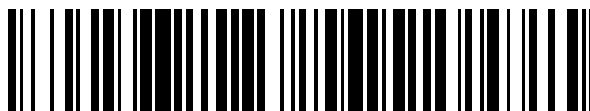


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 200**

51 Int. Cl.:
C12N 1/14

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05707264 .7**
96 Fecha de presentación: **08.02.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1713901**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.10.2006**

54 Título: **MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS.**

30 Prioridad:
11.02.2004 EP 04003036

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.02.2012

73 Titular/es:
**UREA CASALE S.A.
VIA GIULIO POCOBELLI, 6
6900 LUGANO-BESSO, CH**

72 Inventor/es:
PANCHAUD-MIRABEL, Elisabeth

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

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).

ES 2 375 200 T3

DESCRIPCIÓN

Medio de cultivo para la producción de hongos filamentosos

5 Campo de la solicitud

La presente invención se refiere al campo técnico de los agentes fitosanitarios.

En particular, la invención se refiere a un medio de cultivo para hongos filamentosos, más específicamente de
10 hongos nematófagos.

Técnica anterior

El uso de microorganismos y en particular de los hongos como agentes fitosanitarios constituye una práctica cada
15 vez más común.

Los productos a base de hongos ya están comercializados para la lucha contra insectos, hongos fitopatógenos y otros parásitos habituales de los cultivos agrícolas.

20 Por ejemplo, en la patente US 5 811 092 se describen unos agentes nematófagos para la lucha contra los nematodos del género *Meloidogyne*, *Heterodera* y *Ditylenchus*, que consisten en unas cepas particulares de *Arthrobotrys conoides* Dreschesler, un hongo filamentoso.

Los nematodos citados anteriormente son responsables de patologías vegetales y fúngicas graves y pueden causar
25 grandes pérdidas económicas, puesto que hacen que el 50-70% de la cosecha se vea comprometida.

El uso de hongos nematófagos, como alternativa a los productos antiparasitarios químicos convencionales (por ejemplo, bromuro de metilo, tricoloronitrometano, dicloropropeno, etc.) para su aplicación en el suelo antes de la siembra o bien los carbamatos aplicados directamente a los cultivos, permite evitar problemas graves como son la
30 esterilización del suelo, la destrucción del equilibrio ecológico y la toxicidad potencial para el hombre y para los animales.

De este modo, los hongos nematófagos resultan particularmente adecuados para su uso en los cultivos orgánicos pero todavía tienen un coste bastante elevado, debido a las dificultades para producirlos industrialmente con unos
35 rendimientos elevados.

Existe, por consiguiente, una necesidad de que los hongos nematófagos estén disponibles a un coste más económico para el uso en la agricultura.

40 Bastos (Bastos CN, Summa Phytopathologica, volume 27, pages 73-77, November 2000) estudió el cultivo de hongos nematófagos de la especie *Trichoderma* nov. Sp y evaluó la formación de conidios en varios medios de cultivo.

El problema de base de la presente invención era proporcionar un medio de cultivo de hongos filamentosos y en particular para hongos nematófagos, que permita que dichos microorganismos se produzcan a nivel industrial con
45 unos rendimientos elevados y en periodos cortos de tiempo, con la consecuente disminución en el coste del producto final.

Sumario de la invención

50 Este problema se resolvió, según la invención, mediante un medio de cultivo para hongos filamentosos que comprende 60-65% de molasas, 10-15% de sacarosa, 10-15% de licor de maíz macerado y 10-15% de extracto de levadura. Ventajosamente, dicho medio de cultivo contiene, además del 5 al 8% de una fuente de nitrógeno mineral, en particular fosfato de hidrógeno diamónico.

55

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos de formas de realización

proporcionados con fines ilustrativos y no con fines limitativos

Antes de proceder con la ilustración de los ejemplos, consideramos que es útil proporcionar algunas definiciones relacionadas con los componentes del medio de cultivo según la invención.

5 Las molasas y la sacarosa se utilizan como fuentes de carbono.

Las molasas constituyen un producto secundario de la industria azucarera y se encuentran en forma de líquido viscoso de un color negro-marrón, que contiene 10% de agua, 35% de sacarosa, 20% de otros azúcares y 15% de ceniza.

El extracto de levadura y el licor de maíz macerado se usan como fuentes de nitrógeno orgánico.

15 El extracto de levadura se obtiene por autólisis de *Saccharomyces cerevisiae* y se encuentra en forma de polvo fino de color amarillo claro, fácilmente soluble en agua. El extracto de levadura contiene péptidos, aminoácidos libres, bases de purina y pirimidina así como vitaminadas hidrosolubles del grupo B. El extracto de levadura presenta un contenido total de nitrógeno del 10% y un contenido de nitrógeno α -amínico del 5%.

20 El licor de maíz macerado se obtiene mediante la maceración de los granos de maíz a una temperatura de 50 °C durante 24-48 horas en agua que contiene dióxido de sulfuro. Este reactivo permite que la matriz proteica que envuelve los granos de almidón se destruya y ofrece la ventaja de evitar el desarrollo de microorganismos indeseables durante la maceración. El licor de maíz macerado presenta un contenido total de nitrógeno del 7 % y un contenido de nitrógeno α -amínico del 1,7% y también contiene 5% de azúcares, 4% de potasio, 3% de fósforo y 17% de diferentes minerales.

25 Se han probado varios medios de cultivo a base de las fuentes de carbono y nitrógeno mencionadas anteriormente.

30 El contenido en porcentaje de la fuente de nitrógeno orgánico del medio según la invención se puede reducir, sustituyendo parte de dicha fuente de nitrógeno orgánico por una fuente de nitrógeno inorgánico (nitratos de amonio o compuestos) que se añaden gradualmente y en pequeñas cantidades durante el cultivo.

Esta adición de nitrógeno inorgánico durante el cultivo permite una nutrición mejor de los microorganismos, en el caso de los hongos filamentosos, estiramiento de los filamentos miceliales.

35 La sustitución de parte de la fuente de nitrógeno orgánico por una fuente de nitrógeno inorgánico también presenta la ventaja de reducir costes de producción, puesto que las fuentes de nitrógeno orgánico (extracto de levadura y licor de maíz macerado) constituyen los componentes más caros del medio de cultivo según la invención.

40 El medio de cultivo según la invención resulta particularmente adecuado para su uso en la producción de hongos filamentosos de la familia Moniliales. En particular, en los ejemplos indicados a continuación, se utilizan hongos filamentosos de *Arthrotrichum conoides* Dreschler.

EJEMPLO 1

45 El cultivo de los hongos filamentosos se realizó en un recipiente Erlen de 300 ml, que contiene 150 ml de medio de cultivo.

50 El medio consiste en 25 gr/l de molasas, 5 gr/l de de sacarosa, 5 gr/l de licor de maíz macerado y 5 gr/l de extracto de levadura y se esterilizó antes del cultivo con los conidios del hongo en cuestión.

El cultivo se incubó durante 6 días desde la siembra a una temperatura de aproximadamente 27°C.

55 A partir del tercer día, se tomaron muestras del medio de cultivo para determinar la masa seca (gr/l) y el número de propágulos (UFC/l). Para determinar la masa seca, se filtran 20 ml de medio de cultivo y después se secan en una estufa a una temperatura de 100 °C durante 24 horas. El número de propágulos se determinó en 1 ml de medio de cultivo.

En la tabla 3 se muestra un resumen de los resultados obtenidos, tal como sigue.

Tabla 3

Día	pH	Masa seca (gr/l)	UFC /l
0	5,07	0	0,00
3	4,87	1,58	$3,12 \times 10^7$
4	4,20	3,82	$1,40 \times 10^8$
5	6,46	6,76	$1,30 \times 10^9$
6	6,98	9,995	$3,65 \times 10^9$

EJEMPLO 2

- 5 El ensayo llevado a cabo en el Ejemplo 1 se repitió en un minireactor de 2 litros como se describe en el Ejemplo 2, que contiene 1,2 litros del medio de cultivo como en el Ejemplo 1. Las condiciones experimentales fueron las mismas que en el ejemplo 1, con la única diferencia que el muestreo se inició el día después de la siembra de los conidios.

En la tabla 1 se muestra un resumen de los resultados obtenidos, tal como sigue.

10

Tabla 1

Día	pH	Masa seca (gr/l)	UFC /l
0	5,07	0	0,00
1	5,04	2,675	$9,90 \times 10^7$
2	5,01	3,9	$3,00 \times 10^8$
3	5,44	5,125	$5,00 \times 10^8$
4	6,11	8,295	$8,20 \times 10^8$
5	6,69	2,75	$1,07 \times 10^9$
6	7,32	3,485	$2,10 \times 10^9$
7	7,65	10,164	$3,77 \times 10^9$

Los resultados que se muestran a partir del quinto día en adelante pueden parecer anómalos pero esto sólo es debido a una concentración excesiva de hongos en el medio de cultivo, lo que hace que no sea posible tomar más muestras homogéneas.

15

La última muestra se tomó directamente del reactor.

En este caso, en siete días, se obtuvieron más de 10 gramos de hongo por litro de medio de cultivo con un propágulo de $3,77 \times 10^9$.

20

EJEMPLO 7

- 25 El medio de cultivo del ejemplo 1 se modificó como sigue, de modo que se reduce el contenido de las dos fuentes de nitrógeno orgánico, que constituyen los componentes más caros:

25 gr/l molasses;

30 5 gr/l de sacarosa;

2,5 gr/l de licor de maíz macerado;

2,5 gr/l de extracto de levadura,

35

Con este medio de cultivo, se llevó a cabo un ensayo de cultivo (A), que utiliza los hongos mencionados anteriormente, para comparar con otras dos ensayos de cultivo (B y C), en los que se utilizó el mismo medio de cultivo y en el que se realizaron adiciones posteriores de una fuente de nitrógeno mineral desde el cuarto día hacia delante.

40

En el ensayo B, se añadieron tres veces 0,21 gr de fosfato de hidrógeno diamónico a partir del cuarto día (más específicamente el cuarto, sexto y octavo día), para conseguir una adición total de 0,63 gr, y en el ensayo C se añadieron tres veces 0,28 gr, de nuevo a partir del cuarto día (más específicamente el cuarto, sexto y octavo día),

para conseguir una adición total de 0,84 gr.

Los ensayos se realizaron en unos recipientes Erlen de 500 ml, que contienen 300 ml de medio de cultivo, esterilizado antes de la siembra de los conidios.

5

Al noveno y último día de cultivo, el contenido de nitrógeno total del medio de cultivo como (A) fue igual a 0,85 g/l mientras que en el medio al que se añadió fosfato hidrógeno diamónico (A y B) fue igual a 1,05 gr/l (A) y 1,26 gr/l (B), respectivamente.

10 A partir del tercer día en adelante, se recogieron muestras del medio de cultivo cada dos días para determinar la masa seca (gr/l) y el número de propágulos (UFC/l). Para determinar la masa seca, se filtran 20 ml de medio de cultivo y después se secan en una estufa a una temperatura de 100 °C durante 24 horas, El número de propágulos se determinó en 1 ml de medio de cultivo.

15 En la tabla 2 se muestra un resumen de los resultados obtenidos, tal como sigue.

Tabla 2

Día	A pH	A MS	A UFC	B pH	B MS	B UFC	C pH	C MS	C UFC
0	5,06	0,00	0,00	5,06	0,00	0,00	5,09	0,00	0,00
3	4,92	3,94	$5,50 \times 10^6$	4,80	2,84	$2,50 \times 10^4$	4,80	3,36	$2,50 \times 10^4$
5	5,12	3,44	$1,75 \times 10^8$	4,89	4,57	$4,73 \times 10^8$	5,30	3,48	$3,05 \times 10^8$
7	6,68	6,45	$1,58 \times 10^9$	5,47	8,32	$3,15 \times 10^9$	6,39	5,48	$4,00 \times 10^9$
9	7,14	8,63	$3,20 \times 10^9$	5,44	11,30	$7,25 \times 10^9$	5,86	7,86	$6,78 \times 10^9$

MS = Masa seca (gr/l).

20

UFC = propágulos /litro.

Tal como se puede observar en la tabla presentada anteriormente, la adición de una fuente de nitrógeno mineral, especialmente en pequeñas cantidades (ensayo B), permite un aumento considerable en la masa seca obtenido a

25 partir del séptimo día de cultivo y más del 100% de aumento en el número de propágulos obtenidos en el mismo periodo de cultivo.

REIVINDICACIONES

1. Medio de cultivo para hongos filamentosos que comprende 60-65% de molasas, 10-15% de sacarosa, 10-15% de licor de maíz macerado y 10-15% de extracto de levadura.
5
2. Medio de cultivo según la reivindicación 2, que comprende además del 5 al 8% de una fuente de nitrógeno mineral.
3. Medio de cultivo según la invención 2, en el que dicha fuente de nitrógeno mineral consiste en fosfato
10 de hidrógeno diamónico.
4. Procedimiento para la producción de hongos filamentosos, en particular hongos nematófagos, a escala industrial, que comprende la etapa de siembra de los conidios de dicho hongo en un medio de cultivo según la reivindicación 1 y el mantenimiento de dicho cultivo a una temperatura de 23-30 °C durante un periodo de 5 -10
15 días para determinar la reproducción y el crecimiento del hongo.