticida o de tratamiento de semillas compatible.
22. El método según la reivindicación 2, en donde la PGPR se usa como consorcios con microorganismos simbióticos o microorganismos no simbióticos o en combinación con otras PGPR o en combinación con otros microorganismos de biocontrol o con sustancias promotoras del crecimiento vegetal.
- 45

Figura 1. Rizobacterias XSB375 que muestran actividad solubilizadora de fosfato en placa de agar que contiene fosfato insoluble

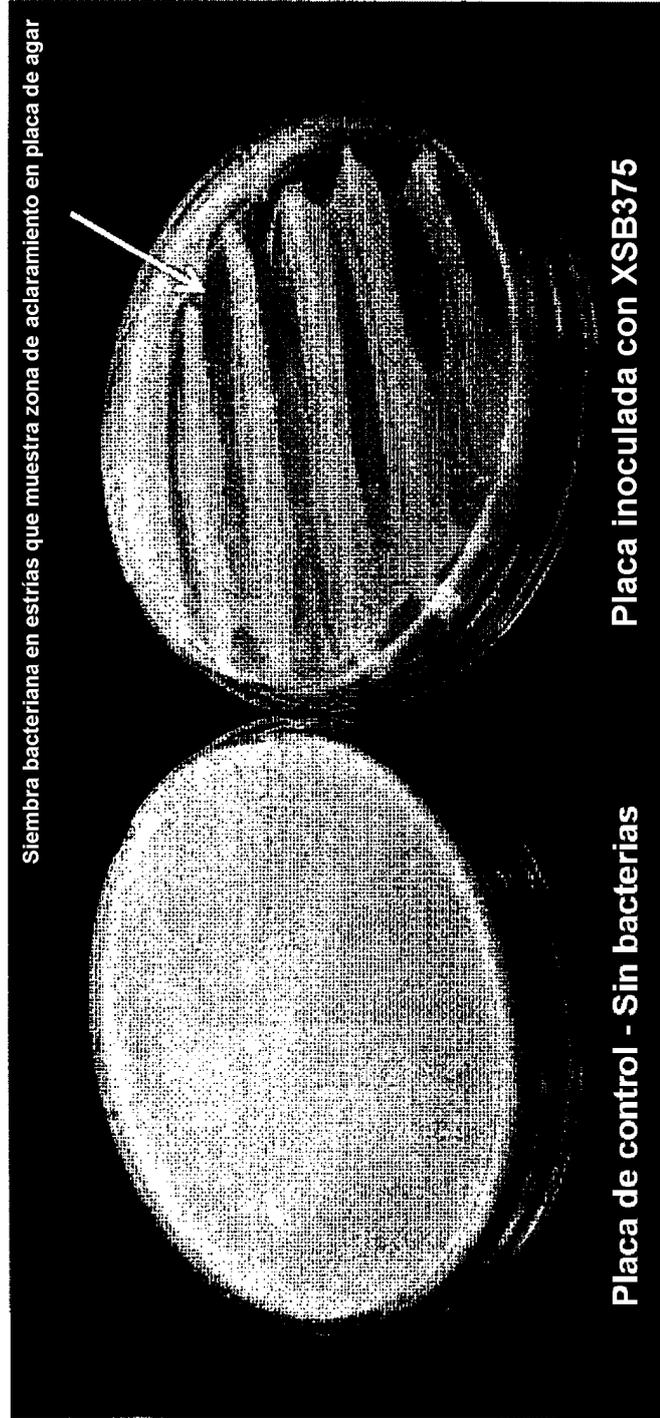


Figura 2. Porcentaje (%) de semilla de colza germinada en suelo

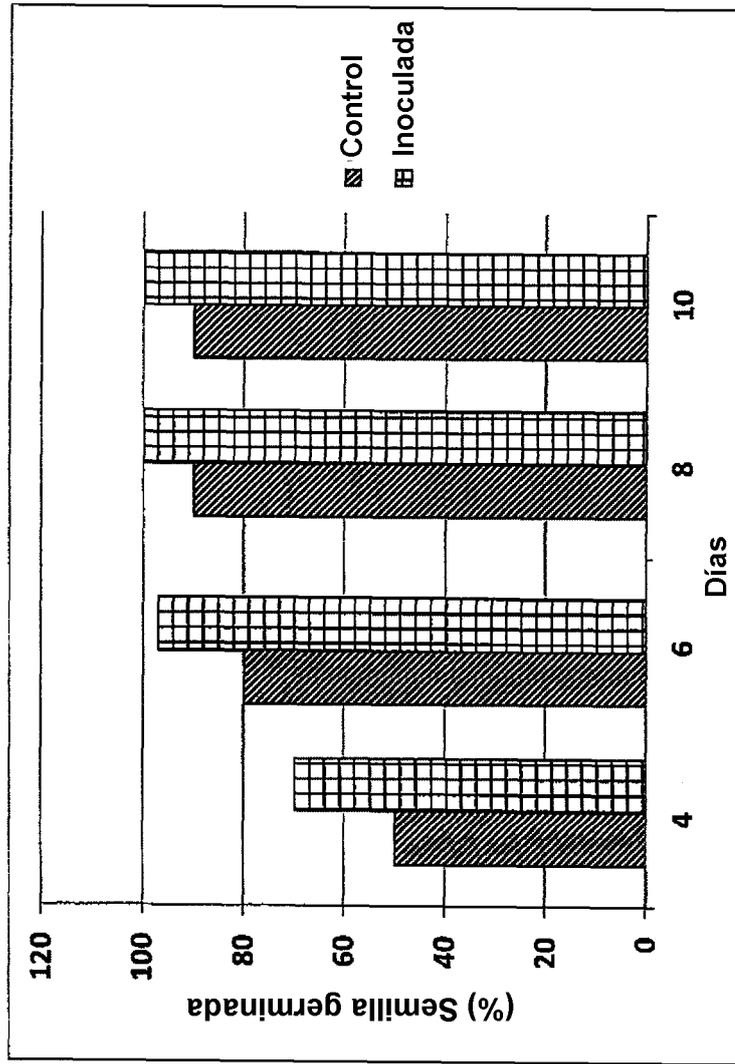


Figura 3. Semilla de colza inoculada con rizobacterias XSB375 que muestran el efecto sobre el crecimiento de pelos de raíces finos

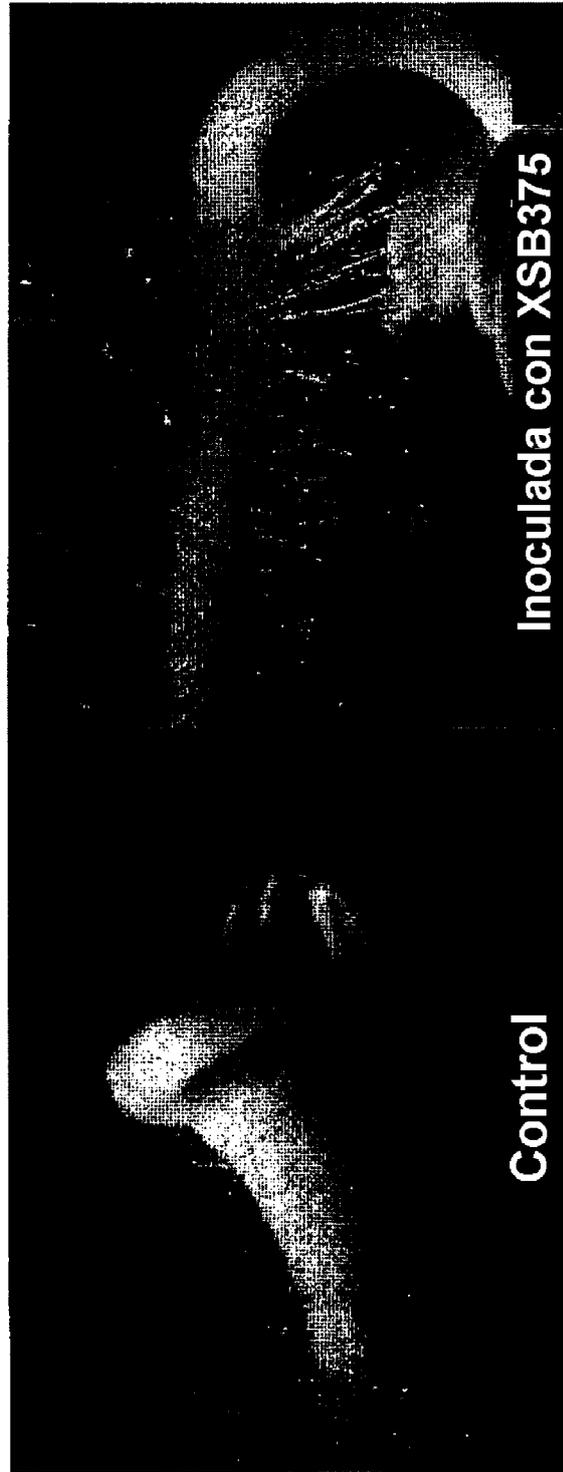


Figura 4. Crecimiento de raíz e hipocótilo de colza a 7 días en bolsa de crecimiento

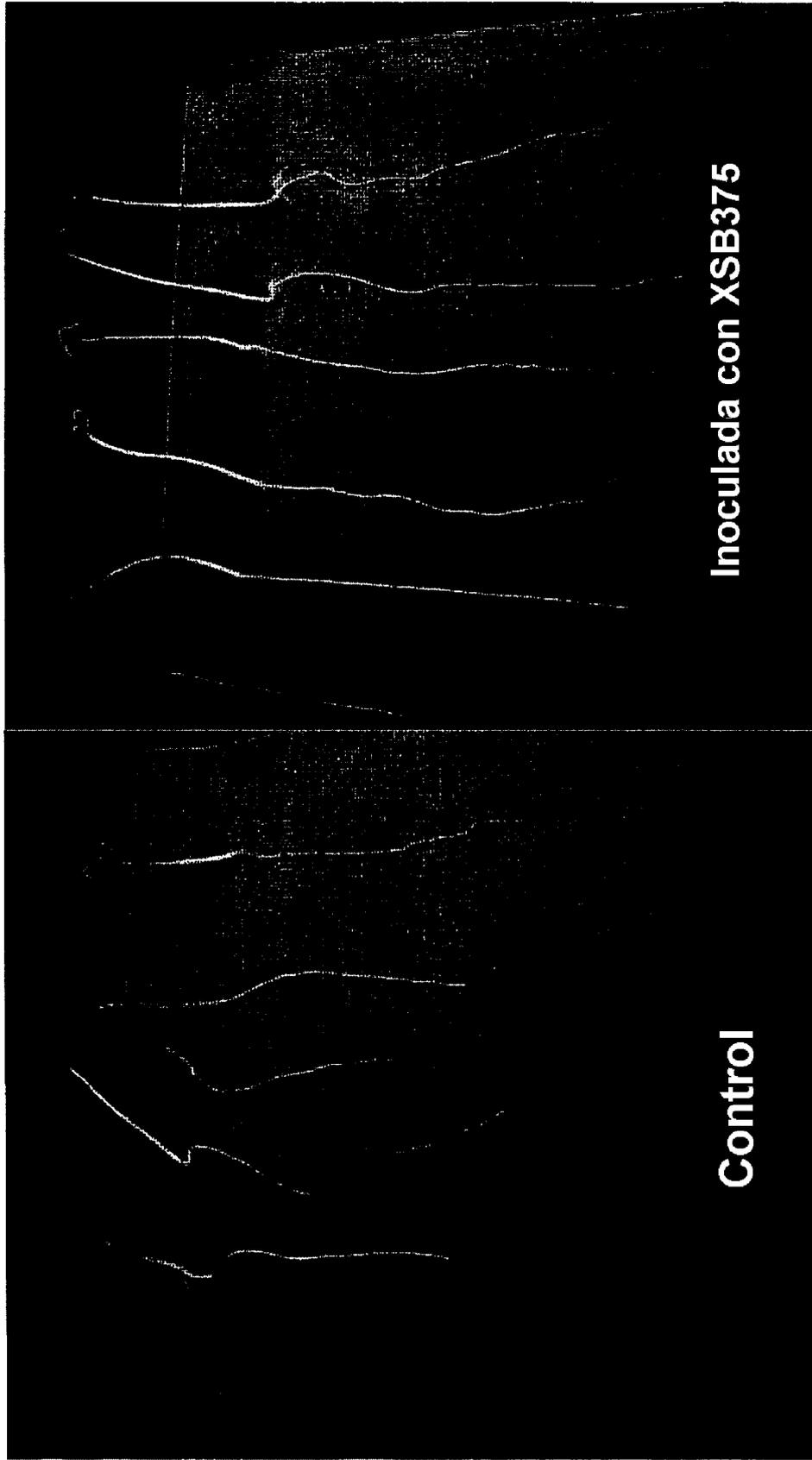


Figura 5. Efecto de la inoculación bacteriana sobre la longitud de raíz e hipocótilo de colza a 7 días

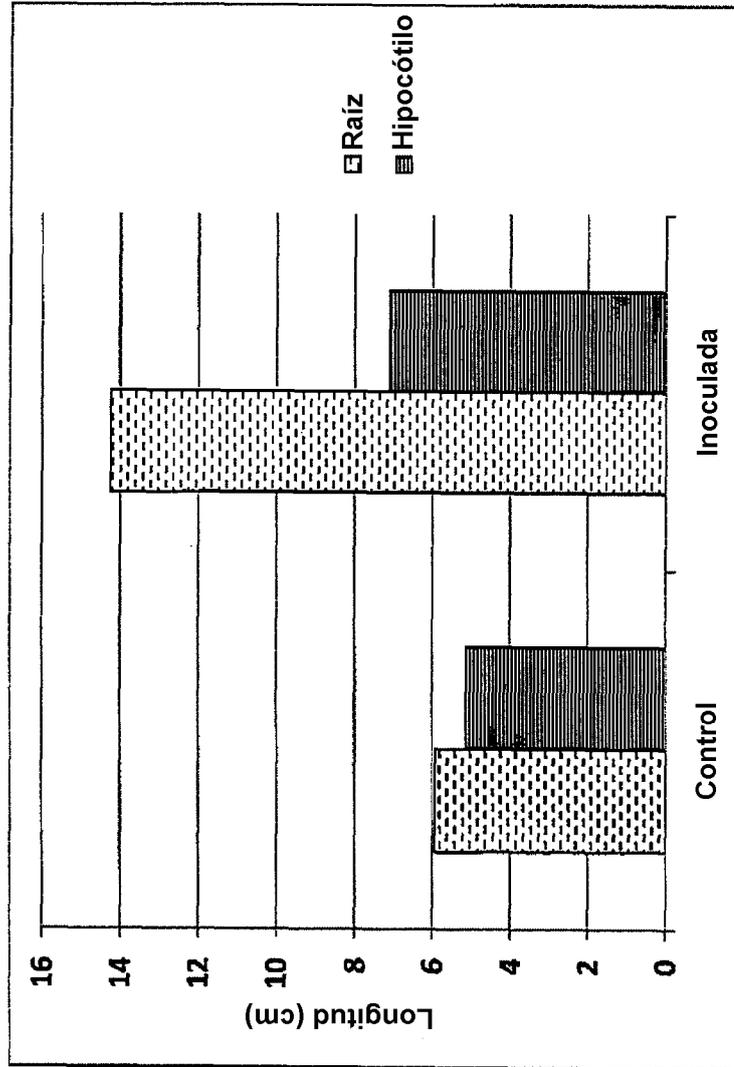


Figura 6. Viabilidad de rizobacterias XSB375 en suspensión líquida

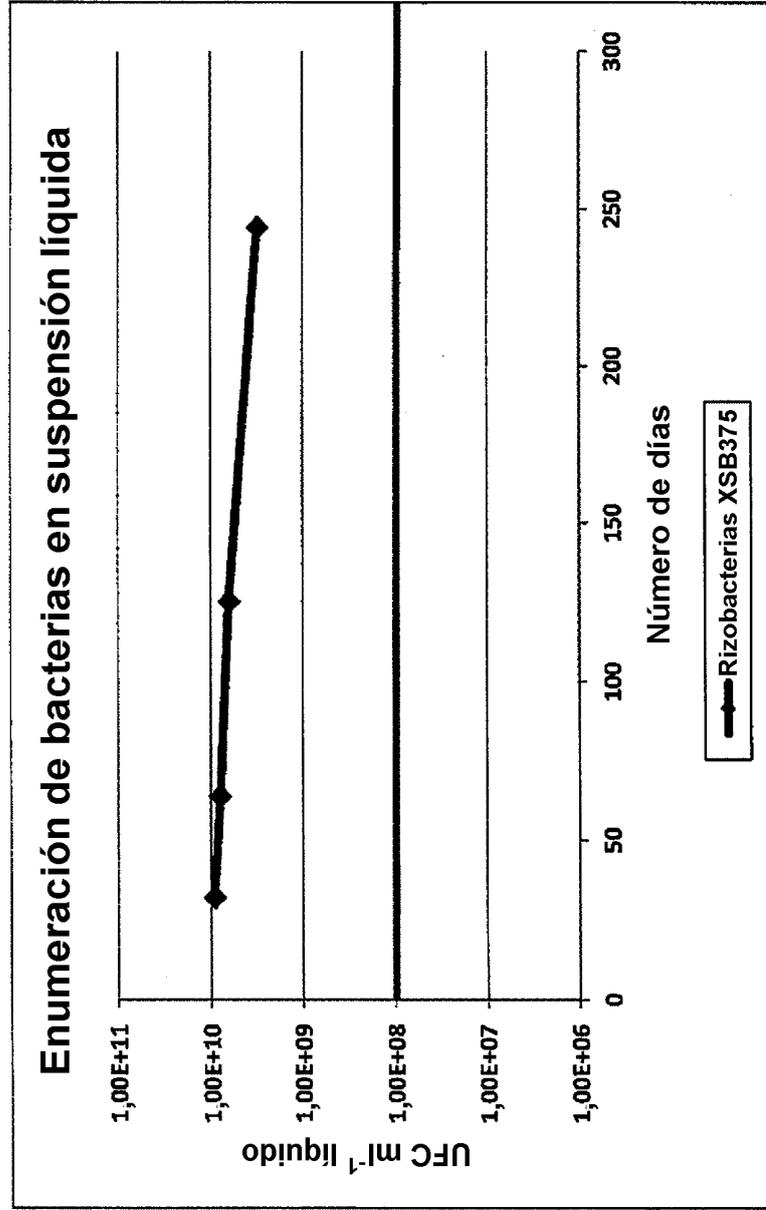


Figura 7: Efecto de la inoculación de PGPR sobre el rendimiento de colza en estudios de campo en 2012

