



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 360 318**

② Número de solicitud: 200901209

⑤ Int. Cl.:

A01N 63/04 (2006.01) **C05F 17/00** (2006.01)

C05F 11/08 (2006.01) **C12N 1/14** (2006.01)

C12R 1/885 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **08.05.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **03.06.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
03.06.2011

⑦ Solicitante/s: **MICROGAIA BIOTECH, S.L.**
Edificio CEEIM
Campus Universitario de Espinardo
30100 Espinardo, Murcia, ES

⑦ Inventor/es: **Sánchez López, Cristóbal;**
Pascual Valero, José Antonio y
Bernal Vicente, Agustina

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Procedimiento para la producción de un sustrato orgánico de cultivo funcional, inoculado, apto para el desarrollo de plántulas hortícolas a nivel de semillero, con capacidad biopesticida, bioestimulante y/o biofertilizante.**

⑤ Resumen:

Procedimiento para la producción de un sustrato orgánico de cultivo funcional, inoculado, apto para el desarrollo de plántulas hortícolas a nivel de semillero, con capacidad biopesticida, bioestimulante y/o biofertilizante.

Desarrollado de un sustrato orgánico funcional y su procedimiento de obtención, basado en un proceso de bioestabilización de restos de poda de vid, caracterizado porque durante el mismo se incorpora quitina y el microorganismo antagonista *Trichoderma harzianum* T-78 de forma secuencial y diferenciada, de modo que el momento y la forma de incorporación de los distintos elementos son clave para conseguir funcionalidades biopesticida, bioestimulante y/o biofertilizante, de forma eficaz, estable y persistente, en el sustrato.

Aplicado como sustitutivo de la turba, en el cultivo de plantas de melón a nivel de semillero y/o como enmienda funcional en aplicaciones al suelo, se caracteriza por tener una elevada efectividad en el control biológico de la fusariosis vascular del melón (*Fusarium oxysporum* sp. *Melonis*).

ES 2 360 318 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de un sustrato orgánico de cultivo funcional, inoculado, apto para el desarrollo de plántulas hortícolas a nivel de semillero, con capacidad biopesticida, bioestimulante y/o biofertilizante.

La presente invención proporciona un sustrato orgánico apto el desarrollo de plántulas y eficaz en el control biológico de la fusariosis vascular de melón, su proceso de elaboración y los métodos de aplicación del mismo. Se refiere a un sustrato capaz de sustituir a la turba por sus parámetros físico-químicos y con el valor añadido de tener una supresividad eficaz, estable y persistente frente a la fusariosis vascular de melón, además de un importante efecto bioestimulante y biofertilizante. Está caracterizado porque comprende (i) un microorganismo antagonista (*T. harzianum* T78) de *F. oxysporum* con capacidad biocontrol sobre éste, (ii) quitina, como coadyuvante; y (iii) un protocolo de incorporación secuencial de estos componentes, desarrollado en la presente invención, durante la elaboración del sustrato, que induce un efecto sinérgico del conjunto en cuanto a su funcionalidad biopesticida, bioestimulante y biofertilizante.

Sector y estado de la técnica

Un sustrato es, por definición, cualquier medio que se utilice para cultivar plantas en un contenedor. El uso de sustratos en la producción vegetal viene experimentando en las últimas décadas un considerable aumento tanto por motivos económicos como agronómicos e incluso medioambientales.

La evolución de las técnicas y medios de cultivo ha ampliado el campo de aplicaciones de los sustratos de forma importante: planta ornamental, jardinería, horticultura, etc., al tiempo que el aumento de la demanda de éstos produce una creciente sensibilidad hacia el agotamiento de recursos no renovables y el deterioro medioambiental. Esta creciente demanda de sustratos orgánicos hace que se plantee el uso de compost como un sustrato orgánico, si bien no todos los composts pueden ser utilizados como sustrato, porque estos deben de cumplir el requisito mínimo de permitir el adecuado crecimiento de las plantas que sobre él se desarrollen, así como el manejo de la producción tales como riego, fertilización, etc.

En España se producen una gran cantidad de residuos de poda procedentes de los principales cultivos leñosos. El destino de este tipo de residuo tiene implicaciones medioambientales que pueden ser negativas, como es el caso de la quema en la propia explotación tras ser retirados del campo; o bien positivas como es el aprovechamiento de las características físicas, físico-químicas, químicas y biológicas para su utilización como sustrato orgánico, alternativo a la turba, o enmienda orgánica en el suelo. Para ello, este tipo de material debe sufrir un proceso de compostaje que consiste en la estabilización de la materia orgánica de los mismos y la consiguiente eliminación aquellos microorganismos fitopatógenos que pudieran existir en el material vegetal utilizado (Costa y col., 1990). Además, la ventaja de manipular un residuo vegetal desde su origen hasta la obtención del producto final mediante compostaje, pueden permitir incrementar sus propiedades beneficiosas, dando como resultado composts funcionales y/o dirigidos. En este aspecto, dependiendo de las necesidades del sustrato se puede dirigir las características físicas; físico-químicas, químicas y biológicas hacia diferentes fines tales como control de enfermedades de plantas, mejorar las capacidades bioestimulantes y/o biofertilizantes.

La mayoría de los composts poseen un alto contenido en materia orgánica, la cual por descomposición natural permiten su utilización como enmiendas orgánicas con capacidad fertilizante gradual, al descomponerse su materia orgánica y liberando nutrientes que pueden ser aprovechadas por las plantas. Además dependiendo de su origen y composición estos pueden tener efecto supresivo frente a enfermedades, si bien, este efecto es parcial y errático, siendo difícil su utilización con este fin. Si bien, en los últimos tiempos, y dada la presión en el manejo de productos fitosanitarios ha recobrado una especial atención. Además, los composts como tales o en combinación con turbas han comenzado a ser utilizado como sustratos para el cultivo de plantas, aunque se hace necesaria aplicaciones externas de fertilizantes y plaguicidas químicos.

La quitina se utiliza por sí sola en el control preventivo de fitopatógenos (Chitomer, BCS Öko-Garantie QUIM_MERI_8244/01.04/4161-ES, Químicas Meristem). No obstante, el empleo directo de quitina, que se ha utilizado como agente fungicida, no ofrece resultados concluyentes, puesto que, si bien en determinadas circunstancias tiene un efecto preventivo, en otras tiene un efecto activador de la infección ya que puede ser utilizado como fuente de carbono y nutrientes por el microorganismo patógeno. Además, debido a la baja solubilidad en agua, dificulta la aplicación mediante riego, por lo que para su utilización en semillero, obligaría a una mezcla inicial con el sustrato, lo cual no tiene los resultados esperados. Otro abordaje al manejo de sustratos de forma sostenible es la aplicación justo antes del cultivo o durante del mismo de microorganismos antagonistas, con el fin de prevenir la instauración de enfermedades. Dentro de microorganismos de reconocida capacidad biocontrol tenemos distintos géneros tales como *Trichoderma sp*, *Bacillus sp*, *Aspergillus sp*, *Pseudomonas sp*. Se conocen algunas patentes en las que se ha intentado controlar biológicamente diferentes enfermedades de plantas a través de la incorporación de *Trichoderma sp*. Así por ejemplo, US. 4,900,348 (1990) describe un método que consiste en la producción de un sustrato supresor de enfermedades causadas por *Rhizoctonia solani* y *Pythium ultimum* que utiliza una mezcla de *Trichoderma hamatum* cepa 382 y *Flavobacterium balustinum* cepa 299. US 4,642,131 (1987), describe un método en el que *Trichoderma hamatum* se emplea en combinación con bacterias. Sin embargo, ninguno de estos métodos, describe el potencial

uso en el control de la fusariosis vascular del melón, y de forma más particular en el proceso de germinación y desarrollo de enfermedades a nivel de semillero. Por otro lado, existe una patente, ES 2188385 (2004), que consiste en la adición de una suspensión de conidias de *Trichoderma asperellum* cepa T34 a sustratos formulados a partir de mezclas de composts, turbas y otros materiales, lo que resulta efectivo frente a *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* en el cultivo de pepino y tomate respectivamente. Sin embargo la capacidad de supervivencia y estabilidad del antagonista, cuando se adiciona a una materia orgánica ya estabilizada y con su propia microflora ya establecida, es muy limitada. Tampoco hace referencia a los potenciales efectos bioestimulante y/o biofertilizante del sustrato, no mostrando efecto alguno en los efectos de su producto en el cultivo de melón a nivel de semillero. En otra patente, ES200603290, se plantea la inmovilización de una cepa de *Trichoderma harzianum* T78 mediante el uso de un material inorgánico y otros factores adicionales para el control de la fusariosis vascular, siendo su empleo equiparable a una aplicación puntual de un fungicida de control biológico o a la preparación de sustratos como el de la anterior patente.

Por tanto un sustrato como el planteado en la presente invención, concebido desde su origen para ser nicho ecológico y nutricional de un microorganismo específico y elaborado direccionalmente para cumplir dicho fin, sin perjuicio del cumplimiento de los parámetros físico-químicos de un sustrato estándar puede ser considerado como un nuevo producto.

20 Descripción de la invención

La presente invención proporciona un sustrato orgánico funcional apto para la producción de plántulas, tanto a nivel de semillero como de campo, y eficaz en el control biológico de fusariosis vascular de melón causada por el patógeno *F. oxysporum* f. sp. *Melonis*. Su elaboración está basada en un proceso de bioestabilización de restos de poda de vid, caracterizado porque durante el mismo se incorpora quitina y el microorganismo antagonista *Trichoderma harzianum* T-78 de forma secuencial y diferenciada, de modo que el momento y la forma de incorporación de los distintos elementos son clave para conseguir funcionalidades biopesticida, bioestimulante y/o biofertilizante, de forma eficaz, estable y persistente, en el sustrato.

El material vegetal seleccionado para su elaboración fue resto de poda de vid, ya que resultó ser el material más adecuado para el desarrollo de las propiedades que se pretenden potenciar en el nuevo sustrato (supresividad frente a fitopatógenos, actividad bioestimulante y biofertilizante) debido a la adecuada instauración del microorganismo *T. harzianum* T-78, al tiempo que presenta unas características físicas, físico-químicas, químicas y biológicas adecuadas para el desarrollo de plántulas hortícolas.

El sustrato objeto de la presente invención incorpora quitina como fuente nutritiva para la cepa inoculada, la cual se debe aplicar en un momento adecuado durante el proceso de bioestabilización de los restos de poda de vid, con el fin de optimizar las propiedades que se pretende potenciar en el nuevo sustrato (supresividad frente a fitopatógenos, actividad bioestimulante y biofertilizante). Además, la incorporación de quitina durante el proceso de compostaje no solo permite una óptima instauración de *T. harzianum* T-78, y aumento de la capacidad supresora del sustrato final, sino un aumento de la actividad bioestimulante y biofertilizante como consecuencia de la degradación parcial de la misma por parte de *T. harzianum* T-78, dando lugar a metabolitos que favorecen el crecimiento vegetal. Además, si partimos de la base, que en el proceso de compostaje no toda la quitina se degrada, la presencia de remanentes puede cumplir también el efecto supresor *per se* de la quitina (Bhaskara Reddy y col., 2000), evitando que esta sea utilizada por el fitopatógeno debido a la elevada instauración de *T. harzianum*.

La presencia de quitina durante el proceso de bioestabilización de los restos de poda de vid, mediante el compostaje, además de contribuir en el aporte de nitrógeno, reduciendo la relación C/N, favoreciendo la bioestabilización de la materia orgánica de los restos de poda de vid, induce la activación de la actividad quitinasa de *T. harzianum* inoculada, entre otros microorganismos existentes en los residuos de poda de vid. La actividad quitinasa es una enzima clave en el control de microorganismos patógenos puesto que es un compuesto similar al de la pared celular de algunos microorganismos fitopatógenos como *F. oxysporum*; de forma que cuando se produce una infección por patógenos, la actividad quitinasa generada previamente evitaría la instauración de estos.

Por tanto, la presente invención combina la incorporación de quitina de bajo grado de acetilación con el aislado de *T. harzianum*, aplicados de forma secuencial durante el compostaje; de forma que la quitina se aplica tras la primera fase termófila, aprovechando el volteo necesario, y el aislado de *T. harzianum* T-78, se incorpora al final de la fase termófila del proceso de compostaje. De esta forma se optimiza la capacidad supresiva, bioestimulante y biofertilizante del sustrato orgánico generado, con la consecuente obtención de cultivos de calidad, con menores insumos químicos (fertilizantes y plaguicidas químicos), evolucionando hacia una agricultura respetuosa con el medio ambiente y la salud de los seres vivos. Además, los componentes utilizados para conseguir dicho sustrato son adecuados para su utilización en agricultura ecológica, por lo que el sustrato propuesto permite controlar la fusariosis vascular de melón tanto en agricultura convencional como ecológica, mucho más restrictiva en cuanto a insumos. Además, el material de partida de este tipo de sustrato: restos de poda de vid, pasarían de ser un “residuo” a un “recurso”, valorizable económicamente, permitiendo dar una salida medioambiental adecuada, evitando la problemática de su eliminación, mediante su quema indiscriminada.

Descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico de barras del peso de plantas de melón expresado en gramos, correspondiente a la germinación y crecimiento de plántulas de melón a los 30 días (1), a los 37 días (2) y a los 43 días (3) sobre distintos sustratos orgánicos: T: turba; T-Th: turba inoculada con *T. harzianum*; SI: compost inoculado con *T. harzianum* al inicio del compostaje; SF: compost inoculado con *T. harzianum* al final del compostaje; S: compost sin inocular; S-Th: compost sin inocular durante el compostaje al que se incorpora *T. harzianum* antes de comenzar el cultivo del melón. Los resultados correspondientes a los tratamientos no sometidos a presión de patógeno se muestran con barras negras, mientras que los mismos tratamientos sometidos a presión de patógeno se muestran con barras grises. Cada barra representa el promedio de tres bandejas de poliestireno, donde cada una de ellas corresponde a 45 plantas.

La Fig. 2, corresponde a las unidades formadoras de colonia de *T. harzianum* por gramo de los distintos tratamientos de inoculación del microorganismo antagonista. Los tratamientos ensayados fueron compost inoculados con *T. harzianum* en el que el factor variable fue la no incorporación de quitosán (A); incorporación al inicio del compostaje (B); incorporación al final de la fase termófila (C); y, incorporación al final de la fase de maduración. Cada barra representa el promedio de UFCs por gramo de 5 mediciones de cada uno de los distintos tratamientos.

La Fig. 3., es un gráfico de barras del peso de plantas de melón expresado en gramos, correspondiente a la germinación y crecimiento de plántulas de melón a los 43 días de los siguientes tratamientos: T: turba; T-Ch: turba en el que se incorpora quitosán; C: compost inoculado con *T. harzianum* sin incorporación de quitosán; C-Ch: compost sin inocular con *T. harzianum* en el que se incorporó quitosán; y, C-Ch-Th: compost inoculado con *T. harzianum* en el que se incorporó quitosán al inicio del compostaje. Los resultados correspondientes a los tratamientos no sometidos a presión de patógeno se muestran con barras negras, mientras que los mismos tratamientos sometidos a presión de patógeno se muestran con barras grises. Cada barra representa el promedio de tres bandejas de poliestireno, donde cada una de ellas corresponde a 45 plantas.

Realización preferente de la invención

La ventaja y diferenciación del producto a patentar frente a los existentes en el mercado, es la obtención de un sustrato orgánico con elevada capacidad supresora frente a fitopatógenos, a partir de restos de poda de vid mediante un proceso de compostaje en el que se introduce de forma secuencial dos componentes: quitina y la cepa de *T. harzianum* T78, en una dosis adecuada y optimizada de ambos para conseguir el efecto esperado en el sustrato. En el proceso de obtención del nuevo sustrato con capacidad supresora resulta clave:

- 1) La utilización de quitina, tanto por conferir un valor añadido en cuanto a la reducción de la relación C/N, facilitando la estabilización de la materia orgánica de los restos de poda de vid, como el ser este un compuesto capaz de activar la actividad biocontrol de *T. harzianum* T78 y permitir un mayor desarrollo e implantación de este microorganismo en el compost final. Así como dotar al sustrato orgánico de un poder bioestimulante.
- 2) La utilización de una cepa específica de *Trichoderma harzianum* que se caracteriza por su capacidad biocontrol frente a microorganismos fitopatógenos, así como por su elevada supervivencia en sustratos orgánicos tales como los restos vegetales utilizados en la invención.
- 3) La aplicación secuencial de quitina y *T. harzianum* T78, durante el proceso de compostaje, siendo este un aspecto clave en la obtención del producto final, puesto que variaciones de esta dan lugar a formulaciones no adecuadas para su utilización como sustrato orgánico.
- 4) La obtención de un producto final con un doble efecto sinérgico en cuanto a la capacidad supresora y bioestimulante del sustrato orgánico, debido a la aplicación de quitina y *T. harzianum* T78, factor que no ocurre si se emplea cualquiera de estos dos componentes por separado.

El sustrato orgánico obtenido mediante la aplicación de la metodología propuesta en esta Invención podrá ser utilizado para distintos usos en cultivos vegetales tanto en suelo, como en su utilización como sustrato sin suelo, y en particular como sustrato en semillero, ya que su empleo permitirá un doble efecto: por un lado, resolver problemas fitosanitarios de difícil solución con productos químicos, reduciendo no solo la aplicación de fungicidas, sino de fertilizantes debido a las cualidades supresoras frente a fitopatógenos, biofertilizantes y bioestimulantes descritas para el nuevo sustrato; si no el poder reducir el tiempo de residencia de la plántula en semillero, dado el efecto bioestimulante y biofertilizante que presenta el nuevo sustrato, permitiendo una mayor producción por unidad de tiempo.

En un aspecto particular la invención se refiere a un sustrato capaz de sustituir a la turba y con el valor añadido de tener una supresividad eficaz frente a la fusariosis de vascular de melón, además de un importante efecto bioestimulante y bioestimulante caracterizado porque comprende (i) un microorganismo antagonista (*T. harzianum* T78) de

ES 2 360 318 A1

F. oxysporum con capacidad biocontrol sobre éste, (ii) quitina que mejora la capacidad biocontrol del producto y el desarrollo de las plántulas; y (iii) el efecto combinado de la incorporación secuencial de quitina y *T. harzianum* T78 en la obtención del sustrato, confiriendo un efecto sinérgico de ambos factores en cuanto al efecto bioestimulante y biofertilizante del sustrato orgánico resultante.

5

En otro aspecto particular la invención se relaciona con un sustrato orgánico apto para la producción de plántulas, tanto a nivel de semillero como a nivel de campo.

10 En otro aspecto particular la invención se relaciona con un sustrato orgánico eficaz en el control biológico de la fusariosis vascular de melón basado en el uso del aislado de *T. harzianum*, cepa T-78, CECT 20714, como microorganismo antagonista.

15 En otro aspecto particular la invención se relaciona con un orgánico eficaz para en el control biológico de la fusariosis vascular de melón que incorpora como factor adicional quitina inductor de la síntesis de quitinasas por parte de *T. harzianum* T-78.

20 En otro aspecto particular la invención se relaciona con un procedimiento de obtención de un sustrato orgánico apto para el desarrollo de plántulas y eficaz en el control biológico de la fusariosis vascular de melón caracterizado por haberse desarrollado a partir de restos de poda que se trituran y se someten a un proceso de bioestabilización (compostaje) mediante la incorporación secuencial de quitina y *T. harzianum* T-78, durante un período de 5 meses.

25 En otro aspecto particular la invención se relaciona con un sustrato orgánico eficaz no solo en la supresión de fitopatógenos, sino que la aplicación secuencial de quitina y *T. harzianum* durante el proceso de bioestabilización de residuos de poda de vid, da lugar a un producto final con poder bioestimulante y biofertilizante, permitiendo la reducción de fertilizantes químicos, acelerando el tiempo de residencia de las plántulas crecidas sobre este tipo de sustrato, lo que incide de forma directa en una reducción de costes en la producción de plántulas en el semillero.

30 Otro aspecto particular de la invención es la utilización del sustrato objeto de la invención para el control biológico de fitopatógenos en semillero para los cuales no existe solución química de igual efectividad que los obtenidos mediante la utilización del sustrato descrito en esta Memoria.

35 Otro aspecto particular de la invención lo constituye la utilización del sustrato objeto de la invención para el control biológico de la fusariosis vascular en campo de cultivo.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención pero no deben considerarse en sentido limitativo de la misma.

40 Ejemplo N°1

Selección del material vegetal a emplear en la realización del compost, más adecuado para el desarrollo de las plántulas y la instauración del aislado de Trichoderma harzianum T-78

45 Los restos vegetales utilizados fueron: restos de poda de olivo, vid y pino, los cuales se compararon con turba Flora Balt. Todos ellos se inocularon con el aislado T-78, evaluando su supervivencia. Para ello, se elaboraron diferentes medios de cultivo sobre placa Petri utilizando extractos procedentes de los diferentes materiales citados anteriormente. Además, su capacidad de supervivencia fue validada mediante un ensayo de incubación del aislado T-78, en los distintos restos vegetales materiales orgánicos. Tras un periodo de ocho días, se evaluó la supervivencia del aislado
50 mediante conteo de las UFC de *T. harzianum* T-78 en un medio PDA (Patata, Dextrosa, Agar) y rosa bengala (50 mg/L).

55 La caracterización de los restos vegetales ensayados se muestra en la Tabla 1, reuniendo las características mínimas para ser compostados, como son elevado contenido en materia orgánica y niveles medios de nutrientes.

60

65

ES 2 360 318 A1

TABLA 1

Análisis fisicoquímico y químico de los restos vegetales seleccionados, comparándose con la turba

	Turba	Olivo	Pino	Vid
pH	6.34	5.48	5.26	5.56
CE (mS/cm³)	3.70	2.06	2.96	2.00
COT (g/100g)	36.50	26.31	21.47	31.51
N total (g/100g)	0.96	1.7	0.32	0.68
C/N	38.02	15.47	67.09	46.32
P total (g/100)	0.17	0.50	<0.1	<0.1
K total (g/100)	0.22	1.05	0.55	0.52

Los ensayos *in vitro*, realizados con los diferentes extractos obtenidos de los restos vegetales, mostraron que el aislado T-78 presentó el mayor crecimiento en los medios de cultivo compuestos por restos de poda de vid y olivo, cubriendo el total de la placa Petri a los 3 días del ensayo, mientras que la turba y los restos de pino necesitaron 4 y 6 días respectivamente. La inoculación directa del aislado T-78 sobre los distintos materiales orgánicos reveló que los restos de poda de vid fueron los que manifestaron recuentos del aislado T-78 significativamente mayores al resto de los materiales orgánicos utilizados.

Por ello, y atendiendo a los criterios de selección anteriormente expuestos, se decidió utilizar como material de partida, los restos de poda de vid, debido a que fue el material que presentó el mejor desarrollo del aislado T-78, destacando este sobre todos ellos, incluida la turba, material de referencia para el uso que se le quiere dar a este tipo de material, sustrato para la germinación y crecimiento de plántulas a nivel de semillero.

Ejemplo N°2

Obtención de un sustrato orgánico nuevo a partir de residuos de poda de vid mediante la inoculación de T. harzianum T-78 y la incorporación de quitina durante el compostaje

El desarrollo de este experimento tuvo un doble objetivo, dividió en dos fases claramente diferenciadas. *En la primera* se optimizó el momento de realizar la inoculación de T. harzianum T-78 durante el proceso de compostaje y su respuesta en planta en cuanto a su efecto supresor frente a *F. oxysporum*, así como su potencial efecto bioestimulante y/o biofertilizante; y *en la segunda*, se evaluó la incidencia de la incorporación de quitina en el proceso de compostaje, de forma independiente e inoculación de T. harzianum T-78, utilizando los mismos parámetros antes mencionados.

Fase 1

Inoculación de T. harzianum T-78 en el compostaje de residuos de poda de vid y su utilización como sustrato orgánico para el crecimiento de plántula de melón a nivel de semillero

Fase 1a

Optimización de la inoculación de T. harzianum T-78 en el compostaje

Se prepararon siete pilas de restos de poda de vid, las cuales se sometieron a un proceso de compostaje. La inoculación del aislado de T. harzianum T-78 se realizó al inicio del proceso de compostaje tras el primer volteo y al final de la fase de compostaje e inicio de la fase de maduración. Las pilas denominadas S contenían sarmiento no inoculado y fueron consideradas como control, las denominadas SI fueron inoculadas con el aislado de T. harzianum T-78 al principio del proceso de compostaje y las denominadas SF fueron inoculadas al final de la fase de compostaje (inicio de la fase de maduración).

ES 2 360 318 A1

Las pilas de restos de poda de vid, se inocularon con 400 g de un preparado del aislado de *T. harzianum* T-78, con una humedad del 45% elaborado con una mezcla de suspensión de esporas del mismo, obtenida siguiendo la siguiente proporción: 1 mililitro de suspensión de esporas obtenido del raspado de un cultivo en placa Petri de *T. harzianum* T-78, que equivale a una concentración de esporas de 10(9) UFC/mL, 10 g de bentonita, 20 g de vermiculita y 25 mL de agua.

Los registros de temperatura realizados a lo largo de todo el proceso de compostaje, mostraron que las pilas de restos de poda de vid inoculados con el aislado T-78 desde el inicio de proceso, mostraron menor temperatura que las pilas no inoculadas. Por otra parte, las pilas de compost inoculadas al final de la fase termófila registraron a su vez un menor registro de temperatura que las no inoculadas.

Los composts inoculados con el aislado T-78 (SI) presentaron mayor cantidad de materia orgánica al final del proceso de compostaje, en comparación con el compost no inoculado. La incorporación del aislado T-78 al inicio de la fase de compostaje ralentizó la descomposición de la materia orgánica durante las primeras fases del compostaje. Los composts inoculados con el aislado T-78 al final de la fase de compostaje (SF), mostraron de nuevo como la inoculación del aislado T-78 produjo una ralentización en la descomposición de la materia orgánica. Independientemente del momento de inoculación del aislado T-78, los valores de materia orgánica no fueron significativamente diferentes entre sí, mostrando un mayor contenido de materia orgánica que el compost no inoculado, denotando la ralentización ocasionada en la mineralización de la materia orgánica al ser inoculado el aislado T-78. (Tabla.2.).

TABLA 2

Materia orgánica total (calcinación) durante el proceso de compostaje de las diferentes pilas de sarmiento. (Las diferencias con respecto a los valores control fueron significativas a $P < 0.05$ de acuerdo con el test múltiple de Tukey HSD, valores con la misma letra no son significativamente diferentes)

	0 Días	26 Días	120 Días
	%		
Compost sin inocular (S)	93.55 a (a)	86.03 b (b)	80.00 c (a)
Compost inoculado con T-78 al inicio (SI)	96.43 a (a)	94.59 a (a)	86.80 b (b)
Compost inoculado al final de la fase de compostaje (SF)	93.50 a (a)	85.90 b (b)	84.76 b (b)

(Las letras distintas representan diferencias significativas entre los valores; sin paréntesis indican la significación estadística en sentido horizontal y las encerradas entre paréntesis hacen referencia a la significación estadística en vertical).

La evolución en los parámetros físico-químicos y nutricionales no se vio afectada por la incorporación del aislado T-78, dando en general un producto final de similares características en todos los casos (Tabla 3).

Una vez finalizado el proceso de compostaje, los análisis microbiológicos revelaron que los composts inoculados en la fase final del proceso, SF, presentaban una mayor población del aislado T-78 que los inoculados al comienzo del proceso, SI (Tabla.4.), lo que pone de manifiesto que la población del aislado T-78 se vio afectada por el proceso de compostaje, debido fundamentalmente a la temperatura.

De todo ello se concluyó que la instauración del aislado de *T. harzianum* T-78 fue mayor en el caso de la inoculación al final de la fase termófila que al inicio del proceso de compostaje, y que la introducción del aislado *T. harzianum* T-78 durante el compostaje reflejó una reducción en la mineralización de la materia orgánica del compost.

TABLA 3

Análisis fisicoquímico y nutricional del residuo de poda de vid, como material de partida, y de los composts obtenidos, inoculados o no con el aislado de *T. harzianum* T-78. (Las diferencias con respecto a los valores control fueron significativas a $P < 0.05$ de acuerdo con el test múltiple de Tukey HSD, valores con la misma letra no son significativamente diferentes)

	Material de partida (resto de poda de vid)	Compost sin inocular (S)	Compost inoculado inicio (SI)	Compost inoculado final (SF)
pH	5.56 (c)	6.81 (a)	6.71 (ab)	6.61 (b)
CE (mS/cm³)	2.00 (b)	2.21 (a)	1.89 (ba)	1.72 (c)
N total (g/100g)	0.68 (b)	0.94 (a)	0.89 (a)	0.91 (a)
P total (g/100)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
K total (g/100)	0.52 (a)	0.59 (a)	0.55 (a)	0.55 (a)
C/N	46.32 (a)	39.10 (d)	43.58 (b)	42.97 (c)

TABLA 4

Evolución de la población del aislado de *T. harzianum* T-78 a lo largo del proceso de compostaje. (Las diferencias con respecto a los valores control fueron significativas a $P < 0.05$ de acuerdo con el test múltiple de Tukey HSD, valores con la misma letra no son significativamente diferentes)

	0 Días	26 Días	120 Días
	log₁₀ (UFC/g de compost)		
Compost sin inocular (S)	<2	<2	<2
Compost inoculado inicio (SI)	5.64 (a)	4.72 (b)	4.70 (b)
Compost inoculado final (SF)	<2 (b)	<2 (b)	5.34 (a)

Fase 1b

Validación del empleo de sustrato orgánico obtenido para el cultivo de plantas de melón en semillero. Evaluación de su capacidad supresiva frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*

Los composts obtenidos se trituraron previamente a su utilización como sustrato de crecimiento comparándose con una turba convencional en condiciones de semillero comercial. El cultivo con el que se trabajó fue melón, siendo los tratamientos: compost de sarmiento no inoculado (S); compost de sarmiento inoculado al inicio del proceso de compostaje (SI), sarmiento inoculado al final del proceso de compostaje (SF) y compost inoculados en el momento de realizar el ensayo (S-T78).

Se prepararon seis bandejas de poliestireno, empleadas en los semilleros en el proceso de producción de plántulas de melón, para cada uno de los tratamientos, de las cuales tres se utilizaron tal cual y otras tres fueron inoculadas con *F. oxysporum*, fitopatógeno frente al cual se pretendía evaluar la capacidad de control de los composts ensayados. También se prepararon seis bandejas con la turba habitual empleada en la empresa de semillero, las cuales actuarían como referencia o control durante el experimento. Las técnicas utilizadas en la producción de plántulas de melón fueron las empleadas habitualmente por dicha empresa, salvo que en esta ocasión no hubo aplicación de productos fitosanitarios.

Los resultados obtenidos mostraron que *a priori*, los compost obtenidos tenían características similares a una turba (Tabla.5.), a pesar de las diferencias nutricionales anteriormente mencionadas.

TABLA 5

Características fisicoquímicas y químicas de los materiales utilizados como sustrato en el desarrollo de las plántulas de melón. (Las diferencias con respecto a los valores control fueron significativas a $P < 0.05$ de acuerdo con el test múltiple de Tukey HSD, valores con la misma letra no son significativamente diferentes)

	Turba	S	SI	SF
pH	6.34 (c)	6.81 (a)	6.71 (ab)	6.61 (b)
CE (mS/cm³)	3.70 (a)	2.21 (b)	1.89 (c)	1.72 (d)
COT (g/100g)	36.50 (d)	36.80 (c)	40.10 (a)	39.10 (b)
N total (g/100g)	0.96 (a)	0.94 (a)	0.89 (a)	0.91 (a)
P total (g/100)	0.17 (a)	0.07 (a)	0.06 (a)	0.06 (a)
K total (g/100)	0.22 (c)	0.59 (a)	0.44 (b)	0.44 (b)
Relación C/N	38.02 (d)	39.11 (c)	43.59 (a)	42.97 (b)

En general, los compost inoculados con el aislado T-78 mostraron un mayor peso de plántula que el compost sin inocular, en los diferentes muestreos, acentuándose estas diferencias en el último muestreo (Fig.1.), aunque los pesos fueron en el caso de los composts menores a los observados con la turba (Fig.1.). Este menor crecimiento puede ser subsanado a través del pre-enriquecimiento del compost en su producción, o bien con la adición de nutrientes durante el proceso de producción de las plántulas en semillero, hecho que no se subsanó con el fin de evaluar la capacidad supresiva de los sustratos obtenidos, sin interferencias.

Cuando las plantas fueron sometidas a la presión de *F. oxysporum*, se produjo una disminución generalizada de peso, registrándose las mayores disminuciones de peso en los tratamientos que utilizaron turba y compost no inoculado con el aislado T-78. La utilización de los composts inoculados con el aislado T-78, mostró un mayor peso de las plántulas de melón crecidas bajo presión de *F. oxysporum*. El momento de inoculación del aislado no mostró diferencias en cuanto al peso de planta de melón en presencia del patógeno en los primeros muestreos, aunque si en el último muestreo, siendo significativamente mayor en los composts inoculados con el aislado T-78 (SI y SF), en comparación con el inoculado en el momento de la germinación (S-T-78; Fig.1).

La incidencia del patógeno calculada como el porcentaje de pérdida de peso de planta de melón en presencia del patógeno frente al mismo tratamiento sin presión de patógeno, pretende ser un dato gráfico en el que queda descartado el potencial efecto nutricional de los tratamientos, evaluándose la incidencia del patógeno. Este parámetro mostró, como los materiales orgánicos sin inocular, presentaron una alta incidencia del patógeno alcanzándose pérdidas entorno al 50% en el último muestreo, tiempo en el que las plántulas salen del semillero para su trasplante en campo (Tabla 6). La inoculación del aislado T-78 supuso una menor incidencia del patógeno a lo largo del tiempo, destacando la menor incidencia observada en las plantas de melón crecidas sobre compost inoculado al final de la fase termófila, o final de la fase de compostaje propiamente dicho, con una incidencia final del 15%; segui-

da de las crecidas en el compost inoculado inicialmente, con una incidencia del 22%; siendo aquellos tratamientos en el que la inoculación del aislado se realizó en el momento de la puesta del experimento como son la turba y el compost S-T-78, los que mostraron una mayor incidencia del conjunto de sustratos inoculados con el aislado T-78 (Tabla 6.).

En este punto se pone de manifiesto, la importancia de que la inoculación del aislado se realice durante el compostaje en comparación con la inoculación justo antes del cultivo. Las causas que se pueden atribuir a este hecho es la posibilidad que tiene el microorganismo antagonista de instaurarse de un modo adecuado en el compostaje que no ocurren si únicamente se atiende a una mezcla física del aislado y el sustrato. De modo, que una adecuada instauración del microorganismo antagonista, como ocurre en el compostaje, permite una mejor respuesta de protección frente al patógeno en condiciones de cultivo.

TABLA 6

Incidencia del patógeno en el crecimiento de plántulas de melón, expresado como el porcentaje de pérdida de peso de planta de melón en presencia del patógeno frente al mismo tratamiento sin presión de patógeno. (Las diferencias con respecto a los valores control fueron significativas a $P < 0.05$ de acuerdo con el test múltiple de Tukey HSD, valores con la misma letra no son significativamente diferentes)

Incidencia del patógeno			
(%)			
Tratamientos	30 días	37 días	43 días
Turba	32.95 c (a)	45.89 b (a)	53.43 a (a)
Turba con T-78	2.50 b (e)	24.06 a (b)	26.73 a (d)
SI	13.51 b (d)	12.30 b (d)	22.39 a (e)
SF	0.00 c (f)	6.84 b (e)	15.95 a (f)
S	26.80 b (b)	23.69 c (b)	50.36 a (b)
S-T-78	18.10 b (c)	16.16 b (c)	29.63 a (c)

(Las letras sin paréntesis indican la significación estadística en sentido horizontal y las puestas entre paréntesis hacen referencia a la significación estadística en vertical).

Por tanto, la inoculación de *T. harzianum* T-78, en particular tras la fase termófila, durante el compostaje reveló una menor incidencia del patógeno, en comparación con aquellos tratamientos en los que la inoculación se realizó en el momento de la preparación de los materiales para la germinación y crecimiento de plántulas de melón a nivel de semillero.

Fase 2

Evaluación de la incorporación de quitina durante el compostaje sobre el aislado T. harzianum T-78 y su efecto en la supresividad del sustrato obtenido

La incorporación de quitina en el proceso de compostaje tenía el objetivo de: a) promover la actividad nutriactiva y biocontrol del aislado T-78, al ser este un sustrato característico en el metabolismo de *Trichoderma*, b) mejorar la capacidad biocontrol del sustrato, debido a la capacidad *per se* de la quitina deacetilada de inhibir el crecimiento de fitopatógenos y c) promover la capacidad nutriactiva del sustrato, dada el carácter nutricional que tiene la quitina, fundamentalmente nitrógeno (Tabla 7).

Fase 2.a

Optimización de la incorporación de quitina en el compostaje

5 Se prepararon 4 pilas de compostaje, a partir de restos de podad de vid y el aislado T-78, según se ha descrito en la Fase 1, a los que se le adicionó además quitina deacetilada (chitosan). La quitina se adicionó en distintos procesos del compostaje, al inicio y al final de las fases termófilas, a la dosis del 1%; las pilas fueron duplicadas con y sin inoculación del aislado T-78, el cual en caso de ser inoculado se introdujo en la pila al final de la fase de compostaje propiamente dicha, según se acababa de optimizar. Durante el proceso de compostaje se monitorizaron los parámetros clave de humedad, temperatura y aireación.

15 Los registros de temperatura realizados a lo largo del proceso de compostaje, mostraron que la incorporación de quitina, independientemente del momento de su incorporación provocaba un aumento de la temperatura, obligando a realizar un volteo más que en el caso de su no incorporación, independiente de la inoculación o no del aislado. Este hecho debe ser atribuido a que la incorporación de este compuesto con un elevado componente nutricional, fundamentalmente nitrógeno, promovió la mineralización de materia orgánica carbono, debido a la disminución de la relación C/N hasta valores óptimos para que se diese una mayor biodegradación durante el proceso de compostaje.

20 La evolución en los parámetros físico-químicos y nutricionales se vio afectada por la incorporación de quitina junto al aislado T-78, de modo que al final del proceso se obtuvo un sustrato con un mayor contenido en nutrientes, fundamentalmente de naturaleza nitrogenada (Tabla. 7.), además de un menor contenido en materia orgánica (Tabla.8.), en comparación con aquellos tratamientos en los que no fueron implementados con quitina. El contenido nutricional de los sustratos no se vio afectado de forma significativa debido a la presencia o no del aislado T-78 (Tabla.7.).

TABLA 7

30 *Características fisicoquímicas y químicas de los materiales utilizados como sustrato en el desarrollo de las plántulas de melón, implementados con quitina en distintos momentos del proceso de compostaje, inoculados o no con el aislado T78. (Las diferencias con respecto a los valores control fueron significativas a $P < 0.05$ de acuerdo con el test múltiple de Tukey HSD, valores con la misma letra no son significativamente diferentes)*

			<i>Compost inoculado con T-78</i>			<i>Compost no inoculado con T-78</i>		
	restos poda	quitina	Tiempo de la incorporación de quitina			Tiempo de la incorporación de quitina		
			Inicio	Intermedio	Final	Inicio	Intermedio	Final
pH	5.56	9.3	6.6a	6.5a	6.8a	6.6 ^a	6.6a	6.6 ^a
CE (mS/cm³)	2.00	0.97	2.06a	2.05a	2.09a	2.2 ^a	2.3a	2.4 ^a
N total (g/100g)	0.68	7.19	1.80b	1.80b	1.92b	2.77 ^a	2.60a	2.55 ^a
P total (g/100)	<0.1	<0.1	0.23a	0.21a	0.22a	0.25 ^a	0.22a	0.23 ^a
K total (g/100)	0.52	3.89	0.18a	0.16a	0.17a	0.17a	0.17a	0.17 ^a
C/N	46.3	6.3	22.87a	25.40a	22.36a	17.20b	17.64b	18.45b

TABLA 8

Materia orgánica total (calcinación) durante el proceso de compostaje de las diferentes pilas en las que se incorporó quitina en distintos momentos clave del proceso, inoculados o no con el aislado de *Trichoderma* T-78 (Las diferencias con respecto a los valores control fueron significativas a $P < 0.05$ de acuerdo con el test múltiple de Tukey HSD, valores con la misma letra no son significativamente diferentes)

Días desde incorporación quitina	0 Días	50 Días	120 Días
	%		
Compost de referencia inoculado con aislado T-78 (sin quitina)	93.55 a (a)	86.03 b (ab)	80.00 c (a)
Inicio	95.55 a (a)	83.03 b (c)	70.00 c (b)
Inicio + aislado T-78	94.15 a (a)	85.03 b (b)	78.00 c (a)
Intermedio	95.53 a (a)	85 b (b)	73.00 c (b)
Intermedio + aislado T-78	93.85 a (a)	88 b (a)	81.00 c (a)
Final fase termófila	95.12 a (a)	85.90 b (ab)	78.00 c (a)
Final fase termófila + aislado T-78	92.13 a (a)	86.06 b (ab)	80.00 c (a)

(Las letras sin paréntesis indican la significación estadística en sentido horizontal y las encerradas entre paréntesis hacen referencia a la significación estadística en vertical)

La introducción de quitina afectó a la evolución de las poblaciones de *Trichoderma* en el compost dependiendo del momento de su introducción (Fig. 2.), teniendo un efecto positivo cuando se incorporaban de forma separada en el tiempo respecto a *Trichoderma*, mientras que si se hacía de forma conjunta, el efecto observado mostraba un efecto negativo sobre *Trichoderma*, lo que pone de manifiesto que la población del aislado T-78 se vio afectada por la incorporación de quitina, debido al aumento de la temperatura observada como consecuencia de la bajada de la relación C/N hasta valores óptimos de biodegradación de la materia orgánica de la masa global obtenida (resto de poda + quitina).

Por este motivo, entre otros, únicamente se seleccionó como sustrato para los ensayos de supresividad, los composts activados biológicamente en los que existía una incorporación secuencial de quitina y *Trichoderma harzianum*, ya que no mostraron efecto negativo sobre las poblaciones de *Trichoderma*, como ocurría en el caso de la incorporación conjunta de ambos componentes durante el proceso de compostaje. También se empleó el compost obtenido con quitina y no inoculado con *Trichoderma harzianum* con el fin de evaluar el potencial poder bioestimulante y biofertilizante de este compuesto sin necesidad de inoculación de microorganismo alguno.

Fase 2.b

Validación del empleo de sustrato orgánico obtenido para el cultivo de plantas de melón en semillero. Evaluación de su capacidad supresiva frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*

Los sustratos utilizados para el ensayo de germinación y crecimiento de plántulas de melón en semillero comercial, fueron: los dos nuevos composts que incorporaban quitina, con y sin inoculación del aislado, el compost inoculado con el aislado, obtenido en el Ejemplo 2, comparándose con la turba convencional a la cual se incorporó tanto quitina como *Trichoderma*, con la finalidad de ver si se producía alguna diferencia en el crecimiento de la planta y en el grado de infección del patógeno con respecto a la utilización de compost.

ES 2 360 318 A1

El estudio de supresividad se realizó también utilizando el compost que únicamente incorporaba quitina sin la incorporación del aislado T-78, con el fin de validar la potencial efectividad *per se* del quitosano en la potencial generación de sustratos supresivos, mediante inducción de una biomasa microbiana natural con capacidad biopesticida.

5 Para la realización del experimento, se prepararon seis bandejas de poliestireno, empleadas en los semilleros en el proceso de producción de plántulas de melón, para cada uno de los tratamientos, de las cuales tres se utilizaron tal cual y otras tres fueron inoculadas con *F. oxysporum*, fitopatógeno frente al cual se pretendía evaluar la potencial capacidad fungicida. También se prepararon seis bandejas con la turba habitual empleada en la empresa de semillero, las cuales actuarían como referencia o control durante el experimento. Las técnicas utilizadas en la producción de plántulas
10 de melón fueron las empleadas habitualmente por dicha empresa, salvo que en esta ocasión no hubo aplicación de productos fitosanitarios.

En general, los compost que incorporaban quitina, presentaron unos pesos de planta de melón significativamente mayores que la turba y su respectivo tratamiento sin incorporación de quitina (Fig. 3.). Además, la incorporación del
15 aislado T-78, junto a la quitina, tuvo un efecto positivo en el rendimiento de planta, demostrando un efecto bioestimulante y/o biofertilizante, resultante de la combinación de la capacidad de producir metabolitos con capacidad hormonal, así como un efecto biofertilizante, fruto de la mineralización de la quitina, liberando nutrientes de forma gradual durante el crecimiento de la plántula de melón. De este modo, una de las limitaciones en la utilización de composts de sarmientos de poda de vid inoculados con *Trichoderma*, que es el menor crecimiento de las plántulas,
20 a pesar de su elevado potencial efecto biocontrol, observado en la Fase 1 de la presente invención, no solo pudo ser suplido con la incorporación de quitina de forma selectiva en el proceso de compostaje, sino que también se consiguió la aceleración del crecimiento de las plantas de una forma homogénea. La estimación del tiempo de residencia en el semillero, se calculó partiendo de la premisa del tamaño óptimo de las plantas para el trasplante, dato que se obtuvo del tiempo medio observado en los ensayos de crecimiento de plantas de melón con turba. De este modo, la utilización
25 de este nuevo tipo de sustrato permitiría reducir el tiempo de residencia en semillero hasta su trasplante en campo en al menos 1/3, pasando de 40 días (tiempo medio de estancia con turba) a 27 días (tiempo medio de estancia con el nuevo sustrato implementado con quitina y *Trichoderma*).

Cuando las plantas fueron sometidas a la presión de *F. oxysporum*, se observó que el tratamiento a base de quitina,
30 tanto en turba como en el compost, sin la incorporación de *Trichoderma* tuvo un efecto negativo en el desarrollo de las plantas de melón, produciendo una incidencia del patógeno incluso mayor que la turba y el compost sin adición de quitina (Fig 3), ya que la quitina puede ser una fuente de carbono y nutrientes para el microorganismo patógeno. Sin embargo, el efecto que tuvo la incorporación de quitina de forma sinérgica al aislado T-78, además de presentar un efecto nutriaectivo, dando lugar a plantas de mayor tamaño que con la turba (Fig. 3.); redujo significativamente la
35 incidencia del patógeno, calculada como el porcentaje de pérdida de peso de planta de melón en presencia del patógeno frente al mismo tratamiento sin presión de patógeno (Fig. 3.) Lo que pone de manifiesto, que la presencia de quitina y *Trichoderma harzianum* T-78 en compost de restos de poda de vid, es capaz de impedir la instauración del patógeno, *Fusarium oxysporum*, en el sustrato y/o evitando la infección de las plantas, debido a una acción antagónica directa frente al patógeno, o bien indirecta debido a la inducción sistémica en la planta, que permitan evitar la incidencia de
40 la enfermedad.

Por tanto, el resultado final de estos estudios, ha sido la obtención de un sustrato orgánico para el cultivo de planta a nivel de semillero, el cual no solo es alternativo a la turba, sino que introduce un valor añadido importante en cuanto a su capacidad bioestimulante y/o biofertilizante, así como en el control de una enfermedad habitual en este cultivo: la fusariosis vascular del melón.
45

La implementación del compostaje mediante la incorporación secuencial de quitina y posterior inoculación de *Trichoderma harzianum* T-78 al final de la fase de compostaje, se revela como un método adecuado para la obtención de un sustrato apto para el cultivo de plántulas de melón a nivel de semillero, el cual permite un rápido crecimiento,
50 uniforme, homogéneo y adecuado de plántulas de melón y que en condiciones de estrés biótico tiene la capacidad de evitar la infección de la planta, permitiendo obtener plantas adecuadas para su trasplante en campo.

55

60

65

ES 2 360 318 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de elaboración de un sustrato orgánico funcional, mediante compostaje de restos de poda de vid, **caracterizado** por:
- 1° introducción de quitina, como coadyuvante, durante la fase termófila del compostaje.
- 2° inoculación del microorganismo *Trichoderma harzianum* al final de la fase termófila del compostaje.
- 10 2. Procedimiento de elaboración de un sustrato orgánico según reivindicación 1 **caracterizado** porque la cepa del microorganismo inoculado es *Trichoderma harzianum* T78, CECT 20714.
- 15 3. Procedimiento de elaboración de un sustrato orgánico según reivindicación 1 **caracterizado** porque la inoculación de *Trichoderma harzianum*, se realiza mediante una mezcla de una suspensión de esporas, bentonita y vermiculita.
- 20 4. Procedimiento de elaboración de un sustrato orgánico según reivindicación 1 **caracterizado** porque el coadyuvante está formado por organismos o partes de éstos con alto contenido en quitina o a partir de la manufactura de partes de los mismos.
- 25 5. Procedimiento de elaboración de un sustrato orgánico según reivindicación 1 **caracterizado** porque el coadyuvante es chitosán.
- 30 6. Sustrato orgánico funcional **caracterizado** por estar obtenido a partir de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 35 7. Uso de un sustrato orgánico elaborado según la reivindicación 6, para el control biológico de enfermedades en plantas.
- 40 8. Uso de un sustrato orgánico elaborado según la reivindicación 6, para el aporte de sustancias con efecto bioestimulante.
- 45 9. Uso de un sustrato orgánico elaborado según la reivindicación 6, para el control biológico.
- 50 10. Uso de un sustrato orgánico elaborado según la reivindicación 6, por sí solo o en combinación con otro tipo de sustrato orgánico, para el control biológico de enfermedades vasculares en plantas.
- 55 11. Uso de un sustrato orgánico elaborado según la reivindicación 6, por sí solo o en combinación con otro tipo de sustrato orgánico, para el control de la fusariosis vascular en cultivos herbáceos.
- 60 12. Uso de un sustrato orgánico elaborado según la reivindicación 6 para el cultivo del melón.
- 65 13. Uso de un sustrato orgánico elaborado según la reivindicación 6, para el control de fusariosis en el melón.
14. Uso de un sustrato orgánico elaborado según la reivindicación 6, para el control de fusariosis en el melón en cultivos sin suelo.
15. Uso de un sustrato orgánico elaborado según la reivindicación 6, para el control de fusariosis en el melón en cultivo de semillero
16. Uso de un sustrato orgánico elaborado según la reivindicación 6, para el cultivo del melón en suelo.
17. Uso de un sustrato orgánico elaborado según la reivindicación 6, para el control de fusariosis en el melón en cultivos en suelo.
18. Uso de un sustrato orgánico funcional obtenido según la reivindicación 6, por sí solo o en combinación con otro tipo de sustrato orgánico, tanto en la germinación, desarrollo y crecimiento de plantas en cultivo sin suelo, así como su uso en el suelo, para inducir resistencia frente a enfermedades causadas por organismos fitopatógenos.
19. Uso de un sustrato orgánico funcional obtenido por según la reivindicación 6, por sí solo o en combinación con otro tipo de sustrato orgánico, tanto en la germinación, desarrollo y crecimiento de plantas en cultivo sin suelo, así como su uso en el suelo, para estimular el crecimiento de plantas.
20. Uso de un procedimiento realizado según la reivindicación 1, para la obtención de un producto con capacidad fungicida, fertilizante o estimulante del desarrollo o crecimiento de plantas.

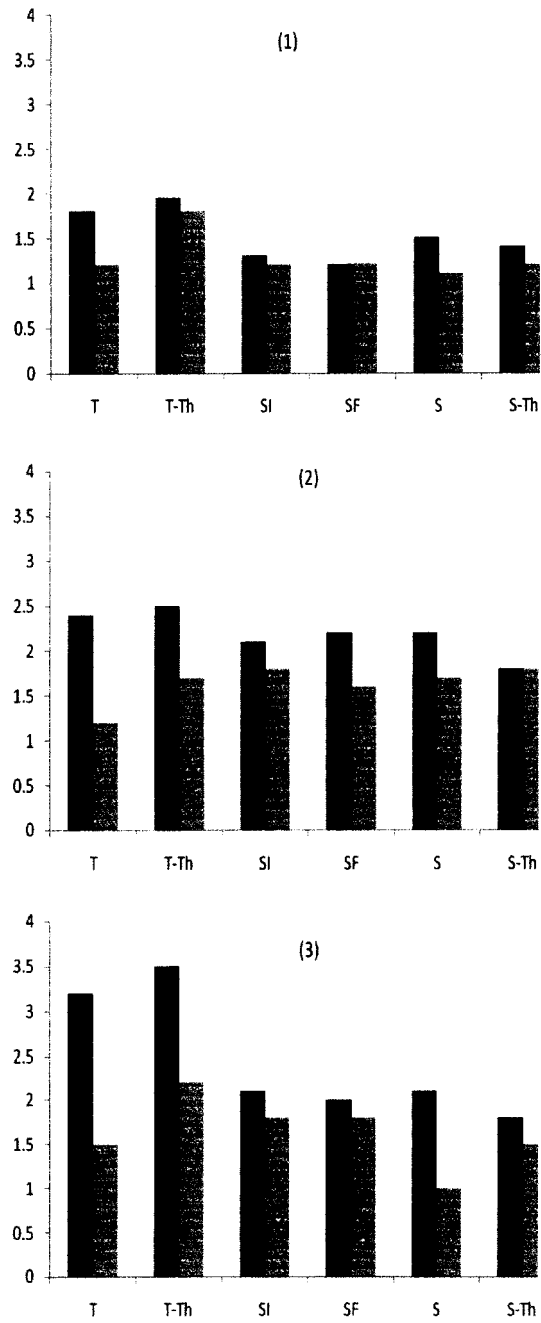


Fig. 1

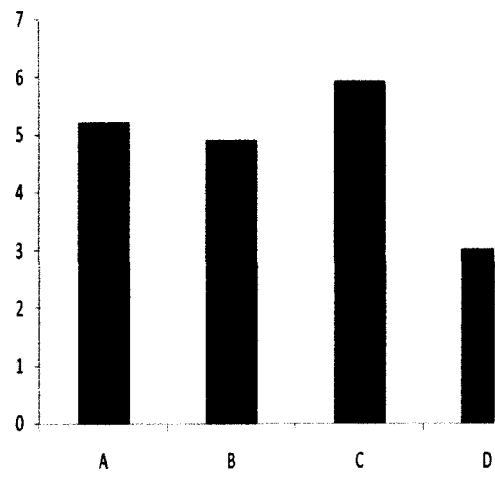


Fig 2

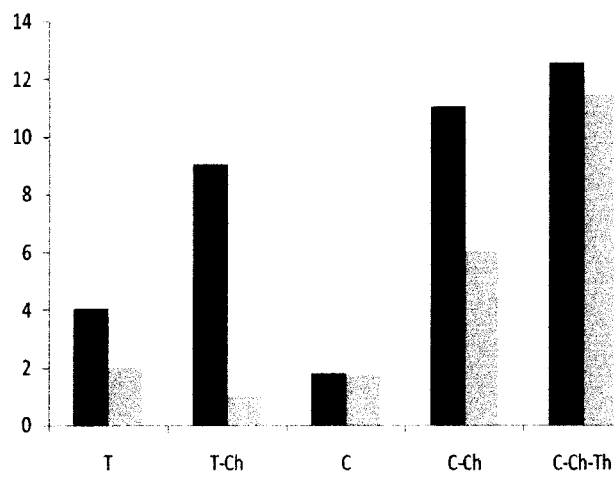


Fig. 3.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200901209

②② Fecha de presentación de la solicitud: 08.05.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 4900348 A (HOITINK HARRY A) 13.02.1990, columna 1, líneas 36-46; columna 4, líneas 35-55; columna 6, líneas 37-46; columna 7, líneas 40-65.	1-20
A	BERNAL, A. et al. Tratamiento biológico de la fusariosis del melón con compost inoculado. Agricultura. Revista Agropecuaria. 2005. Vol. 74, Nº 872, páginas 188-191. ISSN 0002-1334.	1-20
A	ES 2311389 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION) 01.02.2009, página 3.	1-20
A	ES 2188385 A1 (UNIV BARCELONA) 16.06.2003, columnas 1-3.	1-20
A	WO 2007110686 A2 (COUNCIL SCIENT IND RES et al.) 04.10.2007, página 5, líneas 5-10; página 9, líneas 1-15; página 13, líneas 4-8.	1-7
A	EP 0485229 A1 (SHELL INT RESEARCH) 13.05.1992, página 6, líneas 15-27.	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
20.05.2011

Examinador
E. Ulloa Calvo

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A01N63/04 (2006.01)

C05F17/00 (2006.01)

C05F11/08 (2006.01)

C12N1/14 (2006.01)

C12R1/885 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01N, C05F, C12N, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, XPESP, MEDLINE, NPL, EMBASE, COMPDX, INSPEC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.05.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-20	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-20	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 4900348 A (HOITINK HARRY A)	13.02.1990
D02	BERNAL, A. et al. Agricultura. Revista Agropecuaria. 2005. Vol.74, Nº 872, páginas 188-191.	2005
D03	ES 2311389 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION)	01.02.2009
D04	ES 2188385 A1 (UNIV BARCELONA)	16.06.2003
D05	WO 2007110686 A2 (COUNCIL SCIENT IND RES et al.)	04.10.2007
D06	EP 0485229 A1 (SHELL INT RESEARCH)	13.05.1992

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y 8.1 L.P.)**

El objeto técnico de la solicitud consiste en un método de elaboración de un sustrato funcional mediante compostaje de restos de poda de vid junto con quitina y *T.harzianum*, resaltando la importancia del momento de aplicación de la quitina así como de *T.harzianum* durante el compostaje. De esta forma se obtiene un sustrato óptimo para el control biológico.

El documento D01, muy cercano a la solicitud, describe un método de elaboración de un sustrato funcional mediante compostaje de restos leñosos con *Trichoderma* (*T.harzianum* en algunos casos), resaltando la importancia de aplicar el microorganismo justo tras el pico termófilo, al inicio de la fase mesófila. Habla de su uso para control biológico de distintas plagas según la especie empleada, por ejemplo contra *Fusarium oxysporum*. Si bien, este documento no emplea quitina en ningún momento del compostaje, ni parte de restos de poda de vid como materia de partida, aspectos que le confieren ventajas a la solicitud respecto a D01.

El documento D02 anticipa el tratamiento biológico de la fusariosis del melón con compost inoculado con *T.harzianum*. La inoculación la realiza en soporte sólido. Además, refleja la necesidad de aumentar la actividad de *Trichoderma* en el compost para un adecuado control biológico, incorporando para ello enzimas tipo quitinasa, glucosidasa o lipasa.

El documento D03 describe un producto sólido eficaz para el control biológico de fusariosis vascular del melón así como su procedimiento de obtención. Consiste en inocular *T.harzianum* T78 CECT 20714 sobre una matriz sólida que lleva bentonita, vermiculita y quitosano, y posteriormente mezclarlo con turba.

El documento D04 anticipa el uso de compost de distintos orígenes inoculados con *Trichoderma* para el control biológico de *Fusarium oxysporum*.

El documento D05 narra un compuesto útil para el control biológico de plagas y que estimula el crecimiento de las plantas formado por una o varias cepas de *T.harzianum* sobre un soporte (compost, por ejemplo). También hace referencia al uso de quitina para aumentar la población de *Trichoderma* en el suelo.

El documento D06 se refiere a una composición a base de un hongo micorrízico como mejorador del crecimiento de las plantas y, opcionalmente, un hongo antagonista (*T.harzianum*) para el control biológico de plagas y quitina, la cual es empleada por el hongo para usarla como nutriente.

Los documentos más cercanos al estado de la técnica reflejan distintos aspectos de la solicitud, si bien ninguno de ellos, tomados solos o en combinación, realizan un compostaje de restos de poda de vid introduciendo quitina durante la fase termófila y *T.harzianum* al final de la misma. La introducción de quitina en ese momento en concreto conlleva una ventaja respecto a la no introducción de la misma, o a la introducción en otro momento, no sólo por su valor supresor en sí, ni por su aporte de nitrógeno al equilibrio C/N del compost, sino también, y tal y como demuestra la solicitud en su memoria, por favorecer el crecimiento de *T.harzianum* en el compost. También se resalta en la solicitud la utilización de restos de poda de vid como materia de partida más óptima para el compostaje con *T.harzianum*, aspecto que no viene reflejado en ningún documento anterior.

Así, y a la vista del estado de la técnica conocido, las reivindicaciones 1-20 cumplen con el requisito de novedad y actividad inventiva.