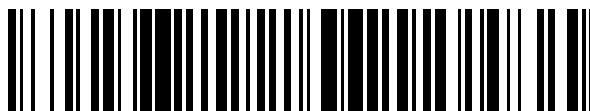


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 936**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
C12N 11/02 (2006.01)
C12N 11/14 (2006.01)
C12N 11/16 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01)
A01C 1/06 (2006.01)
A01H 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2013** **E 16179176 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018** **EP 3098303**

54 Título: **Procedimientos y composiciones de fermentación microbiana**

30 Prioridad:

01.06.2012 US 201261654504 P
01.06.2012 US 201261654394 P
14.03.2013 US 201361784375 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2019

73 Titular/es:

NEWLEAF SYMBIOTICS, INC. (100.0%)
BRDG Park 1005 North Warson Road
St. Louis, Missouri 63132, US

72 Inventor/es:

BOGOSIAN, GREGG

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 700 936 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

Procedimientos y composiciones de fermentación microbiana

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud de patente internacional reivindica el beneficio de la solicitud de patente de los EE.UU. N°: 61/784.375, presentada el 14 de marzo, 2013, la solicitud de patente de los EE.UU. N°: 61/654.504, presentada el 1 de junio, 2012, y la solicitud de patente de los EE.UU. N°: 61/654.394, presentada el 1 de junio, 2012.

10 ANTECEDENTES

Los compuestos orgánicos de un solo carbono, tales como metano y metanol, se encuentran ampliamente en la naturaleza, y son utilizados como fuentes de carbono por bacterias clasificadas como metanótrofos y metilótrofos. Las bacterias metanótrofas incluyen especies de los géneros *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylococcus*, *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylosphaera*, *Methylocaldum* y *Methylocella* (Lidstrom, 2006). Los metanótrofos poseen la enzima metano monooxigenasa, que incorpora un átomo de oxígeno del O₂ en el metano, formando metanol. Todos los metanótrofos son consumidores obligados de un solo carbono, incapaces de utilizar compuestos que contienen enlaces carbono-carbono. Por otra parte, los metilótrofos también pueden utilizar compuestos orgánicos más complejos, tales como ácidos orgánicos, alcoholes superiores, azúcares y similares. Por consiguiente, las bacterias metilótrofas son metilótrofos facultativos. Las bacterias metilótrofas incluyen especies de los géneros *Methylobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Methylophilus*, *Methylobacillus*, *Methylophaga*, *Aminobacter*, *Methylohabdus*, *Methylopila*, *Methylosulfonomonas*, *Marinosulfonomonas*, *Paracoccus*, *Xanthobacter*, *Ancylobacter* (también conocido como *Microcycclus*), *Thiobacillus*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodobacter*, *Acetobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Arthobacter* y *Nocardia* (Lidstrom, 2006).

La mayor parte de las bacterias metilótrofas del género *Methylobacterium* tiene pigmentos rosa. Convencionalmente se las conoce como bacterias PPFM, siendo metilótrofos facultativos pigmentados de rosa. Green (2005, 2006) identificó doce especies validadas en el género *Methylobacterium*, específicamente *M. aminovorans*, *M. clorometanicum*, *M. diclorometanicum*, *M. extorquens*, *M. fujisawaense*, *M. mesophilicum*, *M. organophilum*, *M. radiotolerans*, *M. rhodesianum*, *M. rhodinum*, *M. tiocyanatum* y *M. zatmanii*. Sin embargo, *M. nidulans* es una *Methylobacterium* fijador de nitrógeno que no es un PPFM (Sy et al., 2001). Las bacterias *Methylobacterium* son ubicuas en la naturaleza, presentes en el suelo, el polvo, agua dulce, sedimentos y las superficies de las hojas, así como en entornos industriales y clínicos (Green, 2006).

La existencia de bacterias PPFM como colonizadores de las superficies de las hojas de la mayoría de las especies (si no todas) de plantas (que varían entre algas, musgos y hepáticas, así como angiospermas y gimnospermas) sugiere que las bacterias PPFM pueden desempeñar un papel importante en la fisiología de las plantas (Corpe y Rheem, 1989; Holland y Polacco, 1994; Holland, 1997; Kutschera, 2007). El hecho de que las plantas producen y excretan metanol, probablemente como un producto de degradación del metabolismo de la pectina en las paredes celulares de las plantas en crecimiento, sugirió a los investigadores que existe una relación simbiótica, en la que las bacterias PPFM se alimentan del metanol producido por las plantas y a su vez proporcionan beneficios positivos a las plantas. Los beneficios sugeridos de las bacterias PPFM para la fisiología de la planta incluyen efectos positivos en el metabolismo del nitrógeno, en la germinación de las semillas y la estimulación del crecimiento de la planta mediante el suministro de hormonas vegetales de citoquinina generadas por las bacterias PPFM. El uso de bacterias PPFM para mejorar el crecimiento vegetal, el rendimiento de las plantas, la germinación de semillas, la fertilidad masculina y las cualidades nutricionales de las plantas se ha divulgado en la patente de los EE.UU. N°: 5.512.069, la patente de los EE.UU. N°: 5.961.687, la patente de los EE.UU. N°: 6.174.837, la patente de los EE.UU. N°: 6.329.320, la patente de los EE.UU. N°: 7.435.878 y en la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. N°: 2006/0228797. Además, se ha encontrado que las bacterias PPFM aumentan el rendimiento de las algas cultivadas, lo que sugiere su aplicación en la producción de biocombustibles derivados de algas (publicación de solicitud de patente de los EE.UU. N°: 2011/0269219).

La amplia aplicación de *Methylobacterium* en los cultivos en filas, verduras y otras plantas cultivadas, así como en la producción de biocombustibles basados en algas, requeriría el cultivo eficaz y económico de enormes cantidades de cultivos de *Methylobacterium*. Otras aplicaciones industriales de *Methylobacterium* también podrán aprovechar las técnicas eficaces de producción de *Methylobacterium*. Dichas aplicaciones industriales incluyen el uso de *Methylobacterium* como indicadores de la contaminación ambiental (dado que determinados *Methylobacterium* pueden crecer en hollín) y como supervisores del control de calidad de irradiación en la industria de alimentos envasados (dado que determinados *Methylobacterium* exhiben una gran resistencia a la irradiación de rayos gamma). Otras aplicaciones industriales incluyen el uso de *Methylobacterium* para degradar contaminantes ambientales (patentes de los EE.UU. N°: US 5.418.161, US 5.487.834, US 6.107.067, US 7.214.509), para producir compuestos de utilidad industrial, precursores poliméricos o biopolímeros (patentes de los EE.UU. N°: US 5.236.930, US 5.686.276, US 6.107.067) y proteínas recombinantes (publicación de solicitud de patente

de los EE.UU. N°: 20060234336).

Sin embargo, numerosas publicaciones del área objeto de cultivo de PPFM sugieren que existen obstáculos significativos que deben superarse con el fin de lograr un cultivo a gran escala eficaz y económico de estas bacterias. Holland y Polacco (1994) informaron que “las bacterias PPFM aisladas no crecen bien en medios de cultivo de tejidos vegetales”, que son medios ricos en nutrientes y que las bacterias “PPFM son de crecimiento lento”. Madhaiyan et al., (2004) establecen sobre las bacterias PPFM que “su naturaleza de crecimiento lento y de distribución sobre la planta completa sugiere que sus cantidades están regulados simplemente por dilución a medida que el tejido vegetal se expande alejándose de los puntos de crecimiento”. Abanda-Nkpawatt et al., (2006) informaron sobre el crecimiento de bacterias PPFM que “en cultivo líquido, la solución se volvía turbia en el término de 4-5 días” sin especificar el título obtenido (el título se refiere a la cantidad de células bacterianas, o de unidades formadoras de colonias, por mililitro).

Estos informes coherentes acerca del crecimiento lento fueron confirmados y ampliados aún más por otros estudios que indican que las bacterias PPFM solamente se podían cultivar hasta títulos relativamente bajas. Estos estudios de crecimiento se realizaron en medios microbiológicos líquidos estándar, preparados deliberadamente para que sean “transparentes”. Dichos medios permiten la observación visual y la detección del crecimiento microbiano deseado y no deseado (es decir, contaminante), que se manifiesta como el desarrollo de turbidez visible a simple vista.

Corpe y Basile (1982) presentaron una investigación sistemática de las respuestas de crecimiento de diversas bacterias PPFM a una amplia diversidad de fuentes de carbono. Como medio básico utilizaron la base mineral estándar empleada por Stanier et al., (1966). En dicha publicación, Stanier et al., establecieron sobre su medio básico que “Está intensamente quelado con ácido nitriloacético y EDTA y forma un precipitado copioso cuando es sometido a autoclave. El precipitado se vuelve a disolver a medida que el medio se enfría, formando una solución transparente”.

Corpe y Basile (1982) evaluaron una amplia variedad de fuentes de carbono para determinar su capacidad para sustentar el crecimiento de las bacterias PPFM, usando esta solución “transparente” como su medio básico. Encontraron varias fuentes de carbono que eran relativamente mejores que todas las demás, a saber, glicerol, glutamato, metanol, glucosa, aspartato, succinato y malato. Sin embargo, aún después de 7 días de incubación (el tiempo asignado a cada prueba de crecimiento), ninguno de los cultivos alcanzó una densidad óptica (a 660 nanómetros, que es la longitud de onda estándar para medir el crecimiento microbiano) de más de 0,7 unidades ópticas, y la mayoría se encontraba muy por debajo de esta densidad. Sy et al., (2005) informaron que una suspensión de bacterias PPFM con una densidad óptica de aproximadamente 0,05 unidades ópticas contenía aproximadamente 5×10^5 unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias PPFM por mililitro. Por consiguiente, el título máximo obtenido por Corpe y Basile después de una semana de incubación con las mejores fuentes de carbono que habían identificado era de aproximadamente 7×10^7 unidades formadoras de colonias por mililitro.

Sy et al., (2005) también informaron que con un medio mínimo de sales que contenía succinato como fuente de carbono, lograron un título final de *M. extorquens* de aproximadamente $2,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias por mililitro.

Corpe y Rheem (1989) informaron que las bacterias PPFM “presentaban un tiempo de duplicación mucho más prolongado que otros heterótrofos foliares, en un caldo con nutrientes y en otros medios heterotróficos comunes”, y concluyeron que el metanol producido por las plantas “puede permitir que las bacterias PPFM compitan exitosamente” con otras bacterias sobre las superficies foliares. El título máximo obtenido por Corpe y Reehm (después de un período de incubación no especificado) era de aproximadamente 3×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro.

Por consiguiente, estas publicaciones indican que en un medio de cultivo microbiológico estándar “transparente”, el crecimiento de las bacterias PPFM es lento y típicamente se estanca a un título final relativamente bajo de aproximadamente 3×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro.

Con el fin de cumplir con las necesidades potenciales de bacterias PPFM para aplicaciones comerciales en cultivos en filas, verduras y otras plantas cultivadas, así como en la producción de biocombustibles basados en algas, las capacidades de elaboración deberían producir cantidades enormes de estas bacterias.

Si se toma el maíz como ejemplo, hay aproximadamente 40 millones de hectáreas cultivadas con maíz por año en los EE.UU. Por cada 1% de penetración en el mercado (400.000 hectáreas) tan solo en este país y para este único cultivo, se puede estimar que la necesidad de bacterias PPFM se encuentra en el rango de aproximadamente 30 litros por hectárea de cultivo de PPFM con un título de aproximadamente 3×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro, aplicado ya sea como un tratamiento de semillas o como una pulverización foliar. Esto equivale a decir que se necesitan aproximadamente 12 millones de litros de cultivo de PPFM a dicho título por año para tratar al 1% del cultivo de maíz de los EE.UU. Si el tiempo de producción por lote era de 7 días, una instalación con los fermentadores de mayor volumen del mercado (que producen 60.000 litros por lote) funcionando a su máxima capacidad (aproximadamente 250 días por año) precisaría 5 o 6 de estos enormes fermentadores (nuevamente, sólo para cubrir la necesidad del 1% de la penetración en mercado para maíz en los EE.UU.). Muy probablemente no se

podría construir y operar tal instalación de una manera comercialmente viable.

Por consiguiente, persiste la necesidad de desarrollar una producción a gran escala eficaz y económica de *Methylobacterium*.

SUMARIO

En el presente documento se proporcionan procedimientos para una producción eficaz de grandes cantidades de *Methylobacterium*. Estos procedimientos pueden dar como resultado cultivos de *Methylobacterium* de títulos altos con tiempos de producción por lote significativamente reducidos. Los procedimientos de producción de *Methylobacterium* proporcionados en el presente documento también pueden emplear un medio de cultivo compuesto por componentes económicos y fácilmente disponibles. En el presente documento también se proporcionan caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación, productos de fermentación y composiciones que comprenden *Methylobacterium*, siendo todos ellos útiles. En el presente documento se proporcionan asimismo procedimientos para utilizar los caldos de fermentación, los productos de los caldos de fermentación, los productos de fermentación y las composiciones que comprenden *Methylobacterium* para tratar plantas o partes de plantas. Los procedimientos y las composiciones proporcionados en el presente documento se pueden usar para producir grandes cantidades de *Methylobacterium* para su aplicación a plantas o a partes de plantas, para su uso como un inóculo en biorremediación, para la producción de productos útiles y para la producción de proteínas recombinantes. Los productos útiles que se pueden obtener mediante los procedimientos y las composiciones proporcionados en el presente documento incluyen, pero sin limitación, poli(ácido 3-hidroxibutírico), 1,3-propanodiol y oxazopirrolquinolinas.

Se proporcionan también en el presente documento caldos de fermentación que comprenden una fase líquida y una fase sólida que se puede suspender en la misma, comprendiendo la fase sólida una sustancia sólida en la que está adherido un monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium* y estando el caldo de fermentación esencialmente exento de microorganismos contaminantes. En determinadas formas de realización, el caldo puede comprender además uno o más microorganismos de una identidad predeterminada distintos de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, la fase sólida comprende entre al menos aproximadamente el 0,02% y aproximadamente el 0,5% del caldo por masa. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida es de origen animal, vegetal, microbiano, fúngico o mineral. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida es un coadyuvante agrícolamente aceptable o un excipiente agrícolamente aceptable. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida es un polímero. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida comprende un polisacárido, tierra de diatomeas o un cristal de sal. En determinadas formas de realización, el polisacárido se selecciona del grupo que consiste en un polisacárido celulósico, un polisacárido quitinoso y un polisacárido de galactano. En determinadas formas de realización, la *Methylobacterium* está presente a un título de al menos aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente 1×10^9 unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente 1×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro o al menos aproximadamente 3×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro. En determinadas formas de realización, la *Methylobacterium* está presente a un título de entre al menos aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro y al menos aproximadamente 6×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro. En determinadas formas de realización, al menos una de las bacterias de entre las *Methylobacterium* es un metilótrofo facultativo pigmentado de rosa (PPFM). En determinadas formas de realización, el metilótrofo facultativo pigmentado de rosa (PPFM) se selecciona del grupo que consiste en *M. aminovorans*, *M. clorometanicum*, *M. diclorometanicum*, *M. extorquens*, *M. fujisawaense*, *M. mesophilicum*, *M. organophilum*, *M. radiotolerans*, *M. rhodesianum*, *M. rhodinum*, *M. tiocyanatum*, *M. cerastii*, *M. gossypicola*, cepa LMG6378 de *Methylobacterium* sp., *M. phyllosphaerae*, *M. oryzae*, *M. platani*, *M. populi* y *M. zatmanii*. En determinadas formas de realización, al menos una de las bacterias *Methylobacterium* es *M. nodulans*. En determinadas formas de realización de cualquiera de los caldos mencionados previamente, al menos un 10% de las bacterias *Methylobacterium* presentes en el caldo de fermentación son bacterias *Methylobacterium* que están adheridas en la sustancia sólida. En determinadas formas de realización de cualquiera de los caldos mencionados previamente, el sólido no es un microorganismo fotosintético.

También se proporcionan productos de caldos de fermentación o productos de fermentación que comprenden una fase sólida que se puede suspender en un líquido, comprendiendo la fase sólida una sustancia sólida en la que está adherido un monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium* y estando el producto de caldo de fermentación o el producto de fermentación esencialmente exento de microorganismos contaminantes. En determinadas formas de realización, el producto de caldo de fermentación o el producto de fermentación comprende además uno o más microorganismos de una identidad predeterminada distintos de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida comprende una pluralidad de partículas que se pueden suspender con la *Methylobacterium* adherente. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida es un coadyuvante agrícolamente aceptable o un excipiente agrícolamente aceptable. En determinadas formas de realización, el título de *Methylobacterium* en la fase sólida es de entre al menos aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por gramo y al menos aproximadamente 6×10^{10} unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo de sólido. En determinadas formas de realización de cualquiera de los productos de caldos de fermentación o los productos de fermentación mencionados previamente, la sustancia sólida no es un microorganismo fotosintético.

También se proporcionan composiciones que comprenden una pluralidad de partículas que se pueden suspender en

un líquido, comprendiendo cada una de las partículas una sustancia sólida en la que está adherido un monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium* y estando la sustancia sólida esencialmente exenta de microorganismos contaminantes. En determinadas formas de realización, la composición comprende además uno o más microorganismos de una identidad predeterminada distintos de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida comprende un coadyuvante agrícolamente aceptable o un excipiente agrícolamente aceptable. En determinadas formas de realización, la composición comprende además al menos uno entre un coadyuvante agrícolamente aceptable, un excipiente agrícolamente aceptable y/o un plaguicida. En determinadas formas de realización, la composición es un producto esencialmente seco, una mezcla de la sustancia sólida con *Methylobacterium* adherentes en una emulsión o una suspensión. En determinadas formas de realización, cada una de las partículas es una partícula de entre aproximadamente 2 micrómetros y aproximadamente 1000 micrómetros de longitud promedio o de diámetro promedio. En determinadas formas de realización, el título de *Methylobacterium* en las partículas es de entre al menos aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por gramo y al menos aproximadamente 6×10^{10} unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo de partículas. En determinadas formas de realización de cualquiera de las composiciones mencionadas previamente, la densidad de las *Methylobacterium* adherentes sobre las partículas es de al menos aproximadamente 1 *Methylobacterium*/20 micrómetros cuadrados de área de superficie de la partícula. En determinadas formas de realización de cualquiera de las composiciones mencionadas previamente, la sustancia sólida no es un microorganismo fotosintético.

También se proporcionan procedimientos para cultivar *Methylobacterium* que comprenden cultivar un monocultivo o un cocultivo de *Methylobacterium* en un medio que comprende una fase líquida y una fase sólida que pueda suspenderse en la misma, comprendiendo la fase sólida una sustancia sólida que proporciona el cultivo de *Methylobacterium* y estando el medio esencialmente exento de microorganismos contaminantes. En determinadas formas de realización, el medio comprende además uno o más microorganismos de una identidad predeterminada distintos de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, la fase sólida comprende entre al menos aproximadamente el 0,02% y aproximadamente el 0,5% del medio por masa. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida es un coadyuvante agrícolamente aceptable o un excipiente agrícolamente aceptable. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida proporciona el crecimiento adherente de la *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida es un polímero o es de origen animal, vegetal, microbiano, fúngico o mineral. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida comprende un polisacárido, tierra de diatomeas o un cristal de sal. En determinadas formas de realización, el polisacárido se selecciona del grupo de un polisacárido celulósico, un polisacárido quitinoso y un polisacárido de galactano. En determinadas formas de realización, el cultivo comprende las etapas de inocular el medio con *Methylobacterium* y de incubar el medio inoculado en condiciones suficientes como para proporcionar el crecimiento de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, la *Methylobacterium* se inocula en el medio a un título de entre al menos aproximadamente 5×10^4 unidades formadoras de colonias por mililitro o al menos aproximadamente 1×10^5 unidades formadoras de colonias por mililitro. En determinadas formas de realización, la *Methylobacterium* se selecciona del grupo que consiste en *M. aminovorans*, *M. clorometanicum*, *M. diclorometanicum*, *M. extorquens*, *M. fujisawaense*, *M. mesophilicum*, *M. organophilum*, *M. radiotolerans*, *M. rhodesianum*, *M. rhodinum*, *M. tiocyanatum*, *M. nodulans*, *M. cerastii*, *M. gossipiicola*, cepa LMG6378 de *Methylobacterium* sp., *M. phyllosphaerae*, *M. oryzae*, *M. platani*, *M. populi* y *M. zatmanii*. En determinadas formas de realización, al menos un 10% de la *Methylobacterium* viable en el caldo de fermentación son *Methylobacterium* adherentes. En determinadas formas de realización, se logra un título de entre al menos aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro y aproximadamente 6×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro. En determinadas formas de realización, el título de entre al menos aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro y aproximadamente 6×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro se obtiene dentro de un periodo de aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas o aproximadamente 96 horas desde la inoculación del medio con *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización de cualquiera de los procedimientos mencionados previamente, el procedimiento comprende además la etapa de recolectar las *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización de cualquiera de los procedimientos mencionados previamente, la sustancia sólida no es un microorganismo fotosintético. También se proporcionan monocultivos o cocultivos de *Methylobacterium* obtenidos mediante cualquiera de los procedimientos mencionados previamente. En determinadas formas de realización, el monocultivo o el cocultivo de *Methylobacterium* están esencialmente exentos de microorganismos contaminantes. También se proporcionan productos del cultivo de *Methylobacterium* obtenidos del monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium* obtenidos mediante los procedimientos, en los que dicho producto del cultivo de *Methylobacterium* comprende una pluralidad de partículas que se pueden suspender en un líquido y las partículas comprenden una sustancia sólida en la que está adherido un monocultivo o un cocultivo de *Methylobacterium*. También se proporcionan composiciones que comprenden el producto de cultivo, el producto del caldo de fermentación o el producto de fermentación de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, el producto de cultivo, el producto del caldo de fermentación o el producto de fermentación comprenden un monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium* que está esencialmente exento de microorganismos contaminantes. En determinadas formas de realización, la composición comprende además un coadyuvante agrícolamente aceptable, un excipiente agrícolamente aceptable y/o un plaguicida. También se proporcionan en el presente documento procedimientos para tratar una planta o una parte de planta con *Methylobacterium* que comprenden la etapa de aplicar a la planta o parte de planta un monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium*, un producto del caldo de fermentación, un producto de fermentación o una composición obtenida mediante cualquiera de los procedimientos mencionados previamente. En determinadas formas de realización de cualquiera de los monocultivos o cocultivos de *Methylobacterium*, productos del caldo de fermentación, productos de fermentación o composiciones mencionadas previamente, la sustancia sólida no es un microorganismo fotosintético.

También se proporcionan procedimientos para tratar una planta o una parte de una planta con *Methylobacterium* que comprenden la etapa de aplicar a la planta o a una parte de la planta una composición que comprende una sustancia sólida en la que está adherido un monocultivo o un cocultivo de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, el monocultivo o el cocultivo de *Methylobacterium* están esencialmente exentos de microorganismos contaminantes. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida es un coadyuvante agrícola aceptable o un excipiente agrícola aceptable. En determinadas formas de realización, la composición es un producto esencialmente seco, una mezcla de la sustancia sólida con bacterias *Methylobacterium* adherentes en una emulsión o una suspensión. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida comprende una pluralidad de partículas que se pueden suspender. En determinadas formas de realización, cada una de las partículas que se puede suspender es una partícula de entre aproximadamente 2 micrómetros y aproximadamente 1000 micrómetros de longitud o de diámetro. En determinadas formas de realización, la parte de la planta es una semilla y la composición tiene un título de *Methylobacterium* de entre al menos aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por gramo y aproximadamente 6×10^{10} unidades formadoras de colonias por gramo de la composición. En determinadas formas de realización, el título de *Methylobacterium* en la composición es de entre al menos aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por gramo y al menos aproximadamente 6×10^{10} unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo de la composición. En determinadas formas de realización, la parte de la planta es una semilla, un tallo, una raíz, una flor, un cotiledón, un coleóptilo o una hoja. En determinadas formas de realización, la planta es maíz, *Brassica* sp., alfalfa, arroz, centeno, sorgo, mijo perlado, mijo proso, mijo cola de zorro, mijo africano, girasol, cártamo, soja, tabaco, patata, cacahuetes, algodón, batata, mandioca, café, coco, piña, árboles cítricos, cacao, té, plátano, aguacate, higo, guayaba, mango, olivo, papaya, anacardo, macadamia, almendra, remolacha azucarera, caña de azúcar, avena, cebada, tomate, lechuga, alubia verde, alubia pallar, guisante, cucurbitácea, plantas ornamentales o coníferas. En determinadas formas de realización, la planta es una planta de cereal y la parte es una semilla, un coleóptilo y/o una hoja. En determinadas formas de realización, la planta es una planta de cereal, la parte es una semilla y la composición se aplica en una cantidad suficiente para proporcionar un aumento en el crecimiento radicular nodal en una planta de cereal cultivada a partir de las semillas tratadas. En determinadas formas de realización, la planta es una planta de cereal, la parte es un coleóptilo y/o una hoja, y la composición se aplica en una cantidad suficiente para proporcionar un aumento en el crecimiento radicular nodal en una planta de cereal que comprende el coleóptilo y/o una hoja tratados. En determinadas formas de realización de cualquiera de los procedimientos mencionados previamente, la planta de cereal se selecciona del grupo que consiste de maíz, cebada, mijo, avena, arroz, cebada, sorgo, triticale y trigo. En determinadas formas de realización, la planta es una planta de maíz y la parte es una semilla, un coleóptilo y/o una hoja. En determinadas formas de realización, la planta es una planta de maíz, la parte es una semilla y la composición se aplica en una cantidad suficiente para proporcionar un aumento en el crecimiento radicular nodal de maíz en una planta de maíz cultivada a partir de las semillas tratadas. En determinadas formas de realización, la planta es una planta de maíz, la parte es un coleóptilo y/o una hoja, y la composición se aplica en una cantidad suficiente para proporcionar un aumento en el crecimiento radicular nodal de maíz en una planta de maíz que comprende el coleóptilo y/o una hoja tratados. En determinadas formas de realización de cualquiera de los procedimientos mencionados previamente, la sustancia sólida no es un microorganismo fotosintético. También se proporcionan plantas o partes de plantas obtenidas mediante cualquiera de los procedimientos mencionados previamente, en los que la planta o la parte de la planta está al menos parcialmente recubierta con una sustancia sólida aplicada exógenamente a la cual está adherido un monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, la parte de la planta es una semilla, un tallo, una raíz, una flor, un cotiledón, un coleóptilo o una hoja. También se proporcionan productos vegetales procesados obtenidos de cualquiera de las plantas o partes de plantas mencionadas previamente, conteniendo el producto procesado una sustancia sólida exógena a la cual está adherido un monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, el producto vegetal es harina, una pasta, fécula, copos o un pienso. En determinadas formas de realización, ninguno de los productos procesados mencionados previamente es regenerable. En determinadas formas de realización de cualquiera de las plantas, las partes de las plantas o los productos procesados mencionados previamente, la sustancia sólida no es un microorganismo fotosintético.

También se proporcionan procedimientos para producir un producto industrial que comprende cultivar un monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium* en un medio que comprende una fase líquida y una fase sólida que puede suspenderse en la misma, en los que la fase sólida comprende una sustancia sólida que se proporciona para el cultivo de *Methylobacterium* y en los que el medio está esencialmente exento de microorganismos contaminantes, y recolectar el producto industrial de la fase sólida, la fase líquida o la combinación de las mismas después del cultivo de las *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida proporciona el crecimiento adherente de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, el producto industrial es un precursor polimérico, un biopolímero, un precursor de un compuesto medicinal, un compuesto medicinal, o una proteína recombinante. En determinadas formas de realización de cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente, el producto industrial es poli(ácido 3-hidroxibutírico), 1,3-propanodiol, un pirrolquinolinaquinona o una oxazopirrolquinolina. En determinadas formas de realización de cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente, la sustancia sólida no es un microorganismo fotosintético.

En el presente documento también se proporcionan procedimientos para obtener una preparación de *Methylobacterium* que comprenden cultivar un monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium* en medio que comprende una fase líquida y una fase sólida, en los que la fase sólida proporciona un rendimiento aumentado de *Methylobacterium* en relación al rendimiento obtenido mediante el cultivo de *Methylobacterium* en medio líquido solo.

En determinadas formas de realización, los procedimientos comprenden además recolectar las *Methylobacterium* cultivadas en el medio. En determinadas formas de realización, al menos sustancialmente toda la fase sólida está suspendida en la fase líquida, o al menos sustancialmente toda la fase sólida no está suspendido en la fase líquida, o porciones de la fase sólida están suspendidas en la fase líquida y porciones de la fase sólida no están suspendidas en la fase líquida. En determinadas formas de realización, el medio comprende un coloide en el que la fase sólida está dispersada en la fase líquida. En determinadas formas de realización, el coloide es un gel. En determinadas formas de realización, la fase sólida en el medio es un gel. En determinadas formas de realización, la fase líquida del medio es una emulsión. En determinadas formas de realización, la emulsión comprende un líquido acuoso y un líquido que no es miscible, o solo miscible parcialmente, con el líquido acuoso. En determinadas formas de realización, el medio además comprende uno o más microorganismos no fotosintéticos de identidad predeterminada diferentes de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, la fase sólida comprende al menos entre aproximadamente el 0,02% y aproximadamente el 20% del medio en masa. En determinadas formas de realización, la fase sólida es un coadyuvante agrícola aceptable o excipiente agrícola aceptable. En determinadas formas de realización, la fase sólida proporciona el crecimiento adherente de *Methylobacterium* y/o la fase sólida no es útil como fuente de carbono para las *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, la fase sólida comprende una sustancia sólida seleccionada del grupo que consiste en un material fabricado por el hombre, un material de origen animal, un material de origen vegetal, un material de origen microbiano, un material de origen fúngico, un material de origen mineral y combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida es inanimada. En determinadas formas de realización, la fase sólida comprende una sustancia sólida seleccionada del grupo que consiste en un polisacárido, una tierra de diatomeas, un cristal de sal y combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización, la fase sólida que comprende un polisacárido se selecciona del grupo de un polisacárido celulósico, un polisacárido quitinoso, y un polisacárido galactano. En determinadas formas de realización, el cultivo del monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium* comprende las etapas de inocular el medio con las *Methylobacterium* e incubar el medio inoculado en condiciones suficientes para proporcionar el crecimiento de las bacterias *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización: (i) la fase sólida comprende al menos entre aproximadamente el 0,02% y aproximadamente el 0,5% del medio y sustancialmente toda la fase sólida está suspendida en la fase líquida; o (ii) la fase sólida comprende al menos entre aproximadamente el 0,02% y aproximadamente el 20% del medio y : (a) sustancialmente toda la fase sólida no está suspendida en la fase líquida; o (b) porciones de la fase sólida están suspendidas en la fase líquida y porciones de la fase sólida no están suspendidas en la fase líquida. En determinadas formas de realización, la *Methylobacterium* se selecciona del grupo que consiste en *M. aminovorans*, *M. chloromethanicum*, *M. dichloromethanicum*, *M. extorquens*, *M. fujisawaense*, *M. mesophilicum*, *M. organophilum*, *M. radiotolerans*, *M. rhodesianum*, *M. rhodinum*, *M. thiocyanatum*, *M. nodulans*, *M. cerastii*, *M. gossypicola*, *Methylobacterium* sp. cepa LMG6378, *M. phyllosphaerae*, *M. oryzae*, *M. platani*, *M. populi*, y *M. zatmanii*. En determinadas formas de realización, al menos el 10% de las *Methylobacterium* viables en el caldo de fermentación son *Methylobacterium* que están adheridos a la fase sólida. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida no es un microorganismo fotosintético, y/o el medio está esencialmente exento de microorganismos contaminantes. En determinadas formas de realización, la recolección comprende recuperar la totalidad o una porción de la fase sólida con *Methylobacterium* adheridas a la misma y/o recuperar todo o una porción de las *Methylobacterium* no adherentes de la fase líquida. En determinadas formas de realización, los procedimientos además comprenden disociar parte o la totalidad de la fase sólida con *Methylobacterium* adheridas a la misma. En determinadas formas de realización, los procedimientos además comprenden secar el material disociado o parcialmente disociado. En determinadas formas de realización, los procedimientos además comprenden: i) secar la fase sólida con *Methylobacterium* adheridas a la misma que se han separado de la fase líquida; o, ii) secar la fase sólida con *Methylobacterium* adheridas a la misma y las *Methylobacterium* no adheridas que se recuperaron de la fase líquida. En determinadas formas de realización, los procedimientos además comprenden disociar parte o la totalidad de: i) la fase sólida seca con *Methylobacterium* adheridas a la misma; o, ii) la fase sólida seca con *Methylobacterium* adheridas a la misma y *Methylobacterium* no adheridas.

También se proporcionan preparaciones de *Methylobacterium* obtenidas mediante cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente, en los que la preparación de *Methylobacterium* comprende la sustancia sólida a la que se encuentra adherido un monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida en la preparación no es un microorganismo fotosintético.

También se proporcionan procedimientos para tratar una planta o una parte de una planta con *Methylobacterium* que comprenden la etapa de aplicar a la planta o parte de la planta una composición que comprende la preparación de *Methylobacterium* producida mediante cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente. En determinadas formas de realización de los procedimientos, la composición comprende además un coadyuvante agrícola aceptable o un excipiente agrícola aceptable. En determinadas formas de realización de los procedimientos, la composición es esencialmente un producto seco, una mezcla del sólido con *Methylobacterium* adherentes en una emulsión, o una suspensión. En determinadas formas de realización de los procedimientos, la parte de la planta es una semilla y la composición tiene un título de *Methylobacterium* de al menos entre aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por gramo de la composición y aproximadamente 6×10^{10} , 3×10^{12} , 5×10^{12} , 1×10^{13} o 5×10^{13} unidades formadoras de colonias por gramo de la composición. En determinadas formas de realización de los procedimientos, la parte de la planta es una semilla, tallo, raíz, flor, cotiledón, un coleóptilo, un fruto o una hoja. En determinadas formas de realización de los procedimientos, la planta o parte de la planta es una parte de una planta de maíz, Brassica sp., alfalfa, arroz, centeno, sorgo, mijo perlado, mijo proso, mijo cola de zorro, mijo africano, girasol, cártamo, soja, tabaco, patata, cacahuetes, algodón, batata,

mandioca, café, coco, piña, árboles cítricos, cacao, té, plátano, aguacate, higo, guayaba, mango, olivo, papaya, anacardo, macadamia, almendra, remolacha azucarera, caña de azúcar, avena, cebada, tomate, lechuga, alubia verde, alubia pallar, guisante, cucurbitácea, plantas ornamentales o coníferas.

- 5 También se proporcionan plantas o partes de plantas obtenidas mediante cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente, en los que la planta o parte de la planta está al menos parcialmente recubierta con una sustancia sólida exógena en la que está adherido un monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium*. También se proporcionan productos de la planta procesados obtenidos de las plantas o partes de plantas obtenidas mediante cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente, en los que el producto procesado contiene una sustancia sólida exógena en la que está adherida un monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, el producto de la planta procesado es fécula, una pasta, harina, copos o un pienso. En determinadas formas de realización, el producto de la planta procesado no se puede regenerar.

- 15 También se proporcionan procedimientos para obtener una preparación de *Methylobacterium* que comprende: (i) cultivar un monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium* en: (a) un recipiente para cultivo que comprende o contiene una o más superficies sólidas que se proporcionan para el crecimiento adherente de *Methylobacterium*; o (b) medio que comprende una fase líquida y una fase sólida, en el que la fase sólida se proporciona para un rendimiento aumentado de *Methylobacterium* en relación al rendimiento obtenido por el cultivo de las *Methylobacterium* en medio líquido solo; y, (ii) recolectar las *Methylobacterium* adheridas a la superficie sólida o la fase sólida. En determinadas formas de realización de los procedimientos, recolectar comprende retirar las *Methylobacterium* de la superficie sólida o la fase sólida por exposición de las *Methylobacterium* a uno o más tratamientos físicos y/o químicos. En determinadas formas de realización de los procedimientos, el tratamiento químico comprende exponer uno o más de un cambio en la fuerza iónica, un cambio en el pH, un tratamiento con detergente, un tratamiento con disolvente y/o un tratamiento enzimático. En determinadas formas de realización de los procedimientos, el tratamiento enzimático comprende exponer las *Methylobacterium* adheridas a la superficie sólida o a la fase sólida a una proteasa, una lipasa, una glucanasa, o cualquier combinación de las mismas. En determinadas formas de realización de los procedimientos, el tratamiento con detergente comprende exponer las *Methylobacterium* adheridas a la superficie sólida o la fase sólida a un detergente iónico, un detergente no iónico, o cualquier combinación de los mismos. En determinadas formas de realización de los procedimientos, el tratamiento físico comprende exponer las *Methylobacterium* adheridas a la superficie sólida o a la fase sólida a sonicación, raspado, un líquido presurizado, una lechada presurizada, calor, o cualquier combinación de los mismos. En determinadas formas de realización, los procedimientos además pueden comprender la etapa de reutilizar: (a) una o más superficies sólidas de las que se han retirado las *Methylobacterium*; o, (b) la fase sólida del medio del que se han retirado las *Methylobacterium*, para el cultivo y la recolección de una preparación posterior de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización de los procedimientos: (i) al menos sustancialmente toda la fase sólida está suspendida en la fase líquida; o (ii) al menos sustancialmente toda la fase sólida no está suspendida en la fase líquida; o (iii) porciones de la fase sólida están suspendidas en la fase líquida y porciones de la fase sólida no están suspendidas en la fase líquida. En determinadas formas de realización de los procedimientos, la fase sólida se proporciona para el crecimiento adherente de *Methylobacterium* y/o la fase sólida no sirve como una fuente de carbono para *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización de los procedimientos, la fase sólida comprende una sustancia sólida seleccionada del grupo que consiste en un material producido por el hombre, un material de origen animal, un material de origen vegetal, un material de origen microbiano, un material de origen fúngico, un material de origen mineral y combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización de los procedimientos, la sustancia sólida es inanimada. En determinadas formas de realización de los procedimientos, la fase sólida comprende una sustancia sólida seleccionada del grupo que consiste en un polisacárido, una tierra de diatomeas, un cristal de sal y combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización de los procedimientos, el medio comprende un coloide en el que la fase sólida está dispersa en la fase líquida. En determinadas formas de realización de los procedimientos, la fase líquida es una emulsión. En determinadas formas de realización de los procedimientos, la emulsión comprende un líquido acuoso y un líquido que no es miscible, o solo miscible parcialmente, con el líquido acuoso. En determinadas formas de realización de los procedimientos, el polisacárido se selecciona del grupo de un polisacárido celulósico, un polisacárido quitinoso, y un polisacárido galactano. En determinadas formas de realización de cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente, los procedimientos además pueden comprender la etapa de secado de las *Methylobacterium* recolectadas.

- 55 En el presente documento también se proporcionan productos de fermentación que comprenden una sustancia sólida en la que está adherido un monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium*, en los que la sustancia sólida no es un microorganismo fotosintético, estando el producto de fermentación esencialmente exento de microorganismos contaminantes. En determinadas formas de realización, el producto de fermentación además comprende uno o más microorganismos de identidad predeterminada diferentes de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida comprende uno o más de: (i) una pluralidad de partículas que se pueden suspender con *Methylobacterium* adherentes; (ii) una sustancia sólida que no se puede suspender en caldo de fermentación; o (iii) una sustancia sólida en la que una porción de la sustancia se puede suspender en caldo de fermentación y una porción de la sustancia no se puede suspender en caldo de fermentación. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida es inanimada. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida se selecciona del grupo que consiste en un material producido por el hombre, un material de origen animal, un material de origen vegetal, un material de origen microbiano, un material de origen fúngico, un material de origen mineral y combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida se selecciona del grupo que consiste en un polisacárido, una tierra de diatomeas, un cristal de sal y combinaciones de los mismos. En determinadas formas de

realización, el polisacárido se selecciona del grupo de un polisacárido celulósico, un polisacárido quitinoso, y un polisacárido galactano. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida es un coadyuvante agrícolamente aceptable o excipiente agrícolamente aceptable. En determinadas formas de realización de cualquiera de los productos de fermentación mencionados anteriormente, el título de *Methylobacterium* en la fase sólida se encuentra entre al menos aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por gramo de sólido y al menos aproximadamente 6×10^{10} , 3×10^{12} , 5×10^{12} , 1×10^{13} o 5×10^{13} unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo de sólido. En determinadas formas de realización de cualquiera de los productos de fermentación mencionados anteriormente, la densidad de *Methylobacterium* adherentes sobre la sustancia sólida es al menos aproximadamente 1 *Methylobacterium*/20 micrómetros cuadrados de área superficial de la partícula.

También se proporcionan composiciones que comprenden un producto de fermentación que comprende una sustancia sólida en la que está adherido un monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, el producto de fermentación comprende un coloide formado por la sustancia sólida y un líquido. En determinadas formas de realización, el coloide es un gel. En determinadas formas de realización, la composición además comprende al menos uno de un coadyuvante agrícolamente aceptable y/o un excipiente agrícolamente aceptable. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida comprende una pluralidad de partículas con *Methylobacterium* adheridas a la misma. En determinadas formas de realización, las partículas comprenden partículas de entre aproximadamente 2 micrómetros y aproximadamente 1000 micrómetros de longitud promedio o diámetro promedio. En determinadas formas de realización, el título de *Methylobacterium* de las partículas se encuentra entre al menos aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por gramo de partículas y al menos aproximadamente 6×10^{10} , 3×10^{12} , 5×10^{12} , 1×10^{13} o 5×10^{13} unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo de partículas. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida es inanimada. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida se selecciona del grupo que consiste en un material producido por el hombre, un material de origen animal, un material de origen vegetal, un material de origen microbiano, un material de origen fúngico, un material de origen mineral y combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida se selecciona del grupo que consiste en un polisacárido, una tierra de diatomeas, un cristal de sal y combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización, el polisacárido se selecciona del grupo de un polisacárido celulósico, un polisacárido quitinoso, y un polisacárido galactano. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida está esencialmente exenta de microorganismos contaminantes. En determinadas formas de realización, la composición está esencialmente exenta de microorganismos contaminantes. En determinadas formas de realización, la composición y/o la sustancia sólida además pueden comprender uno o más microorganismos de identidad predeterminada diferentes de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida comprende un coadyuvante agrícolamente aceptable o un excipiente agrícolamente aceptable. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida no es un microorganismo fotosintético. En determinadas formas de realización, la composición además comprende al menos un plaguicida y/o al menos un agente bacteriostático. En determinadas formas de realización, el plaguicida se selecciona del grupo que consiste en un insecticida, un fungicida, un nematocida, y un bactericida, en las que el plaguicida no inhibe sustancialmente el crecimiento de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, la composición es esencialmente un producto seco, una mezcla de la sustancia sólida con *Methylobacterium* adherentes en una emulsión, o una suspensión. En determinadas formas de realización, la densidad de *Methylobacterium* adherentes en la sustancia sólida es al menos aproximadamente 1 *Methylobacterium*/20 micrómetros cuadrados de área superficial de la partícula.

En el presente documento también se proporcionan procedimientos para tratar una planta o una parte de la planta con *Methylobacterium* que comprenden la etapa de aplicar a la planta o parte de la planta cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente. En determinadas formas de realización, la parte de la planta es una semilla, tallo, raíz, flor, cotiledón, un coleóptilo, un fruto o una hoja. En determinadas formas de realización de los procedimientos, la planta o parte de la planta es una parte de una planta de maíz, *Brassica* sp., alfalfa, arroz, centeno, sorgo, mijo perlado, mijo proso, mijo cola de zorro, mijo africano, girasol, cártamo, soja, tabaco, patata, cacahuetes, algodón, batata, mandioca, café, coco, piña, árboles cítricos, cacao, té, plátano, aguacate, higo, guayaba, mango, olivo, papaya, anacardo, macadamia, almendra, remolacha azucarera, caña de azúcar, avena, cebada, tomate, lechuga, alubia verde, alubia pallar, guisante, cucurbitácea, plantas ornamentales o coníferas. En determinadas formas de realización, la planta es una planta de maíz, la parte es una semilla, y la composición se aplica en una cantidad suficiente para proporcionar un aumento en el crecimiento de raíces nodales de maíz en una planta de maíz crecida a partir de las semillas tratadas. En determinadas formas de realización, la planta es una planta de maíz, la parte es un coleóptilo, y/o una hoja, y dicha composición se aplica en una cantidad suficiente para proporcionar un aumento en el crecimiento de las raíces nodales de maíz en una planta de maíz que comprende el coleóptilo y/o hoja tratados. También se proporcionan plantas obtenidas mediante cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente, en los que la planta se recubre al menos parcialmente con el producto de fermentación de la composición. También se proporcionan partes de plantas obtenidas por cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente, en los que la parte de la planta se recubre al menos parcialmente con el producto de fermentación de la composición. En determinadas formas de realización, la parte de la planta es una semilla, tallo, raíz, flor, cotiledón, un coleóptilo, un fruto o una hoja.

También se proporcionan plantas que están al menos parcialmente recubiertas con un producto de fermentación que comprende una sustancia sólida en la que está adherido un monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, la planta se selecciona del grupo que consiste en una planta de maíz, *Brassica* sp., alfalfa, arroz, centeno, sorgo, mijo perlado, mijo proso, mijo cola de zorro, mijo africano, girasol, cáñamo, soja,

tabaco, patata, cacahuets, algodón, batata, mandioca, café, coco, piña, árboles cítricos, cacao, té, plátano, aguacate, higo, guayaba, mango, olivo, papaya, anacardo, macadamia, almendra, remolacha azucarera, caña de azúcar, avena, cebada, tomate, lechuga, alubia verde, alubia pallar, guisante, cucurbitácea, plantas ornamentales o coníferas. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida comprende una pluralidad de partículas con *Methylobacterium* adherentes. En determinadas formas de realización, las partículas tienen entre aproximadamente 2 micrómetros y aproximadamente 1000 micrómetros de longitud promedio o diámetro promedio. En determinadas formas de realización, el título de *Methylobacterium* de las partículas es entre al menos aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por gramo de partículas y al menos aproximadamente 6×10^{10} , 3×10^{12} , 5×10^{12} , 1×10^{13} o 5×10^{13} unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo de partículas. En determinadas formas de realización, la densidad de *Methylobacterium* adherentes sobre la sustancia sólida es al menos aproximadamente 1 *Methylobacterium*/20 micrómetros cuadrados de área superficial de la partícula. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida es inanimada. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida se selecciona del grupo que consiste en un material producido por el hombre, un material de origen animal, un material de origen vegetal, un material de origen microbiano, un material de origen fúngico, un material de origen mineral y combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida se selecciona del grupo que consiste en un polisacárido, una tierra de diatomeas, un cristal de sal y combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización, el polisacárido se selecciona del grupo de un polisacárido celulósico, un polisacárido quitinoso, y un polisacárido galactano. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida está esencialmente exenta de microorganismos contaminantes. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida además comprende uno o más microorganismos de identidad predeterminada diferente de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida comprende un coadyuvante agrícolamente aceptable o un excipiente agrícolamente aceptable. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida no es un microorganismo fotosintético.

También se proporcionan partes de plantas que están al menos parcialmente recubiertas con una composición que comprende un producto de fermentación que comprende una sustancia sólida en la que está adherida un monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, la parte de la planta se selecciona del grupo que consiste en una parte de una planta de maíz, *Brassica* sp., alfalfa, arroz, centeno, sorgo, mijo perlado, mijo proso, mijo cola de zorro, mijo africano, girasol, cáñamo, soja, tabaco, patata, cacahuets, algodón, batata, mandioca, café, coco, piña, árboles cítricos, cacao, té, plátano, aguacate, higo, guayaba, mango, olivo, papaya, anacardo, macadamia, almendra, remolacha azucarera, caña de azúcar, avena, cebada, tomate, lechuga, alubia verde, alubia pallar, guisante, cucurbitácea, plantas ornamentales o coníferas. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida comprende una pluralidad de partículas con *Methylobacterium* adherentes. En determinadas formas de realización, las partículas comprenden partículas de entre aproximadamente 2 micrómetros y aproximadamente 1000 micrómetros de longitud promedio o diámetro promedio. En determinadas formas de realización, el título de *Methylobacterium* de la partículas se encuentra entre al menos aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por gramo de partículas y al menos aproximadamente 6×10^{10} , 3×10^{12} , 5×10^{12} , 1×10^{13} o 5×10^{13} unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo de partículas. En determinadas formas de realización, la densidad de *Methylobacterium* adherentes sobre la sustancia sólida es al menos aproximadamente 1 *Methylobacterium*/20 micrómetros cuadrados de área superficial de la partícula. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida es inanimada. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida se selecciona del grupo que consiste en un material producido por el hombre, un material de origen animal, un material de origen de una parte de planta, un material de origen microbiano, un material de origen fúngico, un material de origen mineral y combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida se selecciona del grupo que consiste en un polisacárido, una tierra de diatomeas, un cristal de sal y combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización, el polisacárido se selecciona del grupo de un polisacárido celulósico, un polisacárido quitinoso y un polisacárido galactano. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida está esencialmente exenta de microorganismos contaminantes. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida comprende además uno o más microorganismos de identidad predeterminada diferentes de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida comprende un coadyuvante agrícolamente aceptable o un excipiente agrícolamente aceptable. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida no es un microorganismo fotosintético. En determinadas formas de realización, la composición además comprende al menos un plaguicida. En determinadas formas de realización, el plaguicida se selecciona del grupo que consiste en un insecticida, un fungicida, un nematocida y un bactericida, en las que el plaguicida no inhibe al *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización de cualquiera de las formas de realización mencionadas anteriormente, la parte de la planta es una semilla. También se proporcionan productos de la planta procesados obtenidos a partir de cualquiera de las plantas o partes de plantas mencionadas anteriormente, en los que el producto procesado contiene una cantidad detectable de una sustancia sólida exógena a la que se adhiere un monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, el producto procesado es fécula, una pasta, harina, copos o un pienso. En determinadas formas de realización, el producto procesado no se puede regenerar.

En el presente documento también se proporcionan composiciones que comprenden una sustancia sólida en la que está adherida un monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, la composición comprende un coloide en el que la fase sólida está dispersada en la fase líquida. En determinadas formas de realización, el coloide es un gel. En determinadas formas de realización, la composición además comprende al menos uno de un coadyuvante agrícolamente aceptable y/o un excipiente agrícolamente aceptable. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida comprende una pluralidad de partículas con

Methylobacterium adheridas a la misma. En determinadas formas de realización, las partículas tienen entre aproximadamente 2 micrómetros y aproximadamente 1000 micrómetros de longitud promedio o diámetro promedio. En determinadas formas de realización, el título de *Methylobacterium* de dichas partículas se encuentra entre al menos aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por gramo de partículas y al menos aproximadamente 5×10^{13} unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo de partículas. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida es inanimada. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida se selecciona del grupo que consiste en un material producidos por el hombre, un material de origen animal, un material de origen vegetal, un material de origen microbiano, un material de origen fúngico, un material de origen mineral y combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida se selecciona del grupo que consiste en un polisacárido, una tierra de diatomeas, un cristal de sal y combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización, el polisacárido se selecciona del grupo de un polisacárido celulósico, un polisacárido quitinoso y un polisacárido galactano. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida está esencialmente exenta de microorganismos contaminantes. En determinadas formas de realización, la composición y/o dicha sustancia sólida además comprende uno o más microorganismos de identidad predeterminada diferentes de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida comprende un coadyuvante agrícolamente aceptable o un excipiente agrícolamente aceptable. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida no es un microorganismo fotosintético. En determinadas formas de realización, la composición además comprende al menos un plaguicida y/o al menos un agente bacteriostático. En determinadas formas de realización, el plaguicida se selecciona del grupo que consiste en un insecticida, un fungicida, un nematocida y un bactericida, en las que dicho plaguicida sustancialmente no inhibe el crecimiento de dichas bacterias *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, la composición es esencialmente un producto seco, una mezcla de la sustancia sólida con *Methylobacterium* adherentes en una emulsión, o una suspensión. En determinadas formas de realización, la densidad de *Methylobacterium* adherentes sobre dicha sustancia sólida es al menos aproximadamente 1 *Methylobacterium*/20 micrómetros cuadrados de área superficial de la partícula.

Descripción breve de las figuras

Las figuras adjuntas, que se incorporan y forman una parte de la memoria descriptiva, ilustran determinadas formas de realización de la presente invención. En las figuras:

La figura 1 es una fotomicrografía de una parte alícuota de un producto de fermentación que comprende medio líquido, un sólido (conchas de diatomea) y *Methylobacterium*. Las etiquetas en la fotomicrografía indican las conchas de diatomeas sólidas y *Methylobacterium* adherentes.

La figura 2 es una fotomicrografía de una parte alícuota de un producto de fermentación que comprende medio líquido, un sólido (conchas de diatomea) y *Methylobacterium*. Las etiquetas en la fotomicrografía indican las conchas de diatomeas sólidas, *Methylobacterium* adherentes y *Methylobacterium* no adherentes.

Las figuras 3 A, B, C son fotografías de tubos de ensayo que contienen medio líquido con sustancias sólidas no particuladas con *Methylobacterium* adherentes. En 3A, se muestra el medio líquido que contiene mechones de algodón con *Methylobacterium* adherentes que imparten un color rosa oscuro al algodón. En 3B, se muestra el medio líquido que contiene lana de vidrio con *Methylobacterium* adherentes que imparten un color rosa a la lana de vidrio. En 3C, se muestra el medio líquido que contiene material exfoliante corporal con *Methylobacterium* adherentes que imparten un color rosa al material exfoliante corporal.

La figura 4 es una fotomicrografía que muestra bacterias de una cepa de PPFM *M. fujisawaense* ATCC-35065 adherida a fibras de algodón. Las etiquetas de la fotomicrografía indican las fibras de algodón, *Methylobacterium* adherentes y *Methylobacterium* no adherentes.

DESCRIPCIÓN

Definiciones

Tal como se utilizan en el presente documento, la expresión "adheridas a la misma" y el término "adherente" se refieren a *Methylobacterium* que están asociadas a una sustancia sólida mediante cultivo, o que se han cultivado en dicha sustancia.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "coadyuvante agrícolamente aceptable" se refiere a una sustancia que mejora el rendimiento de un agente activo en una composición para el tratamiento de plantas y/o partes de plantas. En determinadas composiciones, un agente activo puede comprender un monocultivo o un cocultivo de *Methylobacterium*.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "excipiente agrícolamente aceptable" se refiere a una sustancia esencialmente inerte que puede ser útil como diluyente y/o vehículo para un agente activo en una composición para el tratamiento de plantas. En determinadas composiciones, un agente activo puede comprender un monocultivo o un cocultivo de *Methylobacterium*.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “alga” se refiere a una microalga o una macroalga de cualquier tipo.

- 5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “*Methylobacterium*” se refiere a bacterias que son metilotróficas facultativas que pertenece al género *Methylobacterium*. Por lo tanto, el término “*Methylobacterium*”, tal como se utiliza en el presente documento, no abarca especies de los géneros *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylococcus*, *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylosphaera*, *Methylocaldum* y *Methylocella*, que son bacterias metanótrofas obligatorias.
- 10 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “cocultivo de *Methylobacterium*” se refiere a un cultivo de *Methylobacterium* que comprende al menos dos cepas de *Methylobacterium* o al menos dos especies de *Methylobacterium*.
- 15 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “microorganismo contaminante” se refiere a microorganismos en un cultivo, en un caldo de fermentación, en un producto de un caldo de fermentación o en una composición que no se han identificado antes de su introducción en el cultivo, el caldo de fermentación, el producto del caldo de fermentación o la composición.
- 20 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “emulsión” se refiere a una mezcla coloidal de dos líquidos inmiscibles, en la que uno de los líquidos es la fase continua y el otro es la fase dispersa. En determinadas formas de realización, la fase continua es un líquido acuoso y la fase dispersa es un líquido que no es miscible con el líquido acuoso o que tan solo es parcialmente miscible con el mismo.
- 25 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “esencialmente exento de microorganismos contaminantes” se refiere a un cultivo, un caldo de fermentación, un producto de un caldo de fermentación o una composición en los que al menos aproximadamente el 95% de los microorganismos presentes, sobre la base de su cantidad o su tipo, en el cultivo son las *Methylobacterium* deseados u otros microorganismos deseados de identidad predeterminada.
- 30 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “sustancia sólida inanimada” se refiere a una sustancia que es insoluble o parcialmente soluble en el agua o soluciones acuosas y que carece de vida o que ya no forma parte del organismo vivo del que se deriva.
- 35 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “monocultivo de *Methylobacterium*” se refiere a un cultivo de *Methylobacterium* que consiste en una única cepa de *Methylobacterium*.
- Tal como se utiliza en el presente documento, el término “plaguicida” se refiere a un agente que es un insecticida, un fungicida, un nematocida, un bactericida o cualquier combinación de los mismos.
- 40 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “agente bacteriostático” se refiere a un agente que inhibe el crecimiento de las bacterias, pero que no destruye las bacterias.
- 45 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “plaguicida que no inhibe sustancialmente el crecimiento de dicho *Methylobacterium*” se refiere a cualquier plaguicida que, cuando se proporciona en una composición que comprende productos de la fermentación que comprenden una sustancia sólida en la que están adheridos monocultivos o cocultivos de *Methylobacterium*, dan como resultado una inhibición no superior a 50% del crecimiento de *Methylobacterium* cuando la composición se aplica a una planta o una parte de una planta, en comparación con una composición que carece del plaguicida. En determinadas formas de realización, los plaguicidas dan como resultado una inhibición no superior a 40%, 20%, 10%, 5% o 1% del crecimiento de
- 50 *Methylobacterium* cuando la composición se aplica a una planta o a una parte de una planta, en comparación con la composición que carece del plaguicida.
- 55 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “bacteria PPFM” se refiere, sin limitaciones, a especies bacterianas del género *Methylobacterium* diferentes a *M. nodulans*.
- Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “sustancia sólida” se refiere a una sustancia que es insoluble o parcialmente soluble en agua o en soluciones acuosas.
- 60 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “fase sólida que puede suspenderse en la misma” se refiere a una sustancia sólida que puede distribuirse en un líquido mediante agitación.
- Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “no regenerable” se refiere a una parte de una planta o un producto vegetal procesado que no puede regenerarse para obtener una planta completa.
- 65 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “sustancialmente toda la fase sólida está suspendida en la fase líquida” se refiere a un medio en el que al menos el 95%, 98% o 99% de la(s) sustancia(s) sólida(s) que constituye(n) la fase sólida se ha(n) distribuido en el líquido mediante agitación.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “sustancialmente toda la fase sólida no está suspendida en la fase líquida” se refiere a un medio en el que menos del 5%, 2% o 1% del sólido se encuentra en forma particulada que se ha distribuido en el medio mediante agitación.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “rendimiento”, cuando se utiliza con referencia a *Methylobacterium* obtenidas en una fermentación, hace referencia a la cantidad de *Methylobacterium* obtenidas. Los procedimientos para determinar el rendimiento incluyen, pero sin limitación, la determinación de la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) por unidad de volumen o unidad de masa del material obtenido, la determinación del peso húmedo de las *Methylobacterium* obtenidas y/o la determinación del peso seco de las *Methylobacterium* obtenidas.

De haber una incoherencia entre las definiciones precedentes y las definiciones proporcionadas en cualquier referencia de patente o que no sea una patente, cualquier referencia de patente o que no sea una patente citada en el presente documento o en cualquier referencia de patente o que no sea una patente hallada en cualquier otro sitio, se entenderá que se utilizarán las definiciones anteriores en el presente documento.

Procedimientos para cultivar *Methylobacterium*, composiciones y sus usos de las mismas

Se ha determinado que, mediante el uso de procedimientos basados en el cultivo de *Methylobacterium* en medios bifásicos que comprenden una fase líquida y una sustancia sólida, es posible incrementar de manera significativa el rendimiento de *Methylobacterium*, en comparación con el rendimiento que podría obtenerse con procedimientos basados en el cultivo de *Methylobacterium* únicamente en medios líquidos. En determinadas formas de realización, los procedimientos pueden comprender cultivar *Methylobacterium* en un medio líquido con una sustancia sólida particulada que puede suspenderse en el líquido mediante agitación, en condiciones favorables para el crecimiento de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización en las que se emplean sustancias sólidas particuladas, al menos sustancialmente toda la fase sólida puede suspenderse en la fase líquida mediante agitación. Las sustancias sólidas particuladas pueden comprender materiales que tienen una longitud o un diámetro de aproximadamente 1 milímetro o inferior. En determinadas formas de realización, el nivel de agitación es suficiente para proporcionar una distribución uniforme de la sustancia sólida particulada en la fase líquida y/o niveles óptimos de aireación al cultivo. Sin embargo, en otras formas de realización proporcionadas por el presente documento, al menos sustancialmente toda la fase sólida no está suspendida en la fase líquida, o porciones de la fase sólida están suspendidas en la fase líquida y porciones de la fase sólida no están suspendidas en la fase líquida. Es posible emplear sustancias sólidas no particuladas en determinados medios bifásicos en los que la fase sólida no se suspende en la fase líquida. Dichas sustancias sólidas no particuladas pueden incluir, pero sin limitación, materiales con una longitud o un diámetro superior a aproximadamente 1 milímetro. Dichas sustancias sólidas particuladas y no particuladas también incluyen, pero sin limitación, materiales que son porosos, fibrosos o configurados de otra forma para proporcionar áreas superficiales aumentadas para el crecimiento adherente de *Methylobacterium*. Los medios bifásicos en los que porciones de la fase sólida se encuentran suspendidas en la fase líquida pueden comprender una mezcla de sustancias sólidas particuladas y no particuladas. Dichas sustancias sólidas particuladas y no particuladas que se utilizan en cualquiera de los medios bifásicos mencionados anteriormente también pueden incluir, pero sin limitación, materiales que son porosos, fibrosos o configurados de otra forma para proporcionar áreas superficiales aumentadas para el crecimiento adherente de *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, los medios comprenden un coloide formado por una fase sólida y una fase líquida. Un coloide que comprende un sólido y un líquido puede prepararse con antelación y añadirse a un medio líquido, o bien puede elaborarse en un medio que contiene un sólido y un líquido. Los coloides que comprenden un sólido y un líquido pueden prepararse efectuando cambios químicos y/o térmicos en determinadas sustancias sólidas. En determinadas formas de realización, el coloide es un gel. En determinadas formas de realización, la fase líquida de los medios es una emulsión. En determinadas formas de realización, la emulsión comprende un líquido acuoso y un líquido que no es miscible con el líquido acuoso o que tan solo es parcialmente miscible con el mismo. Los líquidos que no son miscibles con agua o que tan solo son parcialmente miscibles con la misma incluyen, sin limitaciones, cualquiera de los siguientes: (1) líquidos que tienen una miscibilidad con agua a 25 °C que es igual o inferior a la del pentanol, el hexanol o el heptanol; (2) líquidos que comprenden un alcohol, un aldehído, una cetona, un ácido graso, un fosfolípido o cualquier combinación de los mismos; (3) alcoholes seleccionados del grupo que consiste en alcoholes alifáticos que contienen al menos 5 átomos de carbono y esteroides; (4) aceites animales, aceites microbianos, aceites sintéticos, aceites vegetales o una combinación de los mismos; y (5) un aceite vegetal seleccionado del grupo que consiste en aceite de maíz, de soja, de algodón, de cacahuete, de girasol, de oliva, de lino, de coco, de palma, de semilla de colza, de semilla de sésamo, de cártamo y cualquier combinación de los mismos. En determinadas formas de realización, el líquido inmiscible o parcialmente inmiscible puede comprender al menos de aproximadamente el 0,02% a aproximadamente el 20% de la fase líquida en masa. En determinadas formas de realización, los procedimientos pueden comprender obtener un medio de cultivo bifásico que comprende el líquido, el sólido y *Methylobacterium* e incubar el cultivo en condiciones favorables para el crecimiento de *Methylobacterium*. Los medios de cultivo bifásicos que comprenden el líquido, el sólido y *Methylobacterium* pueden obtenerse mediante una diversidad de procedimientos, que incluyen, pero sin limitación, (a) la inoculación de un medio bifásico que comprende el líquido y la sustancia sólida con *Methylobacterium*; (b) la inoculación de la sustancia sólida con *Methylobacterium*, seguida de la introducción de la sustancia sólida que comprende *Methylobacterium* en el medio líquido; (c) la inoculación de la sustancia sólida con *Methylobacterium*, la incubación de *Methylobacterium* en la sustancia sólida y la introducción de la sustancia sólida que comprende *Methylobacterium* en el medio líquido; y (d) cualquier combinación (a), (b) y (c). Los procedimientos también pueden comprender las etapas de recolección de

un monocultivo o un cocultivo de *Methylobacterium*. Los procedimientos para recolectar *Methylobacterium* pueden incluir, pero sin limitación, separar las *Methylobacterium* de la fase líquida por medio de una filtración, una centrifugación, una decantación o un procedimiento semejante. Las *Methylobacterium* recolectadas obtenidas mediante estos procedimientos pueden ser *Methylobacterium* que están adheridas a la sustancia sólida, *Methylobacterium* que no están adheridas a la sustancia sólida y combinaciones de las mismas.

Los procedimientos de agitación que pueden utilizarse incluyen, pero sin limitación, agitación directa, agitación recíproca, agitación rotativa y combinaciones de las mismas. En determinadas formas de realización, la agitación puede comprender disponer un medio líquido que contiene la sustancia sólida en un agitador rotatorio que proporcione por lo menos 25, 50, 100, 200, 250, 500 o 1000 revoluciones por minuto (rpm). También puede obtenerse una agitación equivalente a la proporcionada por un agitador rotativo ajustado a al menos 25, 50, 100, 200, 250, 500 o 1000 revoluciones por minuto (rpm) mediante agitación directa, agitación recíproca u otros procedimientos. En determinadas formas de realización, al menos sustancialmente toda la fase sólida, o una porción de la fase sólida, puede suspenderse en la fase líquida al aplicar una agitación equivalente a la proporcionada por un agitador rotativo ajustado a al menos 25, 50, 100, 200, 250, 500 o 1000 revoluciones por minuto (rpm).

En determinadas formas de realización, el material recolectado que comprende una sustancia sólida con *Methylobacterium* adheridas a la misma puede disociarse. La disociación puede efectuarse mediante cualquier técnica que permita que la sustancia sólida con *Methylobacterium* adheridas a la misma se rompa dando elementos más pequeños. Pueden utilizarse técnicas de disociación incluyen, pero sin limitación, maceración, trituración, compresión, sonicación y/o disolución parcial de la sustancia sólida con *Methylobacterium* adheridas a la misma para romper la sustancia sólida con *Methylobacterium* adheridas a la misma dando elementos más pequeños. Dichos elementos más pequeños incluyen, pero sin limitación, sustancias sólidas no particuladas con *Methylobacterium* adheridas a las mismas o sustancias sólidas particuladas con *Methylobacterium* adheridas a las mismas. Dichas sustancias sólidas no particuladas y/o particuladas con *Methylobacterium* adheridas a las mismas pueden aplicarse sobre las plantas o sobre partes de las plantas de manera directa, o bien pueden incorporarse en composiciones que pueden aplicarse sobre las plantas o sobre partes de las plantas. En determinadas formas de realización, las sustancias sólidas con *Methylobacterium* adheridas a las mismas se rompen dando partículas de un diámetro de aproximadamente 1 milímetro o inferior. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida recolectada con *Methylobacterium* adheridas a las mismas, se disocia dando partículas de una longitud promedio o un diámetro promedio de entre aproximadamente 2 micrómetros y aproximadamente 1000 micrómetros. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida recolectada con *Methylobacterium* adheridas a la misma se disocia dando partículas con una longitud promedio o un diámetro promedio de entre aproximadamente 1 micrómetro y aproximadamente 1000 micrómetros. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida recolectada con *Methylobacterium* adheridas a la misma se disocia dando partículas de una longitud promedio o un diámetro promedio que puede variar entre aproximadamente 1, 2, 4, 10, 20 o 40 micrómetros y aproximadamente 100, 200, 500, 750 o 1000 micrómetros. En determinadas formas de realización, el título de *Methylobacterium* en las partículas que se obtienen por disociación puede variar entre aproximadamente 5×10^8 y aproximadamente 6×10^{10} , 3×10^{12} , 5×10^{12} , 1×10^{13} ó 5×10^{13} unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo de las partículas. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida con *Methylobacterium* adheridas a la misma también comprenderá *Methylobacterium* no adherentes. En determinadas formas de realización, las sustancias sólidas que comprenden adicionalmente *Methylobacterium* adherentes y *Methylobacterium* no adherentes también pueden disociarse para obtener cualquiera de los fragmentos o las partículas descritas anteriormente. En otras formas de realización más, pueden disociarse sustancias sólidas con *Methylobacterium* adheridas a las mismas y después pueden añadirse *Methylobacterium* no adherentes a las sustancias sólidas que comprenden *Methylobacterium* adherentes.

Las sustancias sólidas con *Methylobacterium* adheridas a las mismas pueden disociarse cuando se encuentran o bien en una forma húmeda o bien en una forma seca. El secado de la sustancia sólida con *Methylobacterium* puede efectuarse mediante cualquier técnica que sea apropiada para mantener la viabilidad de la mayor parte de las *Methylobacterium* adherentes y, si están presentes, no adherentes. Dichas técnicas de secado incluyen liofilización, desecación, calentamiento o cualquier combinación de las mismas. En determinadas formas de realización, el secado puede llevarse a cabo después de la disociación de una sustancia sólida con *Methylobacterium* adheridas a la misma para obtener fragmentos o partículas de la sustancia sólida con *Methylobacterium* adheridas a la misma. En otras formas de realización, una sustancia sólida con *Methylobacterium* adheridas a la misma, o una sustancia sólida que comprende *Methylobacterium* adherentes y *Methylobacterium* no adherentes puede secarse y luego disociarse. En determinadas formas de realización en las que la sustancia sólida con *Methylobacterium* adheridas a la misma o una sustancia sólida con *Methylobacterium* adherentes y *Methylobacterium* no adherentes se seca y luego se disocia, las sustancias sólidas que se vuelven friables después del secado pueden utilizarse como la sustancia sólida en el proceso de fermentación de *Methylobacterium*. Los ejemplos de dichas sustancias sólidas que se vuelven friables después del secado y que pueden usarse en los procedimientos proporcionados por el presente documento incluyen, sin limitaciones, determinados materiales de origen vegetal (por ejemplo, determinados materiales que comprenden celulosa, hemicelulosa y/o lignina) y similares.

Los caldos de fermentación bifásicos que se utilizan en los procedimientos proporcionados por el presente documento pueden ser cultivos axénicos que se encuentran esencialmente exentos de microorganismos contaminantes. En determinadas formas de realización, al menos aproximadamente el 95%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, 99,9% o 100% de los microorganismos presentes en un cultivo, el caldo de fermentación, el producto de la

fermentación o composiciones proporcionadas por el presente documento, sobre la base de su cantidad o su tipo, son las *Methylobacterium* deseadas u otros microorganismos deseados de identidad predeterminada. Las *Methylobacterium* deseadas u otros microorganismos deseados de identidad predeterminada son microorganismos que se obtienen a partir de un cultivo puro. Para obtener dichos cultivos axénicos, los componentes líquidos y los componentes sólidos que se emplean en el medio de cultivo bifásico se esterilizan o se obtienen en formas esencialmente estériles antes de inocularlos con *Methylobacterium* y/o con cualquier otro microorganismo deseado adicional en el monocultivo o el cocultivo. La esterilización de los diversos componentes sólidos o líquidos puede lograrse mediante una diversidad de procedimientos, tales como esterilización en autoclave, irradiación, filtración (en el caso de los líquidos) o similares. Puede obtenerse un cultivo, un caldo de fermentación, un producto de fermentación o una composición que se encuentra esencialmente exenta de microorganismos contaminantes cuando los componentes líquidos y/o sólidos de ese cultivo, caldo de fermentación, producto de fermentación o composición ya eran estériles antes de la inoculación o la introducción de los microorganismos deseados de identidad predeterminada y se toman medidas apropiadas para evitar la contaminación del cultivo o la contaminación de la composición durante el crecimiento de los microorganismos deseados.

Los procedimientos proporcionados en el presente documento en los que se cultivan *Methylobacterium* en medios bifásicos que comprenden una fase líquida y una sustancia sólida, pueden ponerse en práctica por medio de una fermentación en lotes, una fermentación en lotes alimentados o una fermentación en continuo. Los caldos de fermentación, los productos de los caldos de fermentación y las composiciones proporcionadas por el presente documento también pueden obtenerse por medio de una fermentación en lotes, una fermentación en lotes alimentados o una fermentación en continuo. En determinadas formas de realización, pueden controlarse factores tales como el pH y la concentración del oxígeno en los procesos utilizados en los procedimientos proporcionados en el presente documento en una fermentación en lotes, en una fermentación en lotes alimentados o en una fermentación en continuo.

Los monocultivos o los cocultivos de *Methylobacterium*, los caldos de fermentación o los productos de los caldos de fermentación proporcionados en el presente documento pueden comprender una o más *Methylobacterium* que incluyen, pero sin limitación, *M. aminovorans*, *M. clorometanicum*, *M. diclorometanicum*, *M. extorquens*, *M. fujisawaense*, *M. mesophilicum*, *M. organophilum*, *M. radiotolerans*, *M. rhodesianum*, *M. rhodium*, *M. tiocianatum*, *M. nodulans*, *M. cerastii*, *M. gossipiicola*, la cepa LMG6378 de *Methylobacterium* sp., *M. phyllosphaerae*, *M. oryzae*, *M. platani*, *M. populi* o *M. zatmanii*. En determinadas formas de realización, los monocultivos o los cocultivos de *Methylobacterium*, los caldos de fermentación o los productos de los caldos de fermentación resultantes proporcionados por el presente documento pueden consistir en una o más *Methylobacterium*. Sin embargo, los procedimientos proporcionados por el presente documento también pueden utilizarse con otras *Methylobacterium*. Las *Methylobacterium* también pueden obtenerse mediante diversos procedimientos publicados (Madhaiyan et al., 2007). En determinadas formas de realización, dichas otras *Methylobacterium* que pueden usarse pueden ser *Methylobacterium* que comprenden secuencias de ARN 16S que son al menos aproximadamente el 60%, 70%, 80%, 90% o 95% idénticas a las de otras ARN 16S *Methylobacterium* conocidas. La caracterización de *Methylobacterium* utilizando comparaciones de secuencias de ARN 16S se describe, al menos, por Cao et al., 2011. En determinadas formas de realización, los monocultivos o los cocultivos y los productos resultantes pueden comprender una *Methylobacterium* que puede colonizar plantas y/o partes de las plantas. Las *Methylobacterium* que pueden colonizar plantas y/o partes de las plantas incluyen, sin limitaciones, *M. extorquens*, *M. nodulans* y *M. mesophilicum*. Las *Methylobacterium* que pueden colonizar plantas y/o partes de las plantas también incluyen, pero sin limitaciones, especies de *Methylobacterium cerastii* (una cepa representativa de esta especie, DSM 23679, se encuentra disponible en la DMSZ Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ) del Instituto Leibniz, Braunschweig, Alemania), especies de *Methylobacterium gossipiicola* (una cepa representativa de esta especie, NRRL B-51692, se encuentra disponible en la ARS del USDA, Peoria, IL, EE.UU.), la cepa LMG6378 de *Methylobacterium* sp. (que se encuentra disponible en la Colección Coordinada de Microorganismos del Laboratorio de Microbiología de Bélgica ("BCCLM"), Gante, Bélgica), *Methylobacterium phyllosphaerae* (una cepa representativa de esta especie, DSM 19779T, se encuentra disponible en la DSMZ), *Methylobacterium oryzae* (una cepa representativa de esta especie, DSM 18207T, se encuentra disponible en la DSMZ), *Methylobacterium nodulans* (una cepa representativa de esta especie, LMG 21967, se encuentra disponible en la BCCLM), *Methylobacterium platani* (una cepa representativa de esta especie, KCTC 12901, se encuentra disponible en la Colección de Cultivos Tipo de Corea (KCTC), Yusong-Ku, Taejeon, Corea) y *Methylobacterium populi* (una cepa representativa de esta especie, ATCC BAA-705, se encuentra disponible en la ATCC). Por lo tanto, se proporcionan caldos de fermentación, productos de los caldos de fermentación, composiciones, procedimientos para producir las mismas y procedimientos de utilización de las mismas, que incluyen, pero sin limitación, procedimientos para tratar las plantas, en los que la *Methylobacterium* es una *Methylobacterium* que puede colonizar una planta y/o una parte de la planta que se selecciona del grupo que consiste en *M. extorquens*, *M. nodulans*, *M. mesophilicum*, *M. cerastii*, *M. gossipiicola*, la cepa LMG6378 de *Methylobacterium* sp., *M. phyllosphaerae*, *M. oryzae*, *M. platani* o *M. populi*. En diversas publicaciones (véase Madhaiyan et al. y las referencias citadas en la misma) se han descrito procedimientos para aislar otras *Methylobacterium* capaces de colonizar plantas y/o partes de las plantas que también pueden usarse. Sin desear limitarse a ninguna teoría, se cree que los procedimientos de cultivo de *Methylobacterium* en medios bifásicos que comprenden un líquido y una sustancia sólida proporcionados en el presente documento pueden resultar especialmente ventajosos para cultivar *Methylobacterium* que pueden colonizar plantas y/o partes de las plantas o que pueden aislarse a partir de la superficie de plantas y/o de partes de las plantas.

Las *Methylobacterium* representativas que se pueden usar en los caldos de fermentación, productos de caldo de fermentación, composiciones y procedimientos relacionados proporcionados por el presente documento incluyen, pero sin limitación, las *Methylobacterium* de la tabla 1.

5 **Tabla 1. *Methylobacterium* representativas**

<i>Methylobacterium</i>	Números de acceso al depósito para la cepa tipo
<i>Methylobacterium adhaesivum</i>	AR27 = CCM 7305 = CECT 7069=DSM 17169T=KCTC 22099T
<i>Methylobacterium aerolatum</i>	DSM 19013 = JCM 16406 = KACC 11766
<i>Methylobacterium aminovorans</i>	ATCC 51358 = CIP 105328 = IFO (ahora NBRC) 15686 = JCM 8240 = VKM B-2145
<i>Methylobacterium aquaticum</i>	CCM 7218 = CECT 5998 = CIP 108333 = DSM 16371
<i>Methylobacterium brachiatum</i>	DSM 19569 = NBRC 103629 = NCIMB 14379
<i>Methylobacterium bullatum</i>	DSM 21893 = LMG 24788
<i>Methylobacterium cerastii</i>	CCM 7788 = CCUG 60040 = DSM 23679
<i>Methylobacterium clorometanicum</i>	NCIMB 13688 = VKM B-2223
<i>Methylobacterium diclorometanicum</i>	CIP 106787 = DSM 6343 = VKM B-2191
<i>Methylobacterium extorquens</i>	ATCC 43645 = CCUG 2084 = DSM 1337 = IAM 12631 = IFO (ahora NBRC) 15687 = JCM 2802 = NCCB 78015 = NCIB (ahora NCIMB) 9399 = VKM B-2064.
<i>Methylobacterium fujiisawaense</i>	ATCC 43884 = CIP 103775 = DSM 5686 = IFO (ahora NBRC) 15843 = JCM 10890 = NCIB (ahora NCIMB) 12417
<i>Methylobacterium gossypicola</i>	CCM 7572 = NRRL B-51692
<i>Methylobacterium gregans</i>	DSM 19564 = NBRC 103626 = NCIMB 14376
<i>Methylobacterium hispanicum</i>	GP34 = CCM 7219 = CECT 5997 = CIP 108332 = DSM 16372
<i>Methylobacterium iners</i>	DSM 19015 = JCM 16407 = KACC 11765
<i>Methylobacterium isbiliense</i>	CCM 7304 = CECT 7068
<i>Methylobacterium jeotgali</i>	KCTC 12671 = LMG 23639
<i>Methylobacterium komagatae</i>	DSM 19563 = NBRC 103627 = NCIMB 14377
<i>Methylobacterium longum</i>	CECT 7806 = DSM 23933
<i>Methylobacterium lusitanum</i>	DSM 14457 = NCIMB 13779 = VKM B-2239
<i>Methylobacterium marchantiae</i>	CCUG 56108 = DSM 21328
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	ATCC 29983 = CCUG 16482 = CIP 101129 = DSM 1708 = ICPB 4095 = IFO (ahora NBRC) 15688 = JCM 2829 = LMG 5275 = NCIB (ahora NCIMB) 11561 = NRRL B-14246
<i>Methylobacterium nodulans</i>	LMG 21967 = ORS 2060
<i>Methylobacterium organophilum</i>	ATCC 27886 = CIP 101049 = DSM 760 = HAMB1 2263 = IFO (ahora NBRC) 15689 = JCM 2833 = LMG 6083 = NCCB 78041 = VKM B-2066
<i>Methylobacterium oryzae</i>	DSM 18207 = JCM 16405 = KACC 11585 = LMG 23582
<i>Methylobacterium persicinum</i>	DSM 19562 = NBRC 103628 = NCIMB 14378
<i>Methylobacterium phyllosphaerae</i>	DSM 19779 = JCM 16408 = KACC 11716 = LMG 24361
<i>Methylobacterium platani</i>	JCM 14648 = KCTC 12901
<i>Methylobacterium podarium</i>	ATCC BAA-547 = DSM 15083
<i>Methylobacterium populi</i>	ATCC BAA-705 = NCIMB 13946
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	ATCC 27329 = CIP 101128 = DSM 1819 = IFO (ahora NBRC) 15690 = JCM 2831 = LMG 2269 = NCIB (ahora NCIMB) 10815 = VKM B-2144
<i>Methylobacterium rhodinum</i>	ATCC 14821 = CIP 101127 = DSM 2163 = IFO (ahora NBRC) 15691 = JCM 2811 = LMG 2275 = NCIB (ahora NCIMB) 9421 = VKM B-2065
<i>Methylobacterium suomiense</i>	DSM 14458 = NCIMB 13778 = VKM B-2238
<i>Methylobacterium tardum</i>	DSM 19566 = NBRC 103632 = NCIMB 14380
<i>Methylobacterium tiocyanatum</i>	ATCC 700647 = DSM 11490 = JCM 10893 = VKM B-2197
<i>Methylobacterium variabile</i>	CCM 7281 = CECT 7045 = DSM 16961
<i>Methylobacterium zatmanii</i>	ATCC 43883 = CCUG 36916 = CIP 103774 = DSM 5688 = IFO (ahora NBRC) 15845 = JCM 10892 = LMG 6087 = NCIB (ahora NCIMB) 12243 = VKM B-2161

Clave de depósitos

ATCC: Colección Americana de Cultivos de Tejidos Tipo, Manassas, VA, EE.UU.

CCUG: Colección de Cultivos, Universidad de Göteborg, Suecia

CIP: Colección del Instituto Pasteur, París, FR

DSM Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares DSMZ ("DSMZ"), Braunschweig, Alemania

5 JCM: Colección Japonesa de Microorganismos, Saitama, Japón

LMG: Colecciones Belgas Coordinadas de Microorganismos/Laboratorio de Microbiología ("BCCLM") Gante, Bélgica

10 NBRC: Centro de Recursos Biológicos (NBRC), Chiba, Japón

NCIMB: Colección Nacional de Bacterias Industriales, de Alimentos y Marinas, Reino Unido

NRRL: USDA ARS, Peoria, IL., EE.UU.

15 En determinadas formas de realización, los monocultivos o cocultivos y caldos de fermentación resultantes y productos de caldos de fermentación pueden comprender una o más formas aisladas o mutantes de *Methylobacterium* que producen niveles aumentados de nutrientes o reguladores del crecimiento vegetal útiles. La patente de los EE.UU. N°: 8.153.118 divulga diferentes formas aisladas de *Methylobacterium* que producen niveles
20 aumentados de vitamina B-12 y aminoácidos que se pueden usar en los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento. También se proporcionan caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación y composiciones que comprenden una o más *Methylobacterium* tal como *Methylobacterium mutant* B12-11 que tiene el número de acceso de ATCC PTA-1561 que sobreproduce vitamina B-12, *Methylobacterium* rhodinum (N° ATCC 43282) que sobreproduce el aminoácido treonina, *Methylobacterium* sp. (N° ATCC 21371) que
25 sobreproduce el aminoácido ácido L-glutámico, *Methylobacterium* sp. (N° ATCC 21372) que sobreproduce el aminoácido ácido L-glutámico, *Methylobacterium* sp. (N° ATCC 21926) que sobreproduce el aminoácido L-lisina, *Methylobacterium* sp. (N° ATCC 21969) que sobreproduce el aminoácido ácido L-glutámico, *Methylobacterium* sp. (N° ATCC 21927) que sobreproduce los aminoácidos L-lisina, ácido L-aspartico, L-alanina, L-valina, L-leucina y L-arginina y/o *Methylobacterium* sp. (N° ATCC21438) que produce proteínas de una única célula.

30 En determinadas formas de realización, el caldo de fermentación, el producto del caldo de fermentación o las composiciones que se proporcionan en el presente documento pueden comprender además uno o más microorganismos introducidos de identidad predeterminada distintos a *Methylobacterium*. Otros microorganismos que se pueden añadir incluyen, pero sin limitación, microorganismos que son bioplaguicidas o que proporcionan
35 algún otro beneficio cuando se aplican a una planta o parte de planta. Los microorganismos bioplaguicidas o de alguna forma beneficiosos, por consiguiente, incluyen, pero sin limitación, diversos *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Coniothyrium* sp., *Pantoea* sp., *Streptomyces* sp. y *Trichoderma* sp. Los bioplaguicidas microbianos pueden ser una bacteria, un hongo, un virus o un protozoo. Los microorganismos bioplaguicidas particularmente útiles incluyen diversas cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus pumilis*, *Pseudomonas syringae*, *Trichoderma*
40 *harzianum*, *Trichoderma virens*, y *Streptomyces lydicus*. Otros microorganismos que se pueden añadir pueden estar genéticamente modificados o pueden ser aislados de origen naturales que están disponibles como cultivos puros. En determinadas formas de realización, se anticipa que el microorganismo bacteriano o fúngico puede proporcionarse en el caldo de fermentación, en el producto del caldo de fermentación o en la composición en forma de una espora. Otros microorganismos más que se pueden añadir incluyen, pero sin limitación, microorganismos que son
45 microorganismos fotosintéticos. Dichos microorganismos fotosintéticos incluyen, pero sin limitación, algas. Dichas algas pueden incluir, pero sin limitación, algas de los géneros *Protococcus*, *Ulva*, *Codium*, *Enteromorfa*, *Neocloris*, y/o *Chlamydomonas*.

50 En determinadas formas de realización, el medio de cultivo líquido se prepara a partir de componentes baratos y fácilmente disponibles, incluyendo, pero sin limitación, sales inorgánicas tales como fosfato de potasio, sulfato de magnesio y similares, fuentes de carbono tales como glicerol, metanol, ácido glutámico, ácido aspártico, ácido succínico y similares, y mezclas de aminoácidos tales como peptona, triptona, y similares. Los ejemplos de medios líquidos que se pueden usar incluyen, pero sin limitación, medio de sales minerales de amonio (AMS) (Whittenbury et al., 1970), medio de cultivo mínimo de Vogel-Bonner (VB) (Vogel y Bonner, 1956), y medio LB ("Luria - Bertani
55 Broth").

En general, la sustancia sólida que se usa en los procedimientos y composiciones que proporcionan un crecimiento eficaz de *Methylobacterium* puede ser cualquier sustancia sólida adecuada que sea insoluble o solo parcialmente soluble en agua o en soluciones acuosas. Dichas sustancias sólidas adecuadas también son no bactericidas o no
60 bacteriostáticas con respecto a *Methylobacterium* cuando se proporcionan las sustancias sólidas en el medio de cultivo líquido. En determinadas formas de realización, dichas sustancias sólidas adecuadas también son sustancias sólidas que se pueden obtener fácilmente en forma estéril o hacerse estériles. Las sustancias sólidas que se usan en el presente documento se pueden esterilizar por cualquier procedimiento que proporcione la eliminación de microorganismos contaminantes y que por consiguiente incluye, pero sin limitación, procedimientos tales como
65 esterilización en autoclave, irradiación, tratamiento químico y cualquier combinación de los mismos. Estas sustancias sólidas incluyen sustancias naturales de origen animal, vegetal, microbiano, fúngico o mineral, sustancias producidas por el hombre o combinaciones de sustancias naturales y producidas por el hombre. En determinadas formas de realización, las sustancias sólidas son sustancias sólidas inanimadas. Las sustancias sólidas inanimadas

de origen animal, vegetal, microbiano o fúngico se pueden obtener a partir de animales, plantas, microbios u hongos que son inviables (es decir que no viven más) o que se han hecho inviables. Por consiguiente las conchas de diatomeas son sustancias sólidas inanimadas, cuando previamente se han eliminado o se han hecho de algún modo inviables las algas de diatomea asociadas. Debido a que las conchas de diatomea son sustancias sólidas inanimadas, las mismas no se consideran como organismos fotosintéticos o microorganismos fotosintéticos. En determinadas formas de realización, las sustancias sólidas incluyen, pero sin limitación, arena, limo, tierra, arcilla, cenizas, carbón vegetal, tierra de diatomeas y otros minerales similares, vidrio molido o perlas de vidrio, materiales cerámicos molidos, perlas cerámicas, bentonita, caolín, talco, perlita, mica, vermiculita, sílices, polvo de cuarzo, montmorillonita, y combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida puede ser un polímero o perlas poliméricas. Los polímeros que se pueden usar como sustancia sólida incluyen, pero sin limitación, diversos polisacáridos tales como polímeros de celulosa y polímeros de quitina que son insolubles o solo parcialmente solubles en agua o soluciones acuosas, agar (es decir galactanos), y combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida puede ser un cristal de sal insoluble o solo parcialmente soluble. Los cristales de sales que se pueden usar incluyen, pero sin limitación, carbonatos, cromatos, sulfitos, fosfatos, hidróxidos, óxidos, y sulfuros insolubles o solo parcialmente solubles. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida puede ser una célula microbiana, una célula fúngica, una espora microbiana o una espora fúngica. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida puede ser una célula microbiana o una espora microbiana en la que la célula microbiana o la espora microbiana no es un microorganismo fotosintético. En determinadas formas de realización, la célula microbiana o la espora microbiana no es un microorganismo fotosintético, en la que el microorganismo fotosintético se selecciona del grupo que consiste en algas, cianobacterias, diatomeas, *Botryococcus braunii*, *Clorella*, *Dunaliella tertiolecta*, *Gracilaria*, *Pleurochrysis carterae*, *Sargassum*, y *Ulva*. En otras formas de realización más, la sustancia sólida puede ser una célula microbiana, una célula fúngica, una espora microbiana o una espora fúngica inactivada (es decir inviable). En otras formas de realización más, la sustancia sólida puede ser una célula microbiana, una célula fúngica, una espora microbiana o una espora fúngica quiescente (es decir viable pero no con división activa). En otras formas de realización más, la sustancia sólida puede ser un desecho celular de origen microbiano. En otras formas de realización más, la sustancia sólida puede ser materia particulada de cualquier parte de una planta. Las partes de plantas que se pueden usar para obtener la sustancia sólida incluyen, pero sin limitación, mazorcas, cáscaras, vainas, hojas, raíces, flores, tallos, corteza, semillas y combinaciones de los mismos. También se pueden usar los productos que se obtienen a partir de partes de plantas procesadas incluyendo, pero sin limitación, bagazo, salvado de trigo, sémola de soja, torta de semillas trituradas, rastrojos y similares. Dichas partes de plantas, plantas procesadas y/o partes de plantas procesadas se pueden moler para obtener el material sólido en una forma particulada que puede usarse. En determinadas formas de realización, se puede usar madera o un producto de madera incluyendo, pero sin limitación, pulpa de madera, serrín, virutas y similares. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida puede ser un material particulado de animal(es), incluyendo, pero sin limitación, harina de huesos, gelatina, conchas molidas o en polvo, pelo, macerados de piel y similares.

En determinadas formas de realización, la sustancia sólida se proporciona en una forma particulada que proporciona una distribución de la sustancia sólida en el medio de cultivo. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida está comprendida por partículas de entre aproximadamente 2 micrómetros y aproximadamente 1000 micrómetros de longitud promedio o de diámetro promedio. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida está comprendida por partículas de entre aproximadamente 1 micrómetro y aproximadamente 1000 micrómetros de longitud promedio o de diámetro promedio. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida es una partícula de entre aproximadamente 1, 2, 4, 10, 20 o 40 micrómetros y cualquiera de aproximadamente 100, 200, 500, 750 o 1000 micrómetros de longitud promedio o de diámetro promedio. Las características deseables de las partículas que se usan en los procedimientos y composiciones que se proporcionan en el presente documento incluyen una humectabilidad adecuada tal que las partículas se puedan resuspender en el medio mediante agitación.

En determinadas formas de realización, la sustancia sólida se proporciona en el medio como coloide en el que la fase continua es un líquido y la fase dispersa es el sólido. Los sólidos adecuados que se pueden usar para formar coloides en medio líquido que se usa para cultivar las *Methylobacterium* incluyen, pero sin limitación, diversos sólidos que se denominan hidrocoloides. Dichos hidrocoloides que se usan en los medios, procedimientos y composiciones que se proporcionan en el presente documento pueden ser polímeros hidrófilos, de origen vegetal, animal, microbiano o sintético. Los polímeros hidrocoloides que se usan en los procedimientos pueden contener muchos grupos hidroxilos y/o pueden ser polielectrolitos. Los polímeros hidrocoloides que se usan en las composiciones y procedimientos que se proporcionan en el presente documento incluyen, pero sin limitación, agar, alginato, arabinosilano, carragenano, carboximetilcelulosa, celulosa, curdlano, gelatina, gelano, β -glucano, goma guar, goma arábiga, goma de garrofín, pectina, almidón, goma xantano y mezclas de los mismos. En determinadas formas de realización, el coloide que se usa en los medios, procedimientos y composiciones que se proporcionan en el presente documento puede comprender un polímero hidrocoloide y una o más proteínas.

En determinadas formas de realización, la sustancia sólida puede ser una sustancia sólida que proporciona el crecimiento adherente de las *Methylobacterium* sobre la sustancia sólida. Las *Methylobacterium* que se adhieren a una sustancia sólida son *Methylobacterium* que sustancialmente no se pueden retirarse por simple lavado de la sustancia sólida con las *Methylobacterium* adherentes con medio de crecimiento, mientras que las *Methylobacterium* no adherentes se pueden retirar sustancialmente por lavado de la sustancia sólida con medio de crecimiento líquido. En este contexto, "sustancialmente retirado" significa que se retiran al menos aproximadamente el 30%, 40%, 50%,

60%, 70% u 80% de las *Methylobacterium* presentes cuando se lava la sustancia sólida con tres volúmenes de medio de crecimiento líquido. Dicho lavado se puede efectuar mediante una diversidad de procedimientos que incluyen, pero sin limitación, decantación de líquido a partir de una fase sólida lavada o pasaje de líquido a través de una fase sólida por un filtro que permite el filtrado de las bacterias presentes en el líquido. En determinadas formas de realización, las *Methylobacterium* adherentes que están asociadas con el sólido pueden incluir tanto a *Methylobacterium* que están directamente unidas al sólido como a *Methylobacterium* que están indirectamente unidas a la sustancia sólida. Las *Methylobacterium* que están unidas indirectamente a la sustancia sólida incluyen, pero sin limitación, *Methylobacterium* que están unidos a otra *Methylobacterium* o a otro microorganismo que esté unido a la sustancia sólida, *Methylobacterium* que están unidas a la sustancia sólida estando unidos a otra sustancia que está unida a la sustancia sólida, y similares. En determinadas formas de realización, al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de las *Methylobacterium* presentes en el caldo de fermentación, en el producto del caldo de fermentación o en las composiciones son *Methylobacterium* que se adhieren a la sustancia sólida. En determinadas formas de realización, las *Methylobacterium* adherentes pueden estar presentes sobre la superficie de la sustancia sólida en el caldo de fermentación, en el producto del caldo de fermentación o en la composición a una densidad de al menos entre aproximadamente 1 *Methylobacterium*/20 micrómetros cuadrados y aproximadamente 1 *Methylobacterium*/micrómetro cuadrado, de al menos entre aproximadamente 1 *Methylobacterium*/10 micrómetros cuadrados, de al menos entre aproximadamente 1 *Methylobacterium*/5 micrómetros cuadrados, de al menos entre aproximadamente 1 *Methylobacterium*/2 micrómetros cuadrados o de al menos entre aproximadamente 1 *Methylobacterium*/micrómetro cuadrado. En determinadas formas de realización, las *Methylobacterium* adherentes pueden estar presentes sobre la superficie de la sustancia sólida en el caldo de fermentación, en el producto del caldo de fermentación o en la composición a una densidad de al menos entre aproximadamente 1 *Methylobacterium*/20 micrómetros cuadrados y aproximadamente 1 *Methylobacterium*/micrómetro cuadrado, de al menos entre aproximadamente 1 *Methylobacterium*/10 micrómetros cuadrados y aproximadamente 1 *Methylobacterium*/micrómetro cuadrado, de al menos entre aproximadamente 1 *Methylobacterium*/5 micrómetros cuadrados y aproximadamente 1 *Methylobacterium*/micrómetro cuadrado o de al menos entre aproximadamente 1 *Methylobacterium*/2 micrómetros cuadrados y aproximadamente 1 *Methylobacterium*/micrómetro cuadrado. En determinadas formas de realización, las *Methylobacterium* adherentes pueden estar presentes sobre la superficie de la sustancia sólida en el caldo de fermentación, en el producto del caldo de fermentación o en la composición a una densidad de al menos entre aproximadamente 1 *Methylobacterium*/20 micrómetros cuadrados y aproximadamente 1 *Methylobacterium*/2 micrómetros cuadrados, de al menos entre aproximadamente 1 *Methylobacterium*/10 micrómetros cuadrados y aproximadamente 1 *Methylobacterium*/2 micrómetros cuadrados o de al menos entre aproximadamente 1 *Methylobacterium*/5 micrómetros cuadrados y aproximadamente 1 *Methylobacterium*/2 micrómetros cuadrados. Los caldos de fermentación bifásicos que se proporcionan en el presente documento pueden comprender una fase líquida que contiene las *Methylobacterium* no adherentes. En determinadas formas de realización, los títulos de *Methylobacterium* no adherentes en la fase líquida pueden ser menos que aproximadamente 100.000, 10.000 o 1.000 UFC/ml.

Los procedimientos de cultivos bifásicos que se proporcionan pueden proporcionar caldos de fermentación con *Methylobacterium* a un título superior a aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro, a un título superior a aproximadamente 1×10^9 unidades formadoras de colonias por mililitro, a un título superior a aproximadamente 1×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro, a un título de al menos aproximadamente 3×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro. En determinadas formas de realización, los caldos de fermentación que se proporcionan en el presente documento pueden comprender *Methylobacterium* a un título de al menos entre aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro y al menos aproximadamente 3×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro, entre al menos aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro y al menos aproximadamente 4×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro o entre al menos aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro y al menos aproximadamente 6×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro. En determinadas formas de realización, los caldos de fermentación que se proporcionan en el presente documento pueden comprender *Methylobacterium* a un título de entre al menos aproximadamente 1×10^9 unidades formadoras de colonias por mililitro y al menos aproximadamente 3×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro, de entre al menos aproximadamente 1×10^9 unidades formadoras de colonias por mililitro y al menos aproximadamente 4×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro o de entre al menos aproximadamente 1×10^9 unidades formadoras de colonias por mililitro y al menos aproximadamente 6×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro. En determinadas formas de realización, los caldos de fermentación que se proporcionan en el presente documento comprenderán *Methylobacterium* a un título de entre al menos aproximadamente 1×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro y al menos aproximadamente 3×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro, de entre al menos aproximadamente 1×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro y al menos aproximadamente 4×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro o de entre al menos aproximadamente 1×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro y al menos aproximadamente 6×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro. En determinadas formas de realización, los caldos de fermentación que se proporcionan en el presente documento comprenderán *Methylobacterium* a un título de entre al menos aproximadamente 3×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro y al menos aproximadamente 4×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro o de entre al menos aproximadamente 3×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro y al menos aproximadamente 6×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro.

También se proporcionan en el presente documento procedimientos para obtener una preparación de *Methylobacterium* en la que las *Methylobacterium* o bien se cultivan en un recipiente de cultivo que comprende o contiene una o más superficies sólidas que proporcionan crecimiento adherente a las *Methylobacterium* o bien se cultivan en medio que comprende una fase líquida y una fase sólida, y luego se recolectan retirándolas de la superficie sólida o de la fase sólida a la que estaban adheridas. En determinadas formas de realización en las que se usa una superficie sólida que proporciona un crecimiento adherente de las *Methylobacterium*, la superficie sólida puede formar parte del recipiente de cultivo mismo. En otras formas de realización más, una superficie sólida que está contenida en un recipiente de cultivo es una superficie sólida que se puede desprender del recipiente de cultivo, en particular después o durante el transcurso de una operación de fermentación, para facilitar la retirada de las *Methylobacterium* adherentes. Los ejemplos no limitantes de superficies sólidas incluyen esferas, anillos, cilindro y otras formas que proporcionan una mejor relación de área superficial a volumen. Las superficies sólidas que se usan en el recipiente de cultivo pueden ser o bien porosas o bien lisas. Los ejemplos de superficies sólidas que se usan en los recipientes de cultivos pueden estar fabricadas de materiales que incluyen, pero sin limitación, metales recubiertos o no recubiertos, vidrio, plásticos, cerámicas o combinaciones de los mismos que permitan un crecimiento adherente de *Methylobacterium*. Después del cultivo, las *Methylobacterium* que se han adherido a la superficie sólida o a la fase sólida se pueden recolectar mediante uno o más de un tratamiento(s) físico(s) y/o químico(s). En determinadas formas de realización de estos procedimientos, también se pueden recolectar las *Methylobacterium* no adherentes que se han acumulado en la fase líquida. Los tratamientos químicos que se usan para recolectar las *Methylobacterium* incluyen, pero sin limitación, exponer las *Methylobacterium* adherentes a un cambio en la fuerza iónica, un cambio de pH, un tratamiento con detergente, un tratamiento con disolvente, un tratamiento enzimático y combinaciones de los mismos. Los tratamientos enzimáticos que se usan para recolectar las *Methylobacterium* pueden incluir, pero sin limitación, exponer las *Methylobacterium* adheridas a la superficie sólida o a la fase sólida a una proteasa, una lipasa, una glucanasa o cualquier combinación de las mismas. Los tratamientos con detergentes que se usan para recolectar las *Methylobacterium* pueden incluir, pero sin limitación, exponer las *Methylobacterium* adheridas a la superficie sólida o a la fase sólida a un detergente iónico, un detergente no iónico o cualquier combinación de los mismos. Los tratamientos físicos que se usan para recolectar las *Methylobacterium* pueden incluir, pero sin limitación, exponer las *Methylobacterium* adheridas a la superficie sólida o a la fase sólida a sonicación, raspado, un líquido presurizado, una lechada presurizada, calor o cualquier combinación de los mismos. En determinadas formas de realización, las *Methylobacterium* no adherentes se pueden recolectar del líquido en el recipiente de cultivo. En otras formas de realización más, las *Methylobacterium* no adherentes se pueden recolectar del líquido en el recipiente de cultivo y las *Methylobacterium* adherentes se pueden recolectar de la superficie sólida.

Sin pretender estar limitados por ninguna teoría, se cree que el sólido presente en el medio de cultivo bifásico proporciona una superficie sobre la que se pueden adherir y cultivar las *Methylobacterium*. Dicho crecimiento adherente sobre el sólido en el medio de cultivo bifásico se cree que es más rápido (es decir proporciona un tiempo de duplicación disminuido) que el crecimiento en ausencia del sólido. Se cree que tanto la cantidad (es decir unidades formadoras de colonias por mililitro) como la densidad (*Methylobacterium* por micrómetros cuadrados) de *Methylobacterium* se incrementarán durante el transcurso de la fermentación hasta alcanzar una cantidad y/o una densidad máxima. En determinadas formas de realización, se cree que las células hijas de una célula madre adherente pueden crecer sobre la superficie sólida, crecer sobre la célula madre adherente y/o se pueden esparcir en la fase líquida. Por consiguiente, también se cree que la cantidad (es decir unidades formadoras de colonias por mililitro) de *Methylobacterium* en la fase líquida puede incrementarse hasta que se alcanza un número máximo.

Las sustancias sólidas con *Methylobacterium* adherentes se pueden usar para producir diferentes composiciones útiles para tratar plantas o partes de plantas. Como alternativa, se pueden usar caldos de fermentación o productos de caldos de fermentación que comprenden sustancias sólidas con *Methylobacterium* adherentes para tratar plantas o partes de plantas. Por consiguiente se proporcionan plantas, partes de plantas, y, en particular, semillas de plantas que se han recubierto al menos parcialmente con los productos de caldos de fermentación o composiciones. También se proporcionan productos vegetales procesados que contienen los productos de caldos de fermentación o composiciones. Las sustancias sólidas con *Methylobacterium* adherentes se pueden usar para producir diversas composiciones que son particularmente útiles para tratar semillas de plantas. Por consiguiente se proporcionan semillas que se han recubierto al menos parcialmente con los productos de caldos de fermentación o composiciones. También se proporcionan productos de semillas procesadas, incluyendo, pero sin limitación, harina, fécula, un pienso y copos que contienen los productos de caldos de fermentación o las composiciones que se proporcionan en el presente documento. En determinadas formas de realización, el producto vegetal procesado será no regenerable (es decir será incapaz de desarrollarse dando una planta). En determinadas formas de realización, la sustancia sólida que se usa en el producto de fermentación o composición que recubre al menos parcialmente la planta, parte de planta o semilla de planta o que está contenido en la planta, parte de planta o producto de semilla procesada comprende una sustancia sólida y *Methylobacterium* asociadas o adherentes que se pueden identificar fácilmente por comparación de una planta, parte de planta, semilla de planta o producto procesado de los mismos tratado con uno sin tratar.

Los caldos de fermentación, los productos de caldos de fermentación, los productos de fermentación, u otras composiciones que comprenden sustancias sólidas con *Methylobacterium* adherentes se pueden usar para producir productos industriales o proteínas recombinantes o en biorremediación.

Las composiciones útiles para tratar plantas o partes de plantas que comprenden la sustancia sólida con *Methylobacterium* adherentes también pueden comprender un coadyuvante agrícolamente aceptable o un excipiente agrícolamente aceptable. Un coadyuvante agrícolamente aceptable o un excipiente agrícolamente aceptable típicamente es un ingrediente que no causa fitotoxicidad u otros efectos adversos indebidos cuando se expone a una planta o parte de planta. En determinadas formas de realización, la sustancia sólida puede ser por sí misma un coadyuvante agrícolamente aceptable o un excipiente agrícolamente aceptable siempre y cuando no sea bactericida o bacteriostático para *Methylobacterium*. En otras formas de realización, la composición comprende además al menos uno de un coadyuvante agrícolamente aceptable o un excipiente agrícolamente aceptable. Cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente también puede comprender además un plaguicida. Los plaguicidas que se usan en la composición incluyen, pero sin limitación, un insecticida, un fungicida, un nematocida y un bactericida. En determinadas formas de realización, el plaguicida que se usa en la composición es un plaguicida que no inhibe sustancialmente el crecimiento de las *Methylobacterium*. Como las *Methylobacterium* son bacterias gram negativas, los bactericidas adecuados para su uso en las composiciones pueden incluir, pero sin limitación, bactericidas que inhiben la actividad contra bacterias gram positivas pero no bacterias gram negativas. Las composiciones que se proporcionan en el presente documento también pueden comprender un agente bacteriostático que no inhiba sustancialmente el crecimiento de las *Methylobacterium*. Los agentes bacteriostáticos adecuados para su uso en las composiciones que se proporcionan en el presente documento incluyen, pero sin limitación, aquellos que muestran actividad contra bacterias gram positivas pero no contra bacterias gram negativas. Cualquiera de las composiciones que se han mencionado anteriormente también puede ser un producto esencialmente seco (es decir que tiene aproximadamente el 5% o menos de contenido de agua), una mezcla de la composición con una emulsión o una suspensión.

Los coadyuvantes agrícolamente aceptables que se usan en las composiciones incluyen, pero sin limitación, componentes que aumentan la eficacia del producto y/o productos que aumentan la facilidad de la aplicación del producto. Los coadyuvantes que aumentan la eficacia del producto pueden incluir diversos humectantes/dispersantes que promueven la adhesión y la dispersión de la composición sobre las partes de plantas, adhesivos que promueven la adhesión a la parte de planta, penetrantes que pueden promover el contacto del agente activo con tejidos internos, diluyentes que incrementan la semivida del agente activo mediante inhibición de la degradación ambiental y humectantes que incrementan la densidad o el tiempo de secado de las composiciones dispersadas. Los humectantes/dispersantes que se usan en las composiciones pueden incluir, pero sin limitación, tensioactivos no iónicos, tensioactivos aniónicos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos anfotéricos, tensioactivos de organosilicatos y/o tensioactivos acidificados. Los adhesivos que se usan en las composiciones pueden incluir, pero sin limitación, sustancias a base de látex, terpeno/pinoleno y sustancias a base de pirrolidona. Los penetrantes pueden incluir aceite mineral, aceite vegetal, aceite vegetal esterificado, tensioactivos de organosilicatos y tensioactivos acidificados. Los diluyentes que se usan en las composiciones pueden incluir, pero sin limitación, sulfato de amonio o sustancias a base de menteno. Los humectantes que se usan en las composiciones pueden incluir, pero sin limitación, glicerol, propilenglicol, y dietilglicol. Los coadyuvantes que mejoran la facilidad de aplicación del producto incluyen, pero sin limitación, agentes acidificantes/tamponadores, agentes antiespumantes/desespumantes, agentes de compatibilidad, agentes reductores de desviación, colorantes y acondicionadores de agua. Los agentes antiespumantes/desespumantes que se usan en las composiciones pueden incluir, pero sin limitación, dimetopolisiloxano. Los agentes de compatibilidad que se usan en las composiciones pueden incluir, pero sin limitación, sulfato de amonio. Los agentes reductores de desviación que se usan en las composiciones pueden incluir, pero sin limitación, poliácridamidas, y polisacáridos. Los acondicionadores de agua que se usan en las composiciones pueden incluir, pero sin limitación, sulfato de amonio.

También se proporcionan en el presente documento procedimientos para tratar plantas y/o partes de plantas con los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación y composiciones. Las plantas tratadas, y las partes de plantas tratadas que se obtienen de los mismos, incluyen, pero sin limitación, maíz, *Brassica sp.* (por ejemplo, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), alfalfa, arroz, centeno, sorgo, mijo (por ejemplo, mijo perlado (*Pennisetum glaucum*), mijo proso (*Panicum miliaceum*), mijo cola de zorro (*Setaria italica*), mijo africano (*Eleusine coracana*), girasol, cáñamo, soja, tabaco, patata, cacahuetes, algodón, batata (*Ipomoea batatas*), mandioca, café, coco, piña, árboles cítricos, cacao, té, plátano, aguacate, higo, guayaba, mango, olivo, papaya, anacardo, macadamia, almendra, remolachas azucareras, caña de azúcar, avena, cebada, tomates, lechuga, alubia verdes, alubia pallar, guisantes, cucurbitáceas tales como pepino, melón cantalupo y melón almizclero, plantas ornamentales y coníferas. Las partes de plantas que se tratan incluyen, pero sin limitación, hojas, tallos, flores, raíces, semillas, frutos, tubérculos, coleóptilos, y similares. Las plantas y partes de plantas ornamentales que se pueden tratar incluyen, pero sin limitación, azalea, hortensia, hibisco, rosas, tulipanes, narcisos, petunias, claveles, flor de Pascua y crisantemo. Las plantas y partes de plantas de coníferas que se pueden tratar incluyen, pero sin limitación, pinos tales como pino taeda, pino ellioti, pino ponderosa, pino contorta y pino de Monterrey; abeto Douglas; tsuga heterófila; píceas de Sitka; secoya; abetos verdaderos tales como abeto de plata y abeto balsámico; y cedros tales como cedro rojo occidental y cedro amarillo de Alaska. Las plantas y partes de plantas de césped y que se pueden tratar incluyen, pero sin limitación, hierba azul anual, raigrás anual, *Poa Compressa*, festuca, agrostis, pasto de trigo, pasto azul de Kentucky, pasto ovillo, raigrás, *Agrostis gigantea*, hierba Bermuda, hierba de S. Agustín y hierba Zoysia. Las semillas u otros propágulos de cualquiera de las plantas que se mencionaron previamente se pueden tratar con los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación, y/o las composiciones que se proporcionan en el presente documento.

En determinadas formas de realización, las plantas y/o partes de plantas se tratan mediante aplicación de los caldos

de fermentación, productos de caldos de fermentación, productos de fermentación y composiciones como una pulverización. Dichas aplicaciones de pulverización incluyen, pero sin limitación, tratamientos de una sola parte de la planta o cualquier combinación de partes de plantas. La pulverización se puede conseguir con cualquier dispositivo que distribuya los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación, productos de fermentación y composiciones en la planta y/o parte(s) de la planta. Los dispositivos de pulverización útiles incluyen un pulverizador en cañón, un pulverizador de mano o mochila, pulverizadores de polvo para cultivos (es decir pulverización aéreo) y similares. También se pueden usar dispositivos de pulverización y/o procedimientos que proporcionan la aplicación de los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación, productos de fermentación y composiciones en una, o ambas, de la superficie adaxial y/o la superficie abaxial. También se proporcionan en el presente documento plantas y/o partes de plantas que están al menos parcialmente recubiertas con cualquiera de un caldo de fermentación bifásico, un producto de caldo de fermentación, producto de fermentación o composiciones que comprenden una sustancia sólida con *Methylobacterium* adheridos a la misma. También se proporcionan en el presente documento productos vegetales procesados que comprenden una sustancia sólida con *Methylobacterium* adheridos a la misma.

En determinadas formas de realización, las semillas se tratan por exposición de las semillas a los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación, productos de fermentación y composiciones que se proporcionan en el presente documento. Las semillas se pueden tratar con los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación y composiciones que se proporcionan en el presente documento mediante procedimientos que incluyen, pero sin limitación, imbibición, recubrimiento, pulverización y similares. Los tratamientos para semillas se pueden efectuar tanto con agentes de tratamiento de semillas continuos y/o en lote. En determinadas formas de realización, las semillas recubiertas se pueden preparar produciendo lechadas de semillas con una composición de recubrimiento que contiene un caldo de fermentación, producto del caldo de fermentación o composiciones que se proporcionan que comprenden la sustancia sólida con *Methylobacterium* y secando al aire el producto resultante. El secado al aire se puede llevar a cabo a cualquier temperatura que no sea perjudicial para la semilla o las *Methylobacterium*, pero típicamente no será superior a 30 grados centígrados. La proporción del recubrimiento que comprende una sustancia sólida y las *Methylobacterium* incluye, pero sin limitación, un intervalo de entre el 0,1 y el 25% en peso de semilla, entre el 0,5 y el 5% en peso de semilla, y entre el 0,5 y el 2,5% en peso de semilla. En determinadas formas de realización, una sustancia sólida que se usa en el recubrimiento o tratamiento de semillas tendrá *Methylobacterium* adheridos a la misma. En determinadas formas de realización, una sustancia sólida que se usa en el recubrimiento o tratamiento para semillas estará asociada con *Methylobacterium* y será un caldo de fermentación, producto del caldo de fermentación o composición obtenida por los procedimientos que se proporcionan en el presente documento. Las diferentes composiciones y procedimientos para el tratamiento de semillas se divulgan en las patentes de los EE.UU. N°: 5.106.648, 5.512.069 y 8.181.388, que se incorporan al presente documento a modo de referencia en su totalidad, y se pueden adaptar para su uso con un agente activo que comprende los caldos de fermentación, los productos de caldos de fermentación o las composiciones que se proporcionan en el presente documento. En determinadas formas de realización, la composición que se usa para tratar la semilla puede contener excipientes agrícolamente aceptables que incluyen, pero sin limitación, serrín, arcillas, carbono activado, tierra de diatomeas, sólidos inorgánicos de grano fino, carbonato de calcio y similares. Las arcillas y sólidos inorgánicos que se pueden usar con los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación o las composiciones que se proporcionan en el presente documento incluyen, pero sin limitación, bentonita de calcio, caolín, arcilla china, talco, perlita, mica, vermiculita, sílices, polvo de cuarzo, montmorillonita y mezclas de los mismos. Los coadyuvantes agrícolamente aceptables que promueven la adhesión a la semillas que se pueden usar incluyen, pero sin limitación, poli(acetatos de vinilo), copolímeros de poli(acetato de vinilo), poli(acetatos de vinilo) hidrolizados, copolímero de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo, poli(alcoholes vinílicos), copolímeros de poli(alcohol vinílico), polivinil-metil-éter, copolímero de polivinil-metil-éter- anhídrido maleico, ceras, polímeros de látex, celulosas, que incluyen etilcelulosas y metilcelulosas, hidroximetilcelulosas, hidroxipropilcelulosa, hidroximetilpropilcelulosas, polivinilpirrolidonas, alginatos, dextrinas, malto-dextrinas, polisacáridos, grasas, aceites, proteínas, goma karaya, goma guar, goma tragacanto, gomas de polisacárido, mucílago, goma arábica, goma laca, polímeros y copolímeros de cloruro de vinilideno, polímeros y copolímeros de proteína a base de soja, lignosulfonatos, copolímeros acrílicos, almidones, poli(acrilatos de vinilo), zeínas, gelatina, carboximetilcelulosa, quitosano, poli(óxido de etileno), polímeros y copolímeros de acrilimida, poli(acrilato de hidroxietilo), monómeros de metilacrilimida, alginato, etilcelulosa, policloropreno y jarabes o mezclas de los mismos. Otros coadyuvantes agrícolamente aceptables útiles que pueden promover el recubrimiento incluyen, pero sin limitación, polímeros y copolímeros de acetato de vinilo, copolímero de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo y ceras solubles en agua. Los diversos tensioactivos, dispersantes, agentes antiaglomeración, agentes para control de espuma y colorantes que se divulgan en el presente documento y en la patente de los EE.UU. N°: 8.181.388 se pueden adaptar para su uso con un agente activo que comprende los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación o las composiciones que se proporcionan en el presente documento.

También se proporciona en el presente documento el uso de los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación y composiciones que se proporcionan en el presente documento para promover la formación de raíz nodal en plantas de cereal. El desarrollo temprano de un sistema de raíz nodal vigoroso es importante en el establecimiento de instalaciones de cultivos de plantas de cereal que incluyen, pero sin limitación, maíz, cebada, mijo, avena, arroz, centeno, sorgo, triticale y trigo. Las raíces primarias que emergen de una semilla de planta de cereal (la radícula y las raíces seminales) actúan principalmente captando agua del suelo. La radícula y raíces seminales no proporcionan otra nutrición, que se proporciona de forma temprana en el crecimiento de la plántula por las reservas de energía y nutrientes del grano. Cuando las raíces nodales emergen del tallo de la planta de cereal, el

crecimiento de las raíces seminales disminuye drásticamente y las mismas contribuyen poco al mantenimiento a largo plazo de la planta de cereal. En su lugar, tiene su papel el sistema de raíces nodales. Por consiguiente, el establecimiento temprano y vigoroso de un sistema de raíces nodales tiene un papel clave en el desarrollo de una instalación uniforme de un cultivo de plantas de cereal. Un fallo en este proceso da como resultado plantas atrofiadas y otras deficiencias que terminan reduciendo los rendimientos en la recolección.

En el presente documento se proporcionan caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación, y composiciones que incrementan el crecimiento de raíz nodal en plantas de cereal en relación a plantas de cereal no tratadas que no se han expuesto a los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación y composiciones. En determinadas formas de realización, se pueden tratar partes de plantas de cereal, que incluyen, pero sin limitación, una semilla, una hoja o un coleóptilo con los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación y composiciones para incrementar el crecimiento de raíz nodal de la planta de cereal. Los tratamientos o aplicaciones pueden incluir, pero sin limitación, pulverización, recubrimiento, recubrimiento parcial, inmersión y/o embebido de la planta de cereal o partes de plantas de cereal con los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación y composiciones que se proporcionan en el presente documento. En determinadas formas de realización, las semillas se pueden sumergir y/o se pueden embeber en un caldo de fermentación, un producto de caldo de fermentación que se ha resuspendido completamente o parcialmente en un líquido, o un líquido, semilíquido o lechada de una composición proporcionada en el presente documento. Dicha inmersión o imbibición de semillas puede ser suficiente para proporcionar un incremento de crecimiento de raíz nodal en una planta de cereal en comparación con el crecimiento de raíz nodal en una planta de cereal control o no tratada. Dichos incrementos de crecimiento de raíz nodal incluyen incrementos en la cantidad, la longitud, el peso seco y/o el peso húmedo de las raíces nodales en plantas de cereal tratadas con respecto a plantas de cereal no tratadas. En determinadas formas de realización, las semillas de plantas de cereal se pueden sumergir y/o embeber durante al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. Dicha inmersión y/o imbibición se puede llevar a cabo, en determinadas formas de realización, a temperaturas que no son perjudiciales para la semilla de planta de cereal o para las *Methylobacterium*. En determinadas formas de realización, las semillas se pueden tratar a entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 grados centígrados o a entre aproximadamente 20 y aproximadamente 25 grados centígrados. En determinadas formas de realización, la imbibición y/o inmersión de semillas se puede llevar a cabo con agitación suave.

Las cantidades de los caldos de fermentación, productos de caldos de fermentación, y composiciones suficientes para proporcionar un incremento del crecimiento de raíz nodal en una planta de cereal, por consiguiente, se pueden determinar midiendo cualquiera o todos de un incremento en la cantidad, la longitud, el peso seco y/o el peso húmedo de las raíces nodales en plantas de cereal tratadas con respecto a plantas de cereal no tratadas. En determinadas formas de realización, una cantidad de un caldo de fermentación provisto en el presente documento que es suficiente para proporcionar un incremento del crecimiento de raíz nodal en una planta de cereal puede ser un caldo de fermentación con *Methylobacterium* a un título de al menos aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente 1×10^9 unidades formadoras de colonias por mililitro, al menos aproximadamente 1×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro o al menos aproximadamente 3×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro. En determinadas formas de realización, una cantidad de un caldo de fermentación proporcionado en el presente documento que es suficiente para proporcionar un incremento del crecimiento de raíz nodal en una planta de cereal puede ser un caldo de fermentación con *Methylobacterium* a un título de entre aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro y al menos aproximadamente 6×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro. En determinadas formas de realización, una cantidad de un producto de caldo de fermentación proporcionado en el presente documento que es suficiente para proporcionar un incremento del crecimiento de raíz nodal en una planta de cereal puede ser un producto de caldo de fermentación con un título de *Methylobacterium* de la fase sólida de ese producto entre al menos aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por gramo y al menos aproximadamente 6×10^{10} unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo de la fase sólida. En determinadas formas de realización, una cantidad de una composición provista en el presente documento que es suficiente para proporcionar un incremento del crecimiento de raíz nodal en una planta de cereal puede ser una composición con un título de *Methylobacterium* de entre al menos aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por gramo y al menos aproximadamente 6×10^{10} unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo de partículas en la composición que contiene las partículas que comprenden una sustancia sólida en la que está adherido un monocultivo o cocultivo de *Methylobacterium*.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar elementos preferidos que pueden aplicarse para llevar a cabo la invención. Aquellos con experiencia en la técnica apreciarán que las técnicas divulgadas en los ejemplos siguientes representan técnicas descubiertas por los solicitantes para que funcionen bien en la puesta en práctica de la invención.

Ejemplo 1. Crecimiento de bacterias PPFM en medio de placa de agar sólido.

Para el crecimiento de bacterias PPFM sobre medio de placa de agar sólido, se analizaron una diversidad de medios estándar.

ES 2 700 936 T3

Un medio usado fue medio con sales minerales de amonio (AMS) (Whittenbury et al., 1970). El medio AMS contiene, por litro, 700 miligramos de fosfato de potasio dibásico anhidro, 540 miligramos de fosfato de potasio monobásico anhidro, un gramo de sulfato de magnesio heptahidratado, 500 miligramos de cloruro de amonio anhidro, 200 miligramos de cloruro de calcio deshidratado, 4 miligramos de sulfato férrico heptahidratado, 100 microgramos de sulfato de cinc heptahidratado, 30 microgramos de cloruro de manganeso tetrahidratado, 300 microgramos de ácido bórico anhidro, 200 microgramos de cloruro de cobalto hexahidratado, 10 microgramos de cloruro de cobre deshidratado, 20 microgramos de cloruro de níquel hexahidratado y 60 microgramos de molibdato de sodio deshidratado.

El medio AMS se preparó a partir de cuatro soluciones madre, que se enumeran a continuación.

Solución madre I: para un litro de concentración 50X

Fosfato de potasio dibásico, anhidro 35 gramos

Fosfato de potasio monobásico, anhidro 27 gramos

Solución madre II: para un litro de concentración 50X

Sulfato de magnesio heptahidratado 50 gramos

Cloruro de amonio, anhidro 25 gramos

Solución madre III: para un litro de concentración 50X

Cloruro de calcio dihidratado 10 gramos

Solución madre de metales traza: para un litro de concentración 1000X

Sulfato férrico heptahidratado 4 gramos

Sulfato de cinc heptahidratado 100 miligramos

Cloruro de manganeso tetrahidratado 30 miligramos

Ácido bórico, anhidro 300 miligramos

Cloruro de cobalto hexahidratado 200 miligramos

Cloruro de cobre dihidratado 10 miligramos

Cloruro de níquel hexahidratado 20 miligramos

Molibdato de sodio dihidratado 60 miligramos

Las soluciones madre I, II, y III se esterilizaron en autoclave por separado. La solución madre de metales traza no se pudo esterilizar en autoclave, dado que la mayor parte de las sales precipitan durante la etapa de esterilización en autoclave, y por lo tanto se esterilizó por filtrado por medio de un aparato de filtro de 0,2 micrómetros. Estas etapas fueron necesarias para asegurar la preparación de un medio de cultivo AMS transparente con todos los ingredientes en solución. Según lo descrito originariamente por Whittenbury et al. (1970), los componentes que contienen fosfato del medio AMS se segregaron de los otros componentes hasta las etapas finales de terminación de la preparación del medio, previniendo la formación de fosfato de magnesio insoluble y cristales de fosfato de calcio.

Para preparar un litro de medio de placa de agar sólido con base AMS, se añadieron 15 gramos de agar a 940 ml de agua destilada, y esta mezcla se esterilizó en autoclave. Después de la esterilización en autoclave, se añadieron 20 ml de cada una de las soluciones madre I, II, y III, junto con un ml de solución madre de metales traza esterilizada por filtración.

Si se iban a incorporar otros componentes del medio, tales como una fuente de carbono, la mayor parte de estos se añadieron al agua y la mezcla de agar antes de la esterilización en autoclave. La única excepción fue el metanol, que se esterilizó por filtración por medio de un aparato de filtro de 0,2 micrómetros y se añadió después de que el medio base se hubiera esterilizado en autoclave.

Un segundo medio usado fue el medio de cultivo mínimo de Vogel-Bonner (VB) (Vogel y Bonner, 1956). El medio VB contiene, por litro, 298 miligramos de sulfato de magnesio heptahidratado, 14,93 gramos de fosfato de potasio dibásico anhidro, 5,22 gramos de fosfato de sodio y amonio tetrahidratado y 2,73 gramos de ácido cítrico anhidro (la forma de ácido libre).

El medio mínimo de Vogel-Bonner se preparó a partir de una solución madre 25X de las sales y ácido cítrico. Esta solución madre 25X se preparó disolviendo en un litro de agua destilada las siguientes cantidades de cada ingrediente, en el orden listado, y asegurándose que cada uno se hubiese disuelto completamente antes de añadir el siguiente: 7,46 gramos de sulfato de magnesio heptahidratado, 68,23 gramos de ácido cítrico anhidro, 373,13

gramos de fosfato de potasio dibásico anhidro y 130,60 gramos de fosfato de sodio y amonio tetrahidratado. Disolviendo primero el sulfato de magnesio y luego agregando el ácido cítrico, los iones magnesio se quelaron por los iones citrato, previniendo la formación de cristales de fosfato de magnesio insolubles cuando se añadan las sales de fosfato. Esto aseguró la preparación de un medio de cultivo transparente con todos los ingredientes en solución.

Para preparar un litro de medio de placa de agar sólido con una base de VB, se añadieron 15 gramos de agar a 960 ml de agua destilada y esta mezcla se esterilizó en autoclave. Después de la esterilización en autoclave, se añadieron 40 ml de la solución madre 25X de sales VB.

Si se iban a incorporar otros componentes del medio, tal como una fuente de carbono, la mayor parte de estos se añadió al agua y la mezcla de agar antes de la esterilización en autoclave. La única excepción fue el metanol, que se esterilizó por filtración por medio de un aparato de filtro de 0,2 micrómetros y se añadió después de que el medio base se hubo esterilizado en autoclave.

Un tercer medio usado fue el caldo LB. El caldo LB contiene, por litro, 10 gramos de triptona, 5 gramos de extracto de levaduras y 10 gramos de cloruro de sodio. Todos los componentes se disolvieron en un litro de agua destilada y se esterizaron en autoclave. Este medio era transparente, con todos los ingredientes en solución.

Para preparar un litro de medio de placa de agar sólido con base LB, se añadieron 15 gramos de agar a un litro de caldo LB, y esta mezcla se esterilizó en autoclave.

Corpe y Basile (1982) realizaron un estudio esquemático del crecimiento de diferentes cepas de bacterias PPFM en medio AMS que contenía diferentes fuentes de carbono. Muchas de las sustancias analizadas sustentaron poco o nada de crecimiento de las bacterias PPFM. Corpe y Basile informaron que el glicerol y el glutamato fueron fuentes de carbono relativamente buenas para las bacterias PPFM, y que el metanol, la glucosa, el aspartato, el succinato y el malato fueron intermedios como fuentes de carbono para las bacterias PPFM.

Los solicitantes midieron el crecimiento de *Methylobacterium extorquens* en placas con LB, así como en placas con AMS y VB suplementadas con diferentes fuentes de carbono. Las fuentes de carbono, enumeradas a continuación, se añadieron todas al medio de sales de base AMS o VB a 10 gramos por litro. Además, se analizaron algunas composiciones de medio que incluyeron peptona a 10 gramos por litro. La *Methylobacterium extorquens* se estró en diferentes placas de agar, que después se incubaron a 30 grados centígrados durante dos semanas. El crecimiento se midió como el número de días de incubación requeridos para que las colonias se vuelvan de tamaño completo (aproximadamente 2 milímetros de diámetro); para aquellas condiciones de cultivo en las que no se formaron las colonias de tamaño completo incluso después de una incubación prolongada, las colonias se clasificaron como de tamaño medio (aproximadamente 1 milímetros de diámetro) o de tamaño pequeño (aproximadamente 0,5 milímetros o menos de diámetro). Todas las colonias observadas fueron de un color rosa intenso saturado, tal como es característico de las bacterias PPFM. Los resultados fueron los siguientes:

VB más aspartato	tamaño pequeño en 9 días
VB más succinato	tamaño pequeño en 10 días
VB más malato	tamaño pequeño en 10 días
LB	tamaño completo en 9 días
AMS más glucosa	tamaño completo en 9 días
VB más glucosa	tamaño completo en 14 días
AMS más metanol	tamaño completo en 6 días
VB más metanol	tamaño medio en 10 días
AMS más glutamato y peptona	tamaño completo en 5 días
AMS más glicerol y peptona	tamaño completo en 5 días
VB más glicerol y peptona	tamaño completo en 6 días

El crecimiento más rápido y más abundante de la bacteria PPFM *Methylobacterium extorquens* en el medio de placa de agar sólido analizado fue en AMS más glicerol y peptona o AMS más glutamato y peptona, seguido de cerca por AMS más metanol o VB más glicerol y peptona. El crecimiento en los otros medios analizados fue significativamente más lento.

Ejemplo 2. Crecimiento de bacterias PPFM en medio líquido transparente, monofásico.

Para aquellos cuatro medios de placa de agar sólido que se encontró en el ejemplo 1 que sustentaron el crecimiento

más rápido y más abundante de la bacteria PPFM *Methylobacterium extorquens*, se prepararon las correspondientes versiones líquidas (es decir, sin adición de agar) y se analizaron. Estos cuatro medios líquidos, preparados tal como se describe en el ejemplo 1 (siendo la única excepción que no contenían ningún tipo de agar) eran todos líquidos transparentes, con todos los ingredientes en solución.

Se añadió un inóculo de la bacteria PPFM *Methylobacterium extorquens* a matraces que contenían 100 mililitros de estos cuatro medios líquidos, para dar un título inicial de aproximadamente 1×10^5 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. Los matraces se colocaron en un equipo incubador con agitación rotatoria y se cultivaron durante 5 días a 30 grados centígrados y 250 rpm. Al final de los 5 días de incubación, se determinaron los títulos de bacterias PPFM en los matraces. Los resultados fueron:

<u>medio líquido</u>	título inicial de PPFM	título de PPFM después de 5 días
AMS más glicerol y peptona	$1,4 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$
AMS más glutamato y peptona	$2,0 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$
AMS más metanol	$1,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
VB más glicerol y peptona	$1,7 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$

Un aspecto notable de estos resultados es el crecimiento muy deficiente de las bacterias PPFM en todos estos medios líquidos transparentes, en presencia de exactamente los mismos nutrientes que los presentes en las formas de placa con agar sólido de estos medios en los que las bacterias PPFM crecieron fácilmente y abundantemente (tal como se describe en el ejemplo 1). De hecho, en todos estos matraces, hubo poca o ninguna turbidez visible (el clásico indicador de crecimiento microbiano) y ninguna sugerencia de tonalidad rosa alguna.

Ejemplo 3. Crecimiento de bacterias PPFM en un medio de cultivo bifásico que contiene cristales insolubles de sal.

Para la preparación del medio de cultivo bifásico, el medio AMS líquido más glicerol y peptona se hizo turbio (es decir, se proveyó de una sustancia sólida) formando deliberadamente cristales insolubles de fosfato de magnesio y/o fosfato de calcio. Para formar deliberadamente cristales insolubles en el medio, el procedimiento de preparación descrito en el ejemplo 1 se modificó tal como sigue. Todos los componentes excepto la solución madre de metales traza se mezclaron antes de esterilizarlos en autoclave. Es decir, se añadieron 20 ml de cada una de las soluciones madre I, II y III a 940 ml de agua destilada, junto con 10 gramos de glicerol y 10 gramos de peptona. Después de la esterilización en autoclave, el medio se completó mediante la adición de un ml de solución madre de metales traza esterilizada por filtración. La esterilización en autoclave de los componentes de las soluciones madre I, II y III, mezcladas entre sí antes de la esterilización en autoclave dio como resultado la formación de cristales insolubles de sal, presumiblemente fosfato de magnesio dibásico y/o fosfato de calcio dibásico principalmente. Después de la esterilización en autoclave, el medio AMS más glicerol y peptona producido mediante este procedimiento de preparación generó un medio líquido que fue muy turbio con estos cristales de sal. Este nuevo medio líquido se designó "AMS turbio más glicerol y peptona".

A un matraz que contenía 100 mililitros del AMS turbio más glicerol y peptona, se añadió un inóculo de la bacteria PPFM *Methylobacterium extorquens* para dar un título inicial de aproximadamente 1×10^5 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. El matraz se colocó en un equipo incubador con agitación rotatoria y se cultivó durante 3 días a 30 grados centígrados y 250 rpm. Después de exactamente dos días, el matraz había desarrollado una turbidez rosada intensa, saturada, lo que indica un crecimiento rápido y abundante de las bacterias PPFM. A los 2 días y 3 días después de la inoculación, se determinaron los títulos de las bacterias PPFM en el matraz. Los resultados fueron:

<u>medio líquido</u>	título inicial de PPFM	título de PPFM después de 2 días	título de PPFM después de 3 días
AMS turbio más glicerol y peptona	$1,7 \times 10^5$	$1,3 \times 10^8$	$1,7 \times 10^9$

Dos aspectos notables de este resultado fueron el crecimiento muy rápido de las bacterias PPFM, y su crecimiento a títulos cercanos a 10.000 veces mayores que los alcanzados en medio líquido AMS transparente más glicerol y peptona (como se muestra en el ejemplo 2).

Ejemplo 4. Crecimiento de bacterias PPFM en medio líquido que contiene agar.

Para la preparación de medio de placa de agar sólido, el agar se añade típicamente a aproximadamente 15 gramos por litro de medio. Para analizar si cantidades menores de agar, a niveles demasiado bajos para gelificar o

solidificar el medio, podrían ser eficaces para promover el crecimiento rápido y abundante de bacterias PPFM, se añadieron pequeñas cantidades de agar a medio líquido AMS más glicerol y peptona. Este medio líquido se preparó tal como se describe en el ejemplo 1, es decir, mediante el procedimiento de preparación diseñado para prevenir la formación de cristales insolubles de sal de fosfato de magnesio y fosfato de calcio. El agar, tal como se describe en el ejemplo 1, se añadió al agua antes de esterilizar en autoclave. Las cantidades de agar analizadas fueron, por litro, 750 miligramos, 1,5 gramos y 3 gramos. Estos nuevos medios líquidos se designaron "AMS más glicerol y peptona y agar".

Se añadió un inóculo de la bacteria PPFM *Methylobacterium extorquens* a matraces que contenían 100 mililitros de AMS más glicerol y peptona y agar, para dar un título inicial de aproximadamente 1×10^5 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. Los matraces se dispusieron en un equipo incubador con agitación rotatoria y se cultivaron durante 3 días a 30 grados centígrados y 250 rpm. Después de justo dos días, todos los matraces habían desarrollado una turbidez rosa intensa, saturada, lo que indica un crecimiento rápido y abundante de bacterias PPFM. A los 2 días y 3 días tras la inoculación, se determinaron los títulos de bacterias PPFM en los matraces. Los resultados fueron:

medio líquido	título inicial de PPFM	título de PPFM después de 2 días	título de PPFM después de 3 días
AMS más glicerol y peptona y 750 mg de agar	$1,3 \times 10^5$	$6,4 \times 10^7$	$8,0 \times 10^7$
AMS más glicerol y peptona y 1,5 g de agar	$1,3 \times 10^5$	$3,1 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$
AMS más glicerol y peptona y 3 g de agar	$1,2 \times 10^5$	$1,8 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$

Dos aspectos notables de este resultado son el crecimiento muy rápido de las bacterias PPFM, y su crecimiento hasta títulos cercanos a 1000 veces mayores que los alcanzados en medio líquido transparente AMS más glicerol y peptona (como se muestra en ejemplo 2). Los datos adquiridos después de 3 días de crecimiento también indican que cantidades aumentadas de crecimiento se correlacionan con cantidades aumentadas de agar.

Ejemplo 5. Crecimiento de bacterias PPFM en medio líquido que contiene tierra de diatomeas.

Para analizar si la tierra de diatomeas era eficaz para promover el crecimiento rápido y abundante de bacterias PPFM, se añadieron pequeñas cantidades de tierra de diatomeas a medio líquido AMS más glicerol y peptona. Este medio líquido se preparó tal como se describe en el ejemplo 1, es decir, mediante el procedimiento de preparación diseñado para prevenir la formación de cristales insolubles de sal de fosfato de magnesio y fosfato de calcio. La tierra de diatomeas se añadió al agua antes de esterilizar en autoclave. Las cantidades de diatomeas analizadas fueron, por litro, 500 miligramos, 1 gramo, 1,5 gramos y 2 gramos. Estos nuevos medios líquidos se designaron "AMS más glicerol y peptona y tierra de diatomeas".

Se añadió un inóculo de bacteria PPFM *Methylobacterium extorquens* a matraces que contenían 100 mililitros de AMS más glicerol y peptona y tierra de diatomeas, para dar un título inicial de aproximadamente 1×10^5 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. Los matraces se dispusieron en un equipo incubador con agitación rotatoria y se cultivaron durante 3 días a 30 grados centígrados y 250 rpm. Después de justo dos días, todos los matraces habían desarrollado una turbidez rosa intensa, saturada, lo que indica un crecimiento rápido y abundante de bacterias PPFM. A los 2 días y 3 días después de la inoculación, se determinaron los títulos de bacterias PPFM en los matraces. Los resultados fueron:

medio líquido	título inicial de PPFM	título de PPFM después de 2 días	título de PPFM después de 3 días
AMS más glicerol y peptona y 500 mg de tierra de diatomeas	$1,0 \times 10^5$	$1,8 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$
AMS más glicerol y peptona y 1 gramo de tierra de diatomeas	$1,8 \times 10^5$	$3,0 \times 10^8$	$8,4 \times 10^8$
AMS más glicerol y peptona y 1,5 gramos de tierra de diatomeas	$1,4 \times 10^5$	$4,0 \times 10^8$	$1,7 \times 10^9$
AMS más glicerol y peptona y 2 gramos de tierra de diatomeas	$1,7 \times 10^5$	$3,4 \times 10^8$	$2,0 \times 10^9$

Dos aspectos notables de estos resultados son el crecimiento muy rápido de las bacterias PPFM, y su crecimiento hasta títulos cercanos a 10.000 veces mayores que los alcanzados en medio líquido transparente AMS más glicerol y peptona (como se muestra en ejemplo 2). Los datos adquiridos después de 2 días de crecimiento también indican que cantidades aumentadas de crecimiento se correlacionan con cantidades aumentadas de agar dentro de un intervalo entre 0,5 gramos y 1,5 gramos cada 100 ml de cultivo.

Ejemplo 6. Crecimiento de bacterias PPFM en un biorreactor controlado.

El crecimiento de bacterias en matraces, incubados en un agitador rotatorio, está limitado por cambios en el pH provocados por el metabolismo de la(s) fuente(s) de carbono en el medio de crecimiento. Los biorreactores controlados (también conocidos como "fermentadores" o "recipientes de fermentación") superan esta limitación manteniendo el pH en el nivel deseado mediante la adición controlada de ácidos o bases, según sea apropiado. Otro factor que puede limitar el crecimiento de bacterias es la disponibilidad del oxígeno disuelto. Los biorreactores controlados superan esta limitación manteniendo los niveles adecuados de oxígeno disuelto por medio del ajuste controlado del flujo de aire dentro del recipiente del reactor, la velocidad de agitación del recipiente y la presión de aire dentro del recipiente.

Cuando se cultivan en un biorreactor controlado que contiene el medio líquido AMS más glicerol y peptona descrito en el ejemplo 1, suplementado adicionalmente con sustancias sólidas tales como sales insolubles, agar o tierra de diatomeas tal como se describió en los ejemplos 3, 4 y 5, el título final de bacterias PPFM alcanzado será al menos 30 veces mayor que el alcanzado en matraces, específicamente al menos 3×10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro.

Ejemplo 7. Crecimiento de diferentes *Methylobacterium* en presencia y ausencia de diferentes sólidos en el medio

Se obtuvieron diferentes *Methylobacterium* enumerados en la tabla siguiente de las organizaciones depositarias indicadas, se purificaron como aislados de colonias simples, y se cultivaron en presencia y ausencia de sólidos en medio AMS más glicerol más peptona. Los sólidos se esterilizaron mediante esterilización en autoclave en el medio.

Nº. de acceso de depósito	Especie de <i>Methylobacterium</i>
DSM-6343	<i>Methylobacterium extorquens</i>
DSM-1819	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
DSM-13060	<i>Methylobacterium extorquens</i>
DSM-18172	<i>Methylobacterium organophilum</i>
DSM-1708	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>
DSM-18207	<i>Methylobacterium oryzae</i>
DSM-19779	<i>Methylobacterium phyllosphaerae</i>
ATCC-14718	<i>Methylobacterium extorquens</i>
ATCC-14821	<i>Methylobacterium rhodinum</i>
ATCC-21611	<i>Methylobacterium rhodesianum</i>
ATCC-35065	<i>Methylobacterium fujiisawaense</i>
ATCC-43883	<i>Methylobacterium zatmanii</i>
ATCC-51358	<i>Methylobacterium aminovorans</i>
ATCC-700647	<i>Methylobacterium thiocyanatum</i>

ATCC: Colección Americana de cultivo de tejidos tipo, Manassas, VA, EE.UU.

DSM: DSMZ-Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares ("DSMZ"), Braunschweig, Alemania

Todas las *Methylobacterium* de la tabla precedente crecieron de forma muy deficiente o no crecieron en medio transparente AMS más glicerol más peptona, y todas crecieron muy bien en el mismo medio modificado (a 2 gramos por litro) con uno de los siguientes sólidos: tierra de diatomeas, agar, medio turbio (producido con el fin de ser turbio con cristales insolubles de fosfato de magnesio tal como se describe en el ejemplo 3), harina de hueso, harina de semilla de lino, "tierras raras" (una mezcla de arcilla de silicato pirofilitico y leonardita de General Hydroponics de Sebastopol, CA, EE.UU.), "arena de cangrejo ermitaño blanco" (una mezcla de carbonato de calcio y carbonato de magnesio de Laboratorios Zoo-Med, Inc., de San Luis Obispo, CA, EE.UU.), harina de coco secada y pulverizada, y cáscara de huevo molido.

Ejemplo 8. Fotomicroscopia del crecimiento de *Methylobacterium* en presencia de un sólido en el medio.

Se purificaron *Methylobacterium* como aislados de colonias únicas y se cultivaron en presencia de conchas de diatomea en medio de crecimiento líquido. Las conchas de diatomea se esterilizaron mediante esterilización en autoclave en el medio líquido antes de la inoculación del medio así esterilizado con *Methylobacterium*.

Los resultados del análisis fotomicrográfico de los cultivos de la cepa DSM-6343 se muestran en las figuras 1 y 2. En la figura 1, algunas porciones de la concha de diatomea reticulada están expuestas mientras que otras porciones de la concha de diatomeas están oscurecidas por las células adherentes de *Methylobacterium*. La figura 1 también muestra que hay muy pocas células de *Methylobacterium* en este cultivo que no sean adherentes. La figura 2 muestra una concha de diatomeas que está casi completamente recubierta con células adherentes de *Methylobacterium* y unas pocas células aparentemente no adherentes de *Methylobacterium* en el medio líquido.

Ejemplo 9. Composiciones para tratamiento de semillas u hojas de plantas que comprenden sustancias

sólidas con *Methylobacterium* adherentes

Para obtener composiciones adecuadas para el tratamiento de semillas u hojas de plantas, se cultivaron *Methylobacterium* en medio líquido que contiene una sustancia sólida por cualquiera de los procedimientos descritos o reivindicados en el presente documento, o tal como se describen en cualquiera de los ejemplos 3 a 6 anteriores. Típicamente, las *Methylobacterium* se cultivan a un título alto (es decir al menos aproximadamente 5×10^8 unidades formadoras de colonias por gramo de sólido). Después, las *Methylobacterium* DSM-6343 adherentes asociadas con el sólido se recolectan con o sin ninguna *Methylobacterium* no adherente presente en el cultivo. La recolección se puede realizar por filtración, centrifugación, decantación y combinaciones de las mismas. El material recolectado puede aplicarse directamente a semillas o plantas en ciertos casos. En otros casos, el material recolectado se seca por liofilización o se seca por pulverización y similares antes de la aplicación. El material seco también puede reconstituirse con líquidos según sea necesario o deseado antes de la aplicación a plantas o semillas. En ciertos casos, los materiales sólidos con las *Methylobacterium* adherentes pueden disociarse tal como se describe en el presente documento y aplicarse directamente a las semillas o plantas, o se pueden secar en primer lugar y luego aplicarlos a las semillas o plantas. Los materiales sólidos con las *Methylobacterium* adherentes también pueden secarse primero, luego disociarse tal como se describe en el presente documento y aplicarse directamente a las semillas de plantas o utilizarse como ingredientes activos en otras composiciones para el tratamiento de plantas o semillas. También se puede añadir excipientes y/o coadyuvantes adicionales agrícolamente aceptables a cualquiera de los materiales sólidos recolectados y/o disociados con *Methylobacterium* adherentes. Los excipientes añadidos pueden incluir harina de madera, arcillas, carbón activado, tierra de diatomeas, sólidos inorgánicos de grano fino, carbonato de calcio y similares. Las arcillas y sólidos inorgánicos que se pueden añadir como excipientes en las composiciones incluyen bentonita de calcio, caolín, arcilla de China, talco, perlita, mica, vermiculita, sílices, polvo de cuarzo, montmorillonita y mezclas de los mismos. Los coadyuvantes agrícolamente aceptables que promueven la adhesión a las semillas u otras partes de la planta que se pueden añadir a las composiciones incluyen poli(acetatos de vinilo), copolímeros de poli(acetato de vinilo), poli(acetatos de vinilo) hidrolizados, copolímero de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo, poli(alcoholes vinílicos), copolímeros de poli(alcohol vinílico), polivinil-metil-éter, copolímero de polivinil-metil-éter-anhídrido maleico, ceras, polímeros de látex, celulosas que incluyen etilcelulosas y metilcelulosas, hidroximetilcelulosas, hidroxipropilcelulosa, hidroximetilpropilcelulosas, polivinilpirrolidonas, alginatos, dextrinas, maltodextrinas, polisacáridos, grasas, aceites, proteínas, goma de karaya, gama guar, goma tragacanto, gomas de polisacáridos, mucílago, goma arábiga, goma laca, polímeros y copolímeros de cloruro de vinilideno, polímeros y copolímeros de proteínas basadas en soja, lignosulfonatos, copolímeros acrílicos, almidones, poli(acrilatos de vinilo), zeínas, gelatina, carboximetilcelulosa, quitosán, óxido de polietileno, polímeros y copolímeros de acrilimida, acrilato de polihidroxietilo, monómeros de metilacrilimida, alginato, etilcelulosa, policloropreno y jarabes o mezclas de los mismos. Otros coadyuvantes útiles agrícolamente aceptables que pueden promover el recubrimiento de semillas u otras partes de plantas incluyen polímeros y copolímeros de acetato de vinilo, copolímero de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo y ceras solubles en agua. Estas composiciones pueden mantenerse en una forma seca o semiseca o pueden formularse en lechadas mediante la adición de líquidos según se desee. Las composiciones pueden entonces usarse para pulverizar o recubrir las plantas o semillas para obtener efectos beneficiosos asociados con la aplicación de *Methylobacterium* a plantas.

Ejemplo 10. Títulos de diferentes *Methylobacterium* en presencia y ausencia de diferentes sólidos en el medio

Se adquirieron catorce cepas del género *Methylobacterium* en DSMZ (Braunschweig, Alemania) y en ATCC (Manassas, VA, EE.UU.). Estas 14 cepas consisten en 12 especies diferentes, ya que hubo tres *M. extorquens* en el conjunto:

- | | |
|----------------|--|
| 1. DSM-6343 | <i>Methylobacterium extorquens</i> |
| 2. DSM-1819 | <i>Methylobacterium radiotolerans</i> |
| 3. DSM-13060 | <i>Methylobacterium extorquens</i> |
| 4. DSM-18172 | <i>Methylobacterium organophilum</i> |
| 5. DSM-1708 | <i>Methylobacterium mesophilicum</i> |
| 6. DSM-18207 | <i>Methylobacterium oryzae</i> |
| 7. DSM-19779 | <i>Methylobacterium phyllosphaerae</i> |
| 8. ATCC-14718 | <i>Methylobacterium extorquens</i> |
| 9. ATCC-14821 | <i>Methylobacterium rhodinum</i> |
| 10. ATCC-21611 | <i>Methylobacterium rhodesianum</i> |
| 11. ATCC-35065 | <i>Methylobacterium fujisawaense</i> |

12. ATCC-43883 *Methylobacterium zatmanii*
13. ATCC-51358 *Methylobacterium aminovorans*
14. ATCC-700647 *Methylobacterium thiocyanatum*

Para los ensayos posteriores, el inóculo provino de cultivos cultivados en medio transparente AMS-GP. Estos cultivos se cultivaron en 200 ml del medio transparente AMS-GP, se titularon y después se concentraron diez veces. Estos cultivos de PPFM, sin sustratos sólidos presentes, se usaron para inocular tubos de ensayo que contenían 10 ml de medio transparente AMS-GP, o medio AMS-GP con diferentes sustratos sólidos añadidos. Se añadieron 20 mg de los diferentes sustratos sólidos a cada tubo de 10 ml, obteniendo una concentración de sustrato sólido equivalente a 2 gramos por litro. El título inicial objetivo en cada tubo fue aproximadamente 1×10^5 células PPFM por ml. Los tubos de ensayo inoculados se colocaron en un equipo incubador con agitación rotatoria y se hicieron crecer durante tres días a 30 grados C y 250 rpm. Después de tres días de crecimiento, se titularon los cultivos de PPFM.

Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido transparente AMS-GP

			<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días (UFC/ml)</u>
20	DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$3,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$
	DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	$1,8 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$
25	DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	$3,1 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$
	DSM-18172	<i>M. organophilum</i>	$1,4 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$
30	DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	$3,3 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$
	DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	$1,1 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$
	DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$2,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$
35	ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	$2,0 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$
	ATCC-14821	<i>M. rhodinum</i>	$4,4 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$
40	ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	$1,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$
	ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	$1,3 \times 10^5$	$1,9 \times 10^6$
	ATCC-43883	<i>M. zatmanii</i>	$5,0 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$
45	ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	$9,5 \times 10^4$	$1,7 \times 10^5$
	ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	$1,8 \times 10^5$	$7,6 \times 10^4$

Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido turbio AMS-GP

			<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días (UFC/ml)</u>
50	DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$2,5 \times 10^5$	$2,1 \times 10^9$
55	DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	$7,6 \times 10^4$	$6,8 \times 10^8$
	DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	$1,9 \times 10^5$	$4,4 \times 10^8$
60	DSM-18172	<i>M. organophilum</i>	$1,1 \times 10^5$	$1,9 \times 10^9$
	DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	$1,4 \times 10^5$	$9,3 \times 10^8$
	DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	$7,3 \times 10^4$	$2,4 \times 10^8$
65	DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$1,8 \times 10^5$	$7,5 \times 10^8$
	ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	$9,3 \times 10^4$	$2,0 \times 10^9$

ES 2 700 936 T3

	ATCC-14821	<i>M. rhodinum</i>	$7,1 \times 10^4$	$7,2 \times 10^8$
	ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	$3,9 \times 10^5$	$6,8 \times 10^8$
5	ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	$8,2 \times 10^4$	$2,3 \times 10^8$
	ATCC-43883	<i>M. zatmanii</i>	$1,8 \times 10^5$	$6,2 \times 10^8$
	ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	$6,8 \times 10^4$	$1,7 \times 10^9$
10	ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	$4,3 \times 10^5$	$6,5 \times 10^8$

Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido AMS-GP más tierra de diatomeas (a 2 gramos por litro)

15			<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días (UFC/ml)</u>
	DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$2,1 \times 10^5$	$8,7 \times 10^8$
	DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	$1,1 \times 10^5$	$3,3 \times 10^8$
20	DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	$6,8 \times 10^4$	$8,4 \times 10^8$
	DSM-18172	<i>M. organophilum</i>	$3,1 \times 10^5$	$8,1 \times 10^8$
25	DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	$1,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^9$
	DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	$2,1 \times 10^5$	$3,1 \times 10^9$
	DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$9,6 \times 10^4$	$3,6 \times 10^8$
30	ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	$1,8 \times 10^5$	$4,8 \times 10^8$
	ATCC-14821	<i>M. rhodinum</i>	$8,0 \times 10^4$	$5,9 \times 10^8$
35	ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	$3,5 \times 10^5$	$7,7 \times 10^8$
	ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	$1,5 \times 10^5$	$9,2 \times 10^8$
	ATCC-43883	<i>M. zatmanii</i>	$6,5 \times 10^4$	$9,6 \times 10^8$
40	ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	$3,0 \times 10^5$	$2,7 \times 10^9$
	ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	$1,4 \times 10^5$	$2,3 \times 10^9$

45 Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido AMS-GP más quelpo en polvo (a 2 gramos por litro)

			<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días (UFC/ml)</u>
50	DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$3,8 \times 10^5$	$4,3 \times 10^8$
	DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	$9,1 \times 10^4$	$4,1 \times 10^8$
	DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	$4,0 \times 10^5$	$9,7 \times 10^7$
55	DSM-18172	<i>M. organophilum</i>	$2,2 \times 10^5$	$2,8 \times 10^8$
	DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	$1,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^8$
	DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	$9,4 \times 10^4$	$6,4 \times 10^8$
60	DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$7,7 \times 10^4$	$3,8 \times 10^8$
	ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	$3,0 \times 10^5$	$4,7 \times 10^8$
65	ATCC-14821	<i>M. rhodinum</i>	$8,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^8$
	ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	$9,7 \times 10^4$	$4,1 \times 10^8$

ES 2 700 936 T3

	ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	$8,2 \times 10^4$	$3,4 \times 10^8$
	ATCC-43883	<i>M. zatmanii</i>	$9,7 \times 10^4$	$4,0 \times 10^8$
5	ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	$2,6 \times 10^5$	$6,3 \times 10^8$
	ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	$3,5 \times 10^5$	$5,2 \times 10^8$
10	Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido AMS-GP más fibra de cáscara de coco (a 2 gramos por litro)			
			<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días (UFC/ml)</u>
	DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$2,0 \times 10^5$	$3,4 \times 10^8$
15	DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	$2,1 \times 10^5$	$6,0 \times 10^8$
	DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	$8,9 \times 10^4$	$2,5 \times 10^8$
20	DSM-18172	<i>M. organophilum</i>	$8,5 \times 10^4$	$7,5 \times 10^7$
	DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	$6,0 \times 10^4$	$6,0 \times 10^8$
	DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	$1,9 \times 10^5$	$3,2 \times 10^8$
25	DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$9,6 \times 10^4$	$1,2 \times 10^8$
	ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	$2,8 \times 10^5$	$9,7 \times 10^7$
	ATCC-14821	<i>M. rhodinum</i>	$3,5 \times 10^5$	$8,9 \times 10^7$
30	ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	$7,4 \times 10^4$	$8,2 \times 10^7$
	ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	$6,1 \times 10^4$	$7,0 \times 10^7$
35	ATCC-43883	<i>M. zatmanii</i>	$8,0 \times 10^4$	$5,3 \times 10^8$
	ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	$3,3 \times 10^5$	$2,5 \times 10^8$
	ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	$3,3 \times 10^5$	$7,3 \times 10^7$
40	La fibra de cáscara de coco era un producto llamado "Hermit Soil", con el único ingrediente enumerado como "sustrato de fibra de coco" y comercializado por los Laboratorios Zoo-Med, Inc., de San Luis Obispo, CA.			
45	Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido AMS-GP más harina de semilla de algodón (a 2 gramos por litro)			
			<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días (UFC/ml)</u>
50	DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$1,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^8$
	DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	$1,3 \times 10^5$	$5,5 \times 10^8$
	DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	$8,9 \times 10^4$	$4,7 \times 10^8$
55	DSM-18172	<i>M. organophilum</i>	$2,0 \times 10^5$	$8,8 \times 10^7$
	DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	$7,9 \times 10^4$	$5,8 \times 10^8$
	DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	$1,0 \times 10^5$	$2,8 \times 10^8$
60	DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$4,1 \times 10^5$	$9,0 \times 10^7$
	ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	$9,5 \times 10^4$	$7,9 \times 10^7$
65	ATCC-14821	<i>M. rhodinum</i>	$5,4 \times 10^5$	$5,7 \times 10^8$
	ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	$5,1 \times 10^5$	$2,7 \times 10^8$

ES 2 700 936 T3

	ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	$8,1 \times 10^4$	$5,9 \times 10^8$
	ATCC-43883	<i>M. zatmanii</i>	$7,6 \times 10^4$	$3,9 \times 10^8$
5	ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	$2,7 \times 10^5$	$8,3 \times 10^7$
	ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	$4,6 \times 10^5$	$4,4 \times 10^8$

Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido AMS-GP más harina de hueso (a 2 gramos por litro)

10			<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días (UFC/ml)</u>
	DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$9,6 \times 10^4$	$1,4 \times 10^8$
15	DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	$4,7 \times 10^5$	$5,0 \times 10^8$
	DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	$8,5 \times 10^4$	$4,7 \times 10^8$
20	DSM-18172	<i>M. organophilum</i>	$5,9 \times 10^4$	$3,9 \times 10^8$
	DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	$8,2 \times 10^4$	$2,6 \times 10^8$
	DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	$3,6 \times 10^5$	$4,5 \times 10^8$
25	DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$5,4 \times 10^4$	$8,0 \times 10^7$
	ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	$1,5 \times 10^5$	$9,1 \times 10^7$
	ATCC-14821	<i>M. rhodinum</i>	$9,9 \times 10^4$	$7,0 \times 10^7$
30	ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	$1,6 \times 10^5$	$8,1 \times 10^7$
	ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	$6,9 \times 10^4$	$2,0 \times 10^8$
35	ATCC-43883	<i>M. zatmanii</i>	$5,7 \times 10^4$	$6,9 \times 10^7$
	ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	$9,9 \times 10^4$	$4,3 \times 10^8$
40	ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	$1,9 \times 10^5$	$1,5 \times 10^8$

Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido AMS-GP más harina de sangre (a 2 gramos por litro)

			<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días (UFC/ml)</u>
45	DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$7,7 \times 10^4$	$7,0 \times 10^8$
	DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	$7,9 \times 10^4$	$8,8 \times 10^7$
50	DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	$4,4 \times 10^5$	$6,7 \times 10^7$
	DSM-18172	<i>M. organophilum</i>	$3,1 \times 10^5$	$8,4 \times 10^7$
	DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	$1,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^8$
55	DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	$3,9 \times 10^5$	$5,0 \times 10^7$
	DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$2,5 \times 10^5$	$8,0 \times 10^7$
60	ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	$9,5 \times 10^4$	$9,5 \times 10^7$
	ATCC-14821	<i>M. rhodinum</i>	$6,8 \times 10^4$	$8,6 \times 10^7$
	ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	$7,4 \times 10^4$	$4,9 \times 10^7$
65	ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	$2,6 \times 10^5$	$2,0 \times 10^8$
	ATCC-43883	<i>M. zatmanii</i>	$3,2 \times 10^5$	$4,3 \times 10^8$

ES 2 700 936 T3

ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	$7,0 \times 10^4$	$1,8 \times 10^8$
ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	$3,2 \times 10^5$	$5,5 \times 10^7$

5 Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido AMS-GP más arena (a 2 gramos por litro)

			<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días (UFC/ml)</u>
10	DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$1,8 \times 10^5$	$3,2 \times 10^8$
	DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	$1,4 \times 10^5$	$1,9 \times 10^8$
	DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	$1,1 \times 10^5$	$6,0 \times 10^8$
15	DSM-18172	<i>M. organophilum</i>	$2,8 \times 10^5$	$4,8 \times 10^8$
	DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	$7,8 \times 10^4$	$1,6 \times 10^8$
20	DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	$5,2 \times 10^5$	$3,2 \times 10^8$
	DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$2,5 \times 10^5$	$9,7 \times 10^7$
	ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	$9,7 \times 10^4$	$4,4 \times 10^8$
25	ATCC-14821	<i>M. rhodinum</i>	$2,7 \times 10^5$	$9,2 \times 10^7$
	ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	$9,7 \times 10^4$	$6,4 \times 10^8$
30	ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	$5,7 \times 10^4$	$9,1 \times 10^7$
	ATCC-43883	<i>M. zatmanii</i>	$8,2 \times 10^4$	$3,9 \times 10^8$
	ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	$8,8 \times 10^4$	$1,8 \times 10^8$
35	ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	$9,8 \times 10^4$	$6,7 \times 10^8$

La arena era un producto llamado "White Hermit Crac Sand", con los ingredientes enumerados como carbonato de calcio y carbonato de magnesio, y comercializado por Laboratorios Zoo-Med, Inc., de San Luis Obispo, CA.

40 Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido AMS-GP más una arcilla silícea-micácea (a 2 gramos por litro)

			<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días (UFC/ml)</u>
45	DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$9,8 \times 10^4$	$9,4 \times 10^8$
	DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	$2,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^8$
	DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	$5,4 \times 10^5$	$2,8 \times 10^8$
50	DSM-18172	<i>M. organophilum</i>	$2,3 \times 10^5$	$6,0 \times 10^8$
	DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	$8,3 \times 10^4$	$5,5 \times 10^8$
55	DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	$9,7 \times 10^4$	$3,2 \times 10^8$
	DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$6,6 \times 10^4$	$9,8 \times 10^8$
	ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	$1,2 \times 10^5$	$5,5 \times 10^8$
60	ATCC-14821	<i>M. rhodinum</i>	$4,8 \times 10^5$	$6,5 \times 10^8$
	ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	$2,0 \times 10^5$	$5,2 \times 10^8$
65	ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	$6,2 \times 10^4$	$1,0 \times 10^9$
	ATCC-43883	<i>M. zatmanii</i>	$3,1 \times 10^5$	$9,0 \times 10^7$

ES 2 700 936 T3

ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	$4,3 \times 10^5$	$3,2 \times 10^8$
ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	$7,6 \times 10^4$	$8,0 \times 10^8$

- 5 La arcilla micácea fue un producto llamado "Profile", con los ingredientes listados como una mezcla de sílice e illita. La illita es una arcilla micácea. Profile es comercializado por Profile Products, LLC, de Buffalo Grove, IL.

Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido AMS-GP más una arcilla de silicato-mineraloide (a 2 gramos por litro)

			<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días (UFC/ml)</u>
10	DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$3,5 \times 10^4$	$4,0 \times 10^8$
15	DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	$2,5 \times 10^5$	$5,0 \times 10^8$
	DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	$5,2 \times 10^4$	$8,1 \times 10^8$
20	DSM-18172	<i>M. organophilum</i>	$4,3 \times 10^5$	$5,6 \times 10^8$
	DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	$1,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^9$
	DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	$2,2 \times 10^5$	$8,2 \times 10^8$
25	DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$3,6 \times 10^5$	$6,6 \times 10^8$
	ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	$2,4 \times 10^5$	$4,1 \times 10^8$
	ATCC-14821	<i>M. rhodinum</i>	$3,4 \times 10^5$	$1,3 \times 10^9$
30	ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	$3,8 \times 10^5$	$7,0 \times 10^8$
	ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	$5,5 \times 10^4$	$5,4 \times 10^8$
35	ATCC-43883	<i>M. zatmanii</i>	$6,9 \times 10^4$	$3,0 \times 10^8$
	ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	$7,8 \times 10^4$	$1,9 \times 10^9$
40	ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	$4,2 \times 10^5$	$4,8 \times 10^8$

La arcilla mineraloide era un producto llamado "Rare Earth", con los ingredientes enumerados como una mezcla de una arcilla de silicato pirofilitico y leonardita. La leonardita es un mineraloide compuesto por lignita oxidada; tiene alto contenido en ácido húmico. Rare Herat es comercializada por General Hydroponics de Sebastopol, CA

Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido AMS-GP más una arcilla de filosilicato de aluminio (a 2 gramos por litro)

			<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días (UFC/ml)</u>
50	DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$3,5 \times 10^5$	$8,0 \times 10^8$
	DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	$2,5 \times 10^5$	$6,1 \times 10^8$
55	DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	$5,2 \times 10^5$	$5,5 \times 10^8$
	DSM-18172	<i>M. organophilum</i>	$4,3 \times 10^5$	$8,2 \times 10^7$
	DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	$1,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^9$
60	DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	$2,2 \times 10^5$	$9,6 \times 10^8$
	DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$3,6 \times 10^5$	$2,7 \times 10^8$
	ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	$3,0 \times 10^5$	$7,8 \times 10^8$
65	ATCC-14821	<i>M. rhodinum</i>	$3,4 \times 10^5$	$6,5 \times 10^8$
	ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	$2,4 \times 10^5$	$2,8 \times 10^9$

ES 2 700 936 T3

ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	$9,9 \times 10^4$	$2,2 \times 10^9$
ATCC-43883	<i>M. zatmanii</i>	$2,3 \times 10^5$	$7,2 \times 10^8$
ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	$3,8 \times 10^5$	$6,3 \times 10^8$
ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	$8,1 \times 10^4$	$8,8 \times 10^8$

La arcilla de filosilicato de aluminio era un producto llamado "Bentonite", con los ingredientes enumerados como una arcilla de filosilicato de aluminio. Bentonite es comercializado por L.D. Carlson Co. de Kent, OH.

Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido AMS-GP más cáscara de huevo molida (a 2 gramos por litro)

		<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días (UFC/ml)</u>
DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$2,8 \times 10^5$	$2,9 \times 10^9$
DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	$2,1 \times 10^5$	$7,4 \times 10^8$
DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	$3,3 \times 10^5$	$6,4 \times 10^8$
DSM-18172	<i>M. organophilum</i>	$4,5 \times 10^5$	$8,7 \times 10^8$
DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	$4,3 \times 10^5$	$2,5 \times 10^9$
DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	$2,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^8$
DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$3,1 \times 10^5$	$1,7 \times 10^9$
ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	$2,4 \times 10^5$	$3,3 \times 10^9$
ATCC-14821	<i>M. rhodinum</i>	$4,2 \times 10^5$	$7,8 \times 10^8$
ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	$8,4 \times 10^4$	$5,7 \times 10^8$
ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	$1,1 \times 10^5$	$2,8 \times 10^9$
ATCC-43883	<i>M. zatmanii</i>	$3,2 \times 10^5$	$6,9 \times 10^8$
ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	$2,8 \times 10^5$	$6,7 \times 10^8$
ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	$8,9 \times 10^4$	$9,2 \times 10^8$

La cáscara molida se obtuvo de cáscaras de huevos molidas se obtuvo de cáscaras de huevo de gallina.

Se analizaron otros cuatro sustratos con dos cepas de PPFM. Si bien todos estos cuatro sustratos sólidos permitieron que las dos cepas de PPFM crecieran a títulos mayores que en medio transparente AMS-GP, el crecimiento fue relativamente leve en comparación a los otros sustratos sólidos analizados anteriormente en el presente documento. El trigo molido y la cebada molida fueron muy gruesos, lo que puede haber contribuido a su crecimiento relativamente leve debido a la relativamente baja área superficial de un sustrato sólido molido de forma gruesa.

Debido a este crecimiento relativamente leve, estos cuatro sustratos sólidos no se analizaron con las otras cepas de PPFM.

Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido AMS-GP más harina de semillas de lino (a 2 gramos por litro)

		<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días (UFC/ml)</u>
DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$3,4 \times 10^5$	$6,4 \times 10^6$
DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	$9,9 \times 10^4$	$1,2 \times 10^7$

Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido AMS-GP más trigo molido (a 2 gramos por litro)

ES 2 700 936 T3

			<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días (UFC/ml)</u>
	DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$2,1 \times 10^5$	$9,7 \times 10^6$
5	DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	$4,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^7$

Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido AMS-GP más cebada molida (a 2 gramos por litro)

			<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días (UFC/ml)</u>
10	DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$2,2 \times 10^5$	$3,4 \times 10^7$
	DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	$9,2 \times 10^4$	$1,4 \times 10^7$

15 Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido AMS-GP más camarones secos (a 2 gramos por litro)

			<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días (UFC/ml)</u>
20	DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$3,0 \times 10^5$	$7,5 \times 10^6$
	DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	$7,1 \times 10^4$	$3,7 \times 10^7$

Los camarones secos eran camarones de agua salada en polvo, comercializados por OmegaSea Ltd, de Sitka, AK.

25 Ejemplo 11. Títulos de diferentes *Methylobacterium* en presencia de diferentes geles en el medio

a. Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido AMS-GP más harina de coco en polvo (a 2 gramos por litro)

30 La adición de harina de coco en polvo al medio líquido seguido por esterilización en autoclave dio como resultado la formación de un gel coloidal en el medio esterilizado. El medio esterilizado que contenía este gel se inoculó del mismo modo que los otros medios con los aumentos indicados y se cultivaron tal como se describe.

			<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días (UFC/ml)</u>
35	DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$9,5 \times 10^4$	$5,6 \times 10^9$
	DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	$5,6 \times 10^5$	$7,5 \times 10^8$
40	DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	$5,2 \times 10^5$	$8,1 \times 10^8$
	DSM-18172	<i>M. organophilum</i>	$5,9 \times 10^5$	$3,7 \times 10^9$
45	DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	$6,0 \times 10^4$	$2,9 \times 10^9$
	DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	$3,1 \times 10^5$	$1,5 \times 10^9$
	DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$7,4 \times 10^4$	$3,7 \times 10^9$
50	ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	$5,8 \times 10^4$	$6,6 \times 10^9$
	ATCC-14821	<i>M. rhodinum</i>	$1,9 \times 10^5$	$4,4 \times 10^9$
	ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	$5,8 \times 10^4$	$8,1 \times 10^8$
55	ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	$8,2 \times 10^4$	$5,2 \times 10^9$
	ATCC-43883	<i>M. zatmanii</i>	$6,8 \times 10^4$	$9,4 \times 10^8$
60	ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	$1,8 \times 10^5$	$3,4 \times 10^9$
	ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	$3,6 \times 10^5$	$1,3 \times 10^9$

65 Los títulos de las células de PPFM obtenidos fueron mayores que aquellos obtenidos mediante cultivo de PPFM en medio líquido transparente AMS-GP (véase resultados representativos del ejemplo 10 en los que los PPFM cultivadas durante 3 días en medio transparente AMS-GP no excedieron las 10^6 unidades formadoras de colonias por ml).

b. Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido AMS-GP más gelatina (a 2 gramos por litro)

La adición de gelatina al medio líquido seguido por esterilización en autoclave dio como resultado la formación de un gel coloidal en el medio esterilizado. El medio esterilizado que contenía este gel se inoculó del mismo modo que los otros medios con los aumentos indicados se cultivó tal como se describe.

5

			<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días (UFC/ml)</u>
10	DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$9,8 \times 10^4$	$7,2 \times 10^8$
	DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	$3,5 \times 10^5$	$6,8 \times 10^8$
	DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	$4,0 \times 10^5$	$9,7 \times 10^8$
15	DSM-18172	<i>M. organophilum</i>	$6,3 \times 10^5$	$1,0 \times 10^9$
	DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	$7,9 \times 10^4$	$5,3 \times 10^8$
20	DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	$9,2 \times 10^4$	$6,5 \times 10^8$
	DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$5,4 \times 10^5$	$9,8 \times 10^8$
	ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	$3,5 \times 10^5$	$2,1 \times 10^9$
25	ATCC-14821	<i>M. rhodinum</i>	$6,1 \times 10^5$	$8,3 \times 10^8$
	ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	$4,4 \times 10^5$	$5,7 \times 10^8$
30	ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	$7,6 \times 10^4$	$4,6 \times 10^8$
	ATCC-43883	<i>M. zatmanii</i>	$9,3 \times 10^4$	$5,5 \times 10^8$
	ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	$4,0 \times 10^5$	$6,1 \times 10^8$
35	ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	$5,0 \times 10^5$	$5,7 \times 10^8$

Los títulos de las células de PPFM obtenidos fueron mayores que aquellos obtenidos por cultivo de PPFM en medio líquido transparente AMS-GP (véase resultados representativos del ejemplo 10 en los que PPFM cultivadas durante 3 días en medio transparente AMS-GP no excedieron las 10^6 unidades formadoras de colonias por ml).

40

c. Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido AMS-GP más agar (a 2 gramos por litro)

La adición de agar al medio líquido seguido por esterilización en autoclave dio como resultado la formación de un gel coloidal en el medio esterilizado. El medio esterilizado que contenía este gel se inoculó del mismo modo que los otros medios con los aumentos indicados y se cultivo tal como se describe.

45

			<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días (UFC/ml)</u>
50	DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$1,5 \times 10^5$	$1,6 \times 10^8$
	DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	$1,3 \times 10^5$	$3,7 \times 10^8$
	DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	$9,2 \times 10^4$	$1,7 \times 10^8$
55	DSM-18172	<i>M. organophilum</i>	$8,1 \times 10^4$	$9,3 \times 10^7$
	DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	$5,2 \times 10^5$	$2,8 \times 10^8$
60	DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	$1,9 \times 10^5$	$5,0 \times 10^8$
	DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$1,0 \times 10^5$	$5,3 \times 10^8$
	ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	$2,4 \times 10^5$	$4,7 \times 10^8$
65	ATCC-14821	<i>M. rhodinum</i>	$1,5 \times 10^5$	$5,1 \times 10^8$
	ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	$8,1 \times 10^4$	$4,3 \times 10^8$

ES 2 700 936 T3

ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	$1,0 \times 10^5$	$4,4 \times 10^8$
ATCC-43883	<i>M. zatmanii</i>	$1,3 \times 10^5$	$5,6 \times 10^8$
5 ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	$4,5 \times 10^5$	$6,4 \times 10^8$
ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	$3,6 \times 10^5$	$1,7 \times 10^8$

10 Los títulos de células de PPFM obtenidos fueron mayores que aquellos obtenidos por cultivo de PPFM en medio líquido transparente AMS-GP (véase resultados representativos del ejemplo 10 en donde PPFM cultivadas durante 3 días en medio transparente AMS-GP no excedieron las 10^6 unidades formadoras de colonias por ml).

Ejemplo 12. Utilización de bacterias PPFM para promover el crecimiento vegetal y desarrollo temprano.

15 El establecimiento de un inicio vigoroso y uniforme de las plantas de maíz temprano en la temporada de crecimiento es esencial para un alto rendimiento de cultivo, y depende principalmente del desarrollo de un sistema de raíces nodal vigoroso. La función de las primeras raíces que emergen de una semilla de maíz (la radícula y las raíces seminales) es principalmente la incorporación de agua del suelo. Las raíces seminales de la radícula no proveen otra nutrición, que en el crecimiento temprano de la plántula es proporcionada por reservas de energía y nutrientes de la semilla. Cuando las raíces nodales emergen del tallo del maíz, el crecimiento de las raíces seminales disminuye drásticamente y contribuyen poco al mantenimiento a largo plazo de la planta de maíz. En su lugar, tiene este papel el sistema de raíces nodales. Por lo tanto, el establecimiento temprano y vigoroso de un sistema de raíces nodales tiene un papel importante en el desarrollo de un inicio uniforme del maíz. Si no se realiza, se obtiene como resultado plantas atrofiadas y otras deficiencias que desembocan en unos rendimientos más reducidos de la cosecha.

25 Los cultivos de bacterias PPFM producidas por el procedimiento del ejemplo 3 (es decir mediante crecimiento de las bacterias PPFM en medio líquido que contiene cristales de sales insolubles) se usaron para tratar semillas de maíz. Se añadieron 20 mililitros del cultivo de PPFM a 72 semillas de maíz, en un recipiente de forma que las semillas de maíz quedaran completamente sumergidas en el cultivo de PPFM. Como control, un número igual de semillas de maíz se sumergieron en medio de cultivo exento de PPFM del ejemplo 3. Las semillas de maíz se empaparon en estas soluciones durante 4 horas, a temperatura ambiente (aproximadamente 22 grados centígrados), con agitación suave. El final de este período de empapado, las semillas se plantaron en tierra en macetas y se dejaron germinar y crecer durante 8 días. En ese momento, las plántulas de maíz se extrajeron, se lavaron para quitar la tierra y se contaron y midieron las raíces nodales. Los resultados se muestran a continuación.

	<u>control</u>	<u>tratadas con PPFM</u>	
número de raíces nodales por planta, en miligramos	2,56	2,88	13% más
longitud promedio de raíces nodales por planta en centímetros	2,33	3,44	48% mayor

40 Estos resultados indican que la puesta en contacto de las semillas de maíz con el cultivo de título alto de PPFM proporcionado por la presente invención da como resultado la emergencia más temprana y un crecimiento más rápido de las raíces nodales.

Ejemplo 13. Crecimiento de *Methylobacterium* en medio líquido con sustancias sólidas no particuladas

45 Se cultivaron diez cepas diferentes de *Methylobacterium* (PPFM) en 200 ml de medio transparente AMS-GP, se titularon y después se concentraron diez veces. Estos cultivos de PPFM, sin sustancias sólidas presentes, se usaron para inocular tubos de ensayo que contenían 10 ml de medio transparente AMS-GP con diferentes sustancias sólidas no particuladas añadidas. Para los sólidos no particulados, se añadieron 20 mg de las diferentes sustancias sólidas no particuladas a cada tubo de 10 ml, obteniendo una concentración de sustrato sólido no particulado equivalente a 2 gramos por litro. El título inicial objetivo en cada tubo fue aproximadamente de 1×10^5 células de PPFM por ml. Los tubos de ensayo inoculados se dispusieron en un equipo incubador con agitación rotatoria y se cultivaron durante tres días a 30 grados centígrados y 250 rpm.

a. Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido AMS-GP más mechones de algodón (a 2 gramos por litro)

		<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días</u> (UFC/ml)
55 DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$6,6 \times 10^4$	$3,7 \times 10^8$
DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	$2,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^8$

ES 2 700 936 T3

5	DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	$1,7 \times 10^5$	$5,7 \times 10^7$
	DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	$1,6 \times 10^5$	$9,4 \times 10^7$
	DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$8,3 \times 10^4$	$4,7 \times 10^8$
10	ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	$7,0 \times 10^4$	$8,1 \times 10^7$
	ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	$3,5 \times 10^5$	$6,5 \times 10^7$
	ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	$3,3 \times 10^5$	$2,5 \times 10^8$
15	ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	$4,2 \times 10^5$	$7,0 \times 10^7$
	ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	$2,1 \times 10^5$	$7,4 \times 10^7$

Después de tres días de cultivo, los mechones de algodón estaban de un color rosa oscuro brillante, estando recubiertos con células de PPFM adheridas (figura 3A; cepa DSM-6343 *Methylobacterium extorquens*). Estas PPFM adheridas se retiraron mediante mezclado con vórtice vigoroso, y las suspensiones resultantes de células de PPFM se titularon. Los títulos de células de PPFM alcanzados fueron mayores que aquellos obtenidos por cultivo de los PPFM en medio líquido transparente AMS-GP (véanse los resultados representativos del ejemplo 10 en los que PPFM cultivadas durante 3 días en medio transparente AMS-GP no excedieron 10^6 unidades formadoras de colonias por ml). En la figura 4 se proporciona una fotomicrografía que muestra PPFM cepa ATCC-35065 *M. fujisawaense* adheridas a fibras de algodón.

b. Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido AMS-GP más mechones de lana de vidrio (a 2 gramos por litro)

			título inicial	título después de 3 días (UFC/ml)
30	DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$3,4 \times 10^5$	$2,0 \times 10^8$
	DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	$1,9 \times 10^5$	$2,3 \times 10^8$
	DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	$8,0 \times 10^4$	$5,6 \times 10^7$
35	DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	$9,4 \times 10^4$	$1,8 \times 10^8$
	DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$3,8 \times 10^5$	$6,5 \times 10^7$
	ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	$7,4 \times 10^4$	$3,9 \times 10^8$
40	ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	$3,2 \times 10^5$	$8,0 \times 10^7$
	ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	$6,8 \times 10^4$	$1,0 \times 10^8$
	ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	$1,1 \times 10^5$	$6,5 \times 10^7$
45	ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	$1,7 \times 10^5$	$3,0 \times 10^8$

Después de tres días de cultivo, los mechones de lana de vidrio fueron de color rosa brillante, estando recubiertos con células PPFM adheridas (figura 3B cepa DSM-6343 *Methylobacterium extorquens*). Estas PPFM adheridas se retiraron por agitación vigorosa con vórtice, y se titularon las suspensiones resultantes de células de PPFM. Los títulos de células de PPFM obtenidos fueron mayores que aquellos obtenidos por cultivo de PPFM en medio líquido transparente AMS-GP (véase los resultados representativos del ejemplo 2). Los títulos de las células de PPFM obtenidos fueron mayores que aquellos obtenidos por cultivo de PPFM en medio líquido transparente AMS-GP (véase resultados representativos de ejemplo 10 en donde PPFM cultivadas durante 3 días en medio transparente AMS-GP no excedieron las 10^6 unidades formadoras de colonias por ml).

c. Crecimiento de cepas de PPFM en medio líquido AMS-GP más mechones de esponja sintética (a 2 gramos por litro)

			<u>título inicial</u>	<u>título después de 3 días (UFC/ml)</u>
65	DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	$8,6 \times 10^4$	$8,4 \times 10^7$
	DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	$4,0 \times 10^5$	$4,4 \times 10^7$

	DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	$8,4 \times 10^4$	$2,9 \times 10^8$
5	DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	$9,2 \times 10^4$	$3,4 \times 10^8$
	DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	$9,0 \times 10^4$	$5,7 \times 10^7$
	ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	$7,5 \times 10^4$	$3,2 \times 10^8$
10	ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	$8,5 \times 10^4$	$1,6 \times 10^8$
	ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	$3,4 \times 10^5$	$7,5 \times 10^7$
	ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	$7,8 \times 10^4$	$7,8 \times 10^7$
15	ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	$2,4 \times 10^5$	$9,5 \times 10^7$

La esponja sintética usada fue "esponja corporal", fabricada por Compac Industries, Inc. de Decatur, GA. La esponja sintética está hecha de un material polimérico de poliéster.

Después de tres días de cultivo, los mechones de esponja sintética estaban de color rosa brillante, estando recubiertos con células de PPFM adheridas (Figura 3C cepa DSM-6343 *Methylobacterium extorquens*). Estas PPFM adheridas se retiraron mediante agitación vigorosa con vórtice, y se titularon las suspensiones resultantes de células de PPFM. Los títulos de células de PPFM obtenidos fueron mayores que aquellos obtenidos por cultivo de PPFM en medio líquido transparente AMS-GP (véase resultados representativos del ejemplo 10 en el que PPFM cultivadas durante 3 días en medio transparente AMS-GP no excedieron las 10^6 unidades formadoras de colonias por ml).

FORMAS DE REALIZACIÓN

Las formas de realización enumeradas siguientes definen la invención:

1. Una composición que comprende un producto de fermentación que comprende una sustancia sólida en la que un monocultivo o un cocultivo de *Methylobacterium* está adherido a la misma, en la que la sustancia sólida comprende una pluralidad de partículas de 2 micrómetros a aproximadamente 1000 micrómetros de longitud promedio o de diámetro promedio, en la que el título de *Methylobacterium* de dicho producto de fermentación es de 5×10^8 unidades formadoras de colonias por gramo de partículas a 5×10^{13} unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo de partículas, en la que dicha sustancia sólida está esencialmente exenta de microorganismos contaminantes y no es un microorganismo fotosintético, y en la que la composición comprende opcionalmente adicionalmente al menos uno de un coadyuvante agrícola aceptable y/o un excipiente agrícola aceptable o en la que la sustancia sólida comprende un coadyuvante agrícola aceptable o un excipiente agrícola aceptable.

2. La composición de la forma de realización 1, en la que el producto de fermentación comprende un coloide formado por la sustancia sólida y un líquido, en la que el coloide es opcionalmente un gel.

3. La composición de la reivindicación 1, en la que menos del 30% de las *Methylobacterium* adherentes presentes se retiran cuando la sustancia sólida se lava con tres volúmenes de medio de crecimiento líquido o en la que las *Methylobacterium* se adhieren a la sustancia sólida al cultivar las *Methylobacterium* en medio bifásico que comprende una fase líquida y la sustancia sólida.

4. La composición de la reivindicación 1, en la que el título de *Methylobacterium* de dichas partículas es de 5×10^8 unidades formadoras de colonias por gramo de partículas a 6×10^{10} unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo de partículas.

5. La composición de la forma de realización 1 a 4, en la que dicha sustancia sólida se selecciona del grupo que consiste en un material producido por el hombre, un material de origen animal, un material de origen vegetal, un material de origen microbiano, un material de origen fúngico, un material de origen mineral y combinaciones de los mismos.

6. La composición de una cualquiera de las formas de realización 1 a 5, en la que dicha sustancia sólida se selecciona del grupo que consiste en un polisacárido, una tierra de diatomeas, un cristal de sal y combinaciones de los mismos.

7. La composición de una cualquiera de las formas de realización 1 a 6, en la que dicha composición y/o dicha sustancia sólida comprenden adicionalmente uno o más microorganismos de identidad predeterminada diferentes de *Methylobacterium*.

8. La composición de una cualquiera de las formas de realización 1 a 7, en la que dicha composición comprende

adicionalmente al menos un plaguicida y/o al menos un agente bacteriostático.

9. La composición de la forma de realización 8, en la que dicho plaguicida se selecciona del grupo que consiste en un insecticida, un fungicida, un nematocida y un bactericida, en la que dicho plaguicida no inhibe sustancialmente el crecimiento de dicha *Methylobacterium*.

10. La composición de una cualquiera de las formas de realización 1 a 9, en la que dicha composición es un producto esencialmente seco, una mezcla de sustancia sólida con una emulsión o una suspensión.

11. Un procedimiento para tratar una planta o una parte de una planta con *Methylobacterium* que comprende la etapa de aplicar a dicha planta o parte de planta una composición de una cualquiera de las formas de realización 1 a 10.

12. El procedimiento de la forma de realización 11, en la que dicha parte es una semilla, un tallo, una raíz, una flor, un cotiledón, un coleóptilo, un fruto o una hoja.

13. El procedimiento de una cualquiera de las formas de realización 11 o 12, en la que dicha planta o parte de planta es una planta o parte de planta de maíz, *Brassica* sp., alfalfa, arroz, centeno, sorgo, mijo perlado, mijo proso, mijo cola de zorro, mijo africano, girasol, cártamo, soja, tabaco, patata, cacahuetes, algodón, batata, mandioca, café, coco, piña, árboles cítricos, cacao, té, plátano, aguacate, higo, guayaba, mango, olivo, papaya, anacardo, macadamia, almendra, remolacha azucarera, caña de azúcar, avena, cebada, tomate, lechuga, alubia verde, alubia pallar, guisante, cucurbitácea, plantas ornamentales o coníferas.

14. Una parte de planta que está al menos parcialmente recubierta con una composición de una cualquiera de las formas de realización 1-10.

15. La parte de planta de la forma de realización 14, en la que dicha parte de planta se selecciona del grupo que consiste en una parte de planta de maíz, *Brassica* sp., alfalfa, arroz, centeno, sorgo, mijo perlado, mijo proso, mijo cola de zorro, mijo africano, girasol, cártamo, soja, tabaco, patata, cacahuetes, algodón, batata, mandioca, café, coco, piña, árboles cítricos, cacao, té, plátano, aguacate, higo, guayaba, mango, olivo, papaya, anacardo, macadamia, almendra, remolacha azucarera, caña de azúcar, avena, cebada, tomate, lechuga, alubia verde, alubia pallar, guisante, cucurbitácea, plantas ornamentales o coníferas.

16. La parte de planta de una cualquiera de la forma de realización 14 o 15, siendo la parte de planta una semilla, un tallo, una raíz, una flor, un cotiledón, un coleóptilo, un fruto o una hoja.

17. Uso de la composición de una cualquiera de las formas de realización 1 a 10 para aumentar el crecimiento de raíz nodal en una planta de cereal con respecto a una planta de cereal sin tratar que no se ha expuesto a la composición.

18. Uso de la composición según la forma de realización 17, en la que la planta de cereal es maíz, cebada, mijo, avena, centeno, sorgo, triticale o trigo.

REFERENCIAS

Abanda-Nkpwatt, D., M. Musch, J. Tschiersch, M. Boettner, y W. Schwab. 2006. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *J. Exp. Bot.* 57: 4025-4032.

Cao, Y-R, Wang, Q., Jin, R-X., Tang, S-K., He, W-X., Lai, H-X, Xu, L-H., y C-L Jiang. 2011. *Methylobacterium soli* sp. nov. a methanol-utilizing bacterium isolated from the forest soil. *Antonie van Leeuwenhoek* (2011) 99:629-634.

Corpe, W.A., y D.V. Basile. 1982. Methanol-utilizing bacteria associated with green plants. *Devel. Industr. Microbiol.* 23: 483-493.

Corpe, W.A., y S. Rheem. 1989. Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62: 243-250.

Green, P.N. 2005. *Methylobacterium*. In Brenner, D.J., N.R. Krieg, y J.T. Staley (eds.). "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volumen dos, The Proteobacteria. Part C, The alpha-, beta-, delta-, and epsilonproteobacteria". Segunda edición. Springer, Nueva York. Páginas 567-571.

Green, P.N. 2006. *Methylobacterium*. In Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, y E. Stackebrandt (eds.). "The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Volumen 5. Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses", Tercera edición. Springer, New York. Páginas 257-265.

Holland, M.A. 1997. *Methylobacterium* and plants. *Recent. Res. Devel. in Plant Physiol.* 1: 207-213.

- Holland, M.A., y J.C. Polacco. 1994. PPFMs and other covert contaminants: Is there more to plant physiology than just plant? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 197-209.
- 5 Kutschera, U. 2007. Plant-associated methylobacteria as co-evolved phytosymbionts. A hypothesis. *Plant Signal Behav.* 2: 74-78.
- 10 Lidstrom, M.E. 2006. Aerobic methylotrophic prokaryotes. In Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, y E. Stackebrandt (eds.). "The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Volumen 2. Ecophysiology and biochemistry", Tercera edición. Springer, Nueva York. Páginas 618-634.
- 15 Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, H.S. Lee, K. Hari, S.P. Sundaram, y T.M. Sa. 2005. Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.) *Biol. Fertil. Soils* 41: 350-358.
- 20 Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, M. Senthilkumar, S. Seshadri, H. Chung, J. Yang, S. Sundaram, y T. Sa. 2004. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar C0-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45: 315-324.
- 25 Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, y T. Sa. 2007. Influence of plant species and environmental conditions on epiphytic and endophytic pink-pigmented facultative methylotrophic bacterial populations associated with field-grown rice cultivars. *J Microbiol Biotechnol.* 2007 Oct;17(10):1645-54.
- 30 Stanier, R.Y., N.J. Palleroni, y M. Doudoroff. 1966. The aerobic pseudomonads: A taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43: 159-271.
- 35 Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., De Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C., y Dreyfus, B. 2001. Methylotrophic *Methylobacterium* Bacteria Nodulate and Fix Nitrogen in Symbiosis with Legumes. *Jour. Bacteriol.* 183(1):214-220,
- Sy, A., A.C.J. Timmers, C. Knief, y J.A. Vorholt. 2005. Methylotrophic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7245-7252.
- Vogel, H.J., y D.M. Bonner. 1956. Acetylornithinase of *Escherichia coli*: Partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 218: 97-106.
- Whittenbury, R., S.L. Davies, y J.F. Wilkinson. 1970. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 61: 205-218.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un producto de fermentación que comprende una sustancia sólida en la que un monocultivo o un cocultivo de *Methylobacterium* está adherido a la misma, en la que la sustancia sólida comprende una pluralidad de partículas de 2 micrómetros a aproximadamente 1000 micrómetros de longitud promedio o de diámetro promedio, en la que el título de *Methylobacterium* de dichas partículas es de 5×10^8 unidades formadoras de colonias por gramo de partículas a 5×10^{13} unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo de partículas, en la que dicha sustancia sólida está esencialmente exenta de microorganismos contaminantes y no es un microorganismo fotosintético, y en la que la composición comprende opcionalmente adicionalmente al menos uno de un coadyuvante agrícola aceptable y/o un excipiente agrícola aceptable o en la que la sustancia sólida comprende opcionalmente un coadyuvante agrícola aceptable o un excipiente agrícola aceptable.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que el producto de fermentación comprende un coloide formado por la sustancia sólida y un líquido, en la que el coloide es opcionalmente un gel.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que menos del 30% de las *Methylobacterium* adherentes presentes se retiran cuando la sustancia sólida se lava con tres volúmenes de medio de crecimiento líquido o en la que las *Methylobacterium* se adhieren a la sustancia sólida al cultivar las *Methylobacterium* en medio bifásico que comprende una fase líquida y la sustancia sólida.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que el título de *Methylobacterium* de dichas partículas es de 5×10^8 unidades formadoras de colonias por gramo de partículas a 6×10^{10} unidades formadoras de colonias de *Methylobacterium* por gramo de partículas.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha sustancia sólida se selecciona del grupo que consiste en un material producido por el hombre, un material de origen animal, un material de origen vegetal, un material de origen microbiano, un material de origen fúngico, un material de origen mineral y combinaciones de los mismos.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha sustancia sólida se selecciona del grupo que consiste en un polisacárido, una tierra de diatomeas, un cristal de sal y combinaciones de los mismos.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha composición y/o dicha sustancia sólida comprenden adicionalmente uno o más microorganismos de identidad predeterminada diferentes de *Methylobacterium*.
8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicha composición comprende adicionalmente al menos un plaguicida y/o al menos un agente bacteriostático.
9. La composición de la reivindicación 8, en la que dicho plaguicida se selecciona del grupo que consiste en un insecticida, un fungicida, un nematocida y un bactericida, en la que dicho plaguicida no inhibe sustancialmente el crecimiento de dichas *Methylobacterium*.
10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicha composición es un producto esencialmente seco, una mezcla de sustancia sólida con una emulsión o una suspensión.
11. Un procedimiento para tratar una planta o una parte de una planta con *Methylobacterium* que comprende la etapa de aplicar a dicha planta o parte de planta una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en la que dicha parte es una semilla, un tallo, una raíz, una flor, un cotiledón, un coleóptilo, un fruto o una hoja.
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, en la que dicha planta o parte de planta es una planta o parte de planta de maíz, *Brassica* sp., alfalfa, arroz, centeno, sorgo, mijo perlado, mijo proso, mijo cola de zorro, mijo africano, girasol, cártamo, soja, tabaco, patata, cacahuets, algodón, batata, mandioca, café, coco, piña, árboles cítricos, cacao, té, plátano, aguacate, higo, guayaba, mango, olivo, papaya, anacardo, macadamia, almendra, remolacha azucarera, caña de azúcar, avena, cebada, tomate, lechuga, alubia verde, alubia pallar, guisante, cucurbitácea, plantas ornamentales o coníferas.
14. Una parte de planta que está al menos parcialmente recubierta con una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
15. La parte de planta de la reivindicación 14, en la que dicha parte de planta se selecciona del grupo que consiste en una parte de planta de maíz, *Brassica* sp., alfalfa, arroz, centeno, sorgo, mijo perlado, mijo proso, mijo cola de zorro, mijo africano, girasol, cártamo, soja, tabaco, patata, cacahuets, algodón, batata, mandioca, café, coco, piña, árboles cítricos, cacao, té, plátano, aguacate, higo, guayaba, mango, olivo, papaya, anacardo, macadamia, almendra, remolacha azucarera, caña de azúcar, avena, cebada, tomate, lechuga, alubia verde, alubia pallar,

guisante, cucurbitácea, plantas ornamentales o coníferas.

16. La parte de planta de una cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, siendo la parte de planta una semilla, un tallo, una raíz, una flor, un cotiledón, un coleóptilo, un fruto o una hoja.

5 17. Uso de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para aumentar el crecimiento de raíz nodal en una planta de cereal con respecto a una planta de cereal sin tratar que no se ha expuesto a la composición.

10 18. Uso de la composición según la reivindicación 17, en la que la planta de cereal es maíz, cebada, mijo, avena, centeno, sorgo, triticale o trigo.

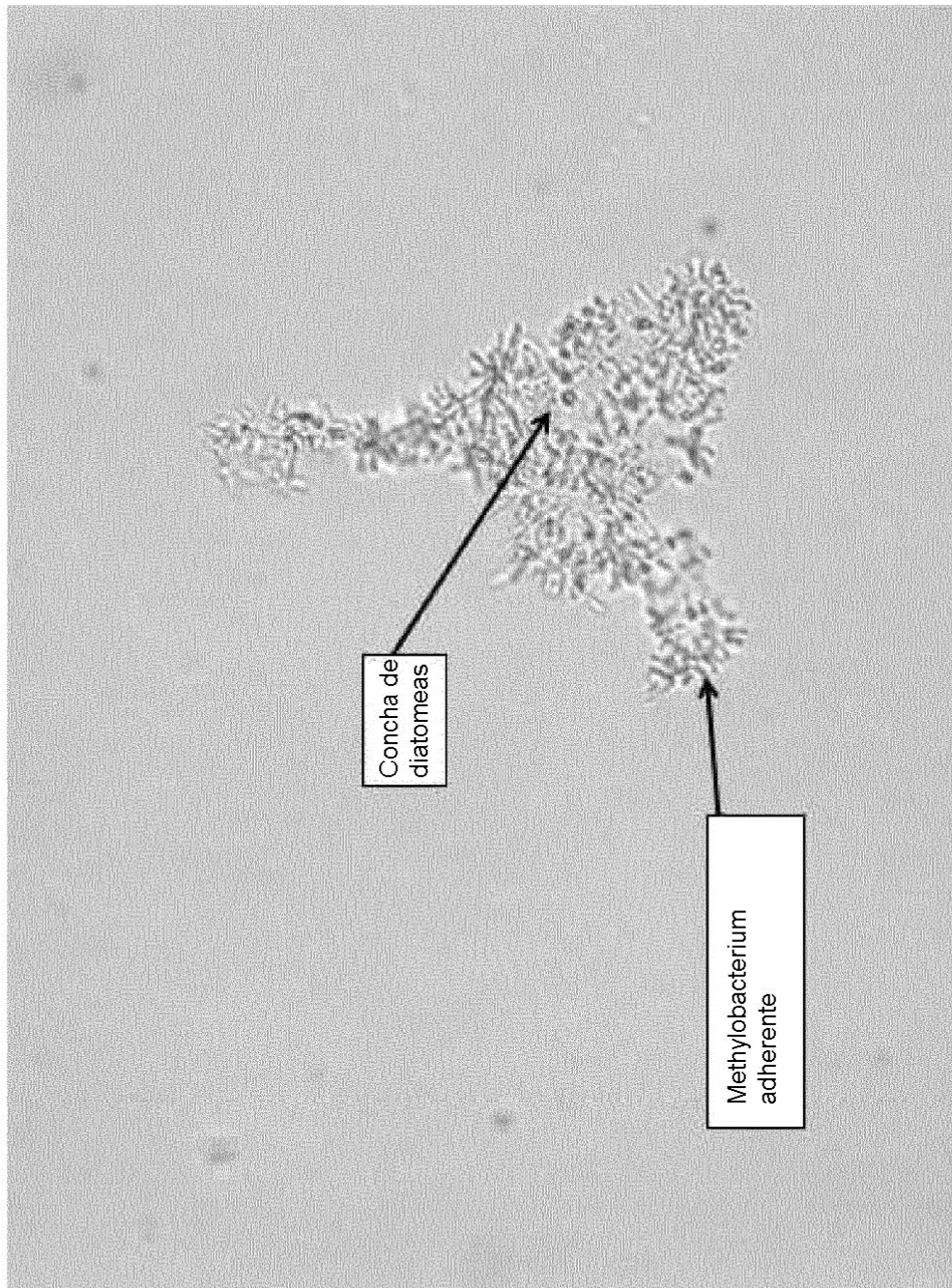


FIGURA 1

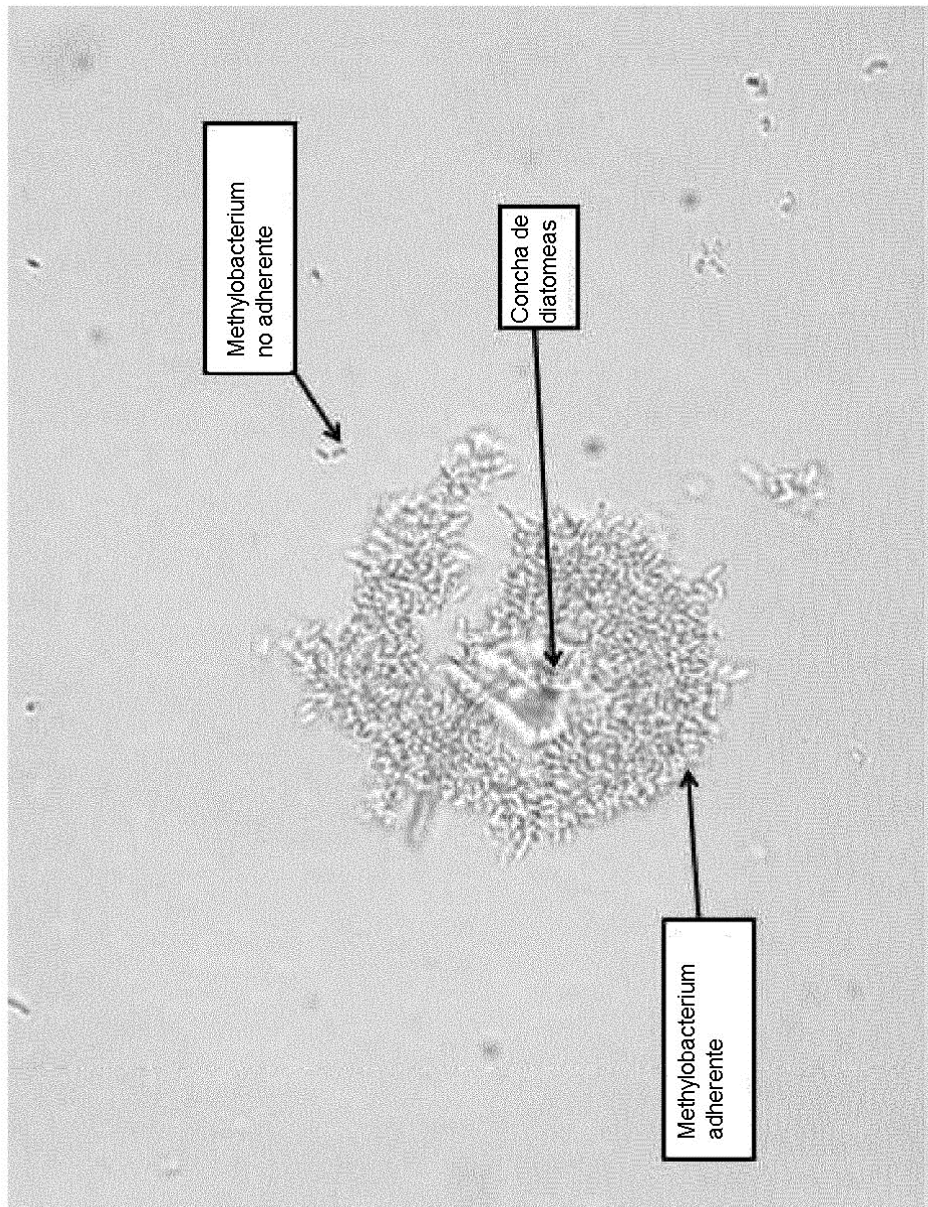


FIGURA 2

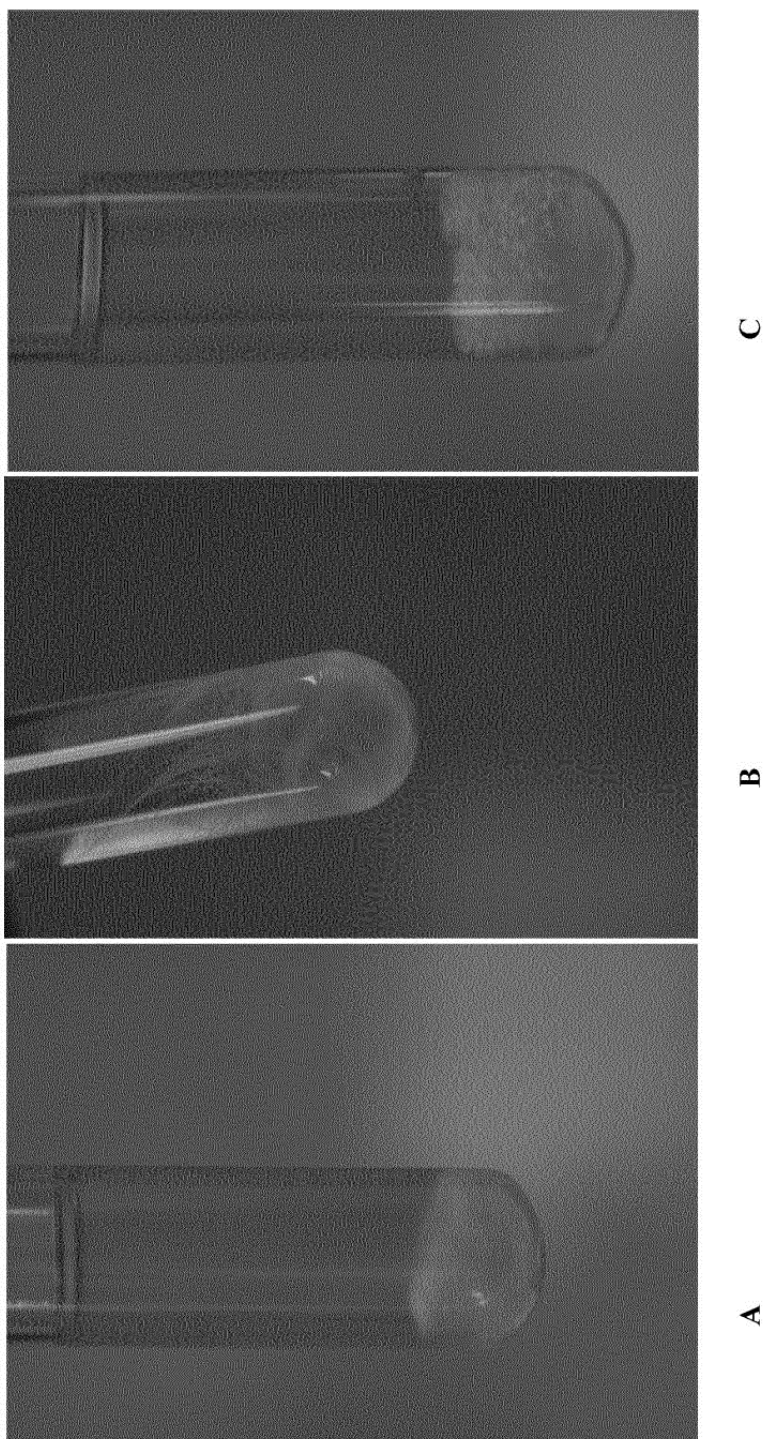


FIGURA 3 A, B, C

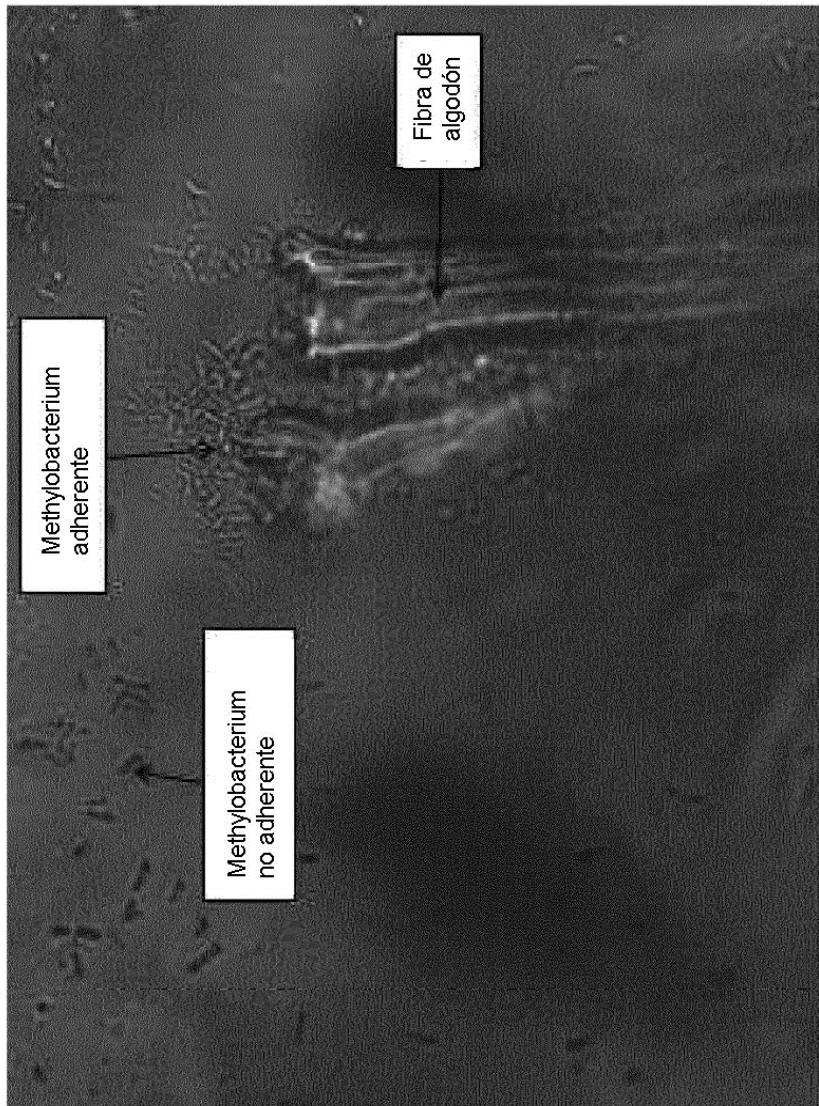


FIGURA 4