

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 101**

51 Int. Cl.:

**A01N 63/04** (2006.01)

**C12N 1/14** (2006.01)

**C05F 17/00** (2006.01)

**C05F 11/08** (2006.01)

**C12N 1/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2012 PCT/FR2012/052776**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2013 WO13079887**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2012 E 12816696 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2785187**

54 Título: **Procedimiento de multiplicación de microorganismos fitobeneficiosos**

30 Prioridad:  
**02.12.2011 FR 1161099**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.04.2017**

73 Titular/es:  
**FLORENTEISE (50.0%)  
Le Grand Patis  
44850 St Mars Du Desert, FR y  
NIXE (50.0%)**

72 Inventor/es:  
**COWPER, JÉRÔME, R. ;  
CANAGUIER, RENAUD, H. y  
REYNAUD, HÉLÈNE, L.**

74 Agente/Representante:  
**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 609 101 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

Procedimiento de multiplicación de microorganismos fitobeneficiosos

5 **Campo de la invención**

La presente invención está relacionada con el campo de soportes de cultivo. Más particularmente, la invención está relacionada con un procedimiento de multiplicación de microorganismos fitobeneficiosos, particularmente microorganismos fúngicos.

10

**Tecnología de la técnica anterior**

El enriquecimiento de terrenos industriales con flora microbiana útil presenta un interés, bien para sanear los sustratos de cultivo de plantas, o para mejorar la fertilidad.

15

Diferentes microorganismos y bacterias se utilizan como agentes de biocontrol de plantas.

Los microorganismos que favorecen el crecimiento de las plantas se denominan PGPM (del inglés « plant growth promoting micro-organisms »). Los hongos micorrizógenos simbióticos y determinadas especies de *Trichoderma* mutualistas con las plantas, forman parte de esta categoría. Las bacterias promotoras del crecimiento y específicas de la rizosfera se denominan PGPR (del inglés « plant growth promoting rhizobacteria »). Esta categoría comprende, por ejemplo, las *Pseudomonas* y los *Bacillus* útiles.

20

El género *Trichoderma* es un grupo agrónomicamente importante ya que comprende agentes fúngicos de biocontrol cuyo modo de acción ha sido objeto de numerosas investigaciones. Estudios recientes mencionan una capacidad de este hongo filamentoso para intervenir de acuerdo con diversos mecanismos: micoparasitismo, antagonismo (competición), antibiosis (producción de antibióticos), estimulación radicular, estimulación del crecimiento por solubilización de minerales fertilizantes, estimulación de defensas naturales de las plantas.

25

Los hongos del género *Trichoderma* pertenecen al filo *Ascomycota*, a la clase *Ascomycetes*, a la familia *Hypocreales*. Son los hongos microscópicos donde existen especies terrestres y especies marinas. Se encuentran en los bosques en descomposición, en los residuos vegetales y en todos los suelos (humus forestales, terrenos agrícolas) (de 10 a 10.000 propágulos/g en los suelos templados o tropicales). Colonizan las raíces de plantas herbáceas y leñosas sin ningún perjuicio. Además, este hongo puede penetrar en las raíces y favorecer el desarrollo, la nutrición y la resistencia a las enfermedades. La especie *atroviride* es una de las especies corrientes de *Trichoderma*.

30

35

La colonización de las raíces por *Trichoderma sp.* puede aumentar el crecimiento y el desarrollo de las raíces, el rendimiento de los cultivos, la resistencia al estrés abiótico y la absorción y la utilización de nutrientes (Harman G.E. *et al.*, Nature Reviews / Microbiology, 2, 43-56, 2004).

40

Cuando existen, los efectos de estimulación del crecimiento provienen de la acción directa de los *Trichoderma* sobre las plantas y no están directamente relacionados con antagonismos con los patógenos. Estos efectos son visibles en sustratos de cultivo tanto no desinfectados como estériles. Los mecanismos de estimulación del crecimiento no se conocen bien y podrían deberse a la supresión de daños oxidativos sobre las raíces, a la secreción de factores de crecimiento por el hongo, a la inhibición de la microflora inoportuna y a la mejora del transporte de los micronutrientes.

45

Los efectos son distintos de una cepa a otra. Determinadas cepas poseen efectos estimuladores del crecimiento pero otras tienen efectos inhibidores (por ejemplo, *Trichoderma viridae* RF1, J.G. Menzies, Plant Pathology, 42, 784-791, 1993).

50

Las propiedades antagonistas de los *Trichoderma* están mejor documentadas que las propiedades estimuladoras. El potencial antagonista de los *Trichoderma* con respecto a los numerosos hongos fitopatógenos del suelo se ha descubierto en 1930 (Weindling R., *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi, Phytopathology, 22, 837-845, 1932). La aplicación más obvia es la lucha biológica en la agricultura (biocontrol), la comprendida en la agricultura biológica donde la norma (CE) n° 2092/91 prevé esta utilización.

55

De una manera general, existen dos maneras de enriquecer un medio con microorganismos:

60

- Por dilución en el medio de una cantidad suficiente de microorganismos a partir de una preparación concentrada;
- o
- Por inoculación del medio y multiplicación *in situ* de microorganismos.

65

La primera técnica requiere una producción de microorganismos en un sistema separado. Se aplica bien a los microorganismos que poseen formas de resistencia estables (por ejemplo esporas, conidios o clamidoesporas). La

técnica consiste en diluir el microorganismo obtenido por separado en un medio que debe ser compatible y que puede ser susceptible de ayudar a su regeneración cuando aparece una condición favorable (por ejemplo, hidratación, calentamiento del medio). Dicha técnica se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente US 2004/0136964A1. Este documento se refiere a un sustrato que contiene una cepa de *Trichoderma asperellum* para el control biológico de *Fusarium* y de *Rhizoctonia*, obteniéndose dicho sustrato de una mezcla constituida por desechos, aguas residuales de depuración, turba, corteza o compostaje.

La segunda técnica se aplica a microorganismos que pueden multiplicarse en el medio hasta el agotamiento de los recursos nutritivos o la degradación de las condiciones vitales, para dar lugar a formas latentes, denominadas de resistencia. Las formas de resistencia que pueden regenerar los microorganismos entran en la categoría de propágulos. Esta segunda técnica permite obtener un medio rico en propágulos estables. El agotamiento de materias fácilmente fermentables hace que el medio sea poco propicio para el desarrollo de otros microorganismos. El enriquecimiento por la multiplicación *in situ* puede aplicarse a bacterias, a levaduras y a hongos, que pueden vivir en los medios a base de fibra de madera. La multiplicación también se refiere a la categoría de hongos micorrizógenos que también son saprófitos. La multiplicación también puede concernir a los hongos micorrizógenos simbióticos de plantas a condición de cultivarlos en las raíces huéspedes.

Contrariamente a la técnica por dilución, la multiplicación *in situ* no requiere grandes cantidades de microorganismos producidos en condiciones estériles. La multiplicación se obtiene gracias al consumo de sustancias nutritivas contenidas en el sustrato o añadidas al mismo. La multiplicación es, en principio, aerobia. El medio se considera como «activo» cuando se añaden sustancias nutritivas específicas para favorecer la multiplicación. Las sustancias nutritivas específicas añadidas al medio «activo», se consumen parcial o totalmente al final de la fase de multiplicación. Esto se traduce en una pérdida de masa y de producción de metabolitos volátiles, en particular de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y de agua (H<sub>2</sub>O).

La técnica de multiplicación *in situ* comprende una fase de preparación de medio, con una desinfección, si fuera necesaria, la adición de una cantidad suficiente de inóculo primario de microorganismos, el periodo de multiplicación de los microorganismos, la aparición de formas de resistencia y la maduración. Cada etapa posee una duración variable en función de las condiciones y de los microorganismos empleados. La multiplicación puede realizarse por ciclos sucesivos de enriquecimiento, sirviendo el producto de un ciclo de multiplicación para inocular una cantidad más considerable de medio. Ciclo tras ciclo, los medios de multiplicación sucesivos pueden volverse cada vez más sencillos y las condiciones de multiplicación cada vez menos severas. Esto permite obtener un buen rendimiento sin utilizar técnicas de producción laboriosas. La técnica por etapa mejora el rendimiento en biomasa y reduce la pérdida de sustrato consumido por el desarrollo de los microorganismos.

La multiplicación *in situ* también permite reducir los microorganismos inoportunos durante la producción del terreno gracias a la instauración de una competición. Los propágulos obtenidos por la técnica de multiplicación son más estables que los microorganismos añadidos posteriormente en la fabricación del terreno. El terreno obtenido por el proceso de multiplicación puede contener metabolitos secundarios liberados durante la fermentación. Los metabolitos secundarios de determinadas especies de hongos (*Trichoderma*) y bacterias (*Pseudomonas*) son útiles para las plantas, bien porque sanean y desintoxican los sustratos, bien porque estimulan el crecimiento.

En la práctica, los microorganismos útiles para las plantas viven en la rizosfera o inmediatamente cerca de la rizosfera y se benefician para su nutrición de exudados radiculares y de restos vegetales. Determinados microorganismos, tales como los *Trichoderma*, viven de manera saprófita en el suelo o en la superficie, sobre restos de vegetales muertos.

Diferentes clases de fibras favorecen el crecimiento de microorganismos; particularmente puede citarse la fibra de madera, la fibra de palma y las diferentes fibras vegetales utilizadas en las aplicaciones agrícolas, textiles o de aislamiento. Estos materiales aireados y fibrosos, de origen vegetal, en forma de virutas, láminas o pajas, son también adecuados.

Las solicitudes de patente EP-A-0 147 349 y FR-A-2 776 470 describen un medio de cultivo a base de fibras de madera obtenidas por cocción al vapor y desfibrado, de acuerdo con procedimientos encontrados también en la industria papelera y en la industria de paneles de madera aglomerados. Como se indica en la solicitud de patente FR-A-2 776 470, el desfibrador se realiza de manera convencional usando un desfibrilador de discos, a partir de virutas de madera de las que se "extraen" las fibras por cizalla a temperatura elevada.

Sin embargo, la Solicitante ha constatado, después de numerosos ensayos, que los procedimientos descritos en los documentos anteriormente citados tenían tendencia a provocar una cocción de la madera que correspondía a un inicio de torrefacción o a una termo estabilización, que tenía como consecuencia una reducción de la hidrofilia y de la capacidad de retención de agua de las fibras de madera producidas. Estos inconvenientes hacen que las fibras de madera sean poco propicias para una multiplicación adecuada de los microorganismos.

Es por tanto adecuado poder disponer de fibras de madera que puedan favorecer la multiplicación de microorganismos, particularmente del género *Trichoderma*, que no tengan los inconvenientes mencionados

anteriormente.

También es deseable poder disponer de un medio de cultivo que esté adaptado para la multiplicación de dichos microorganismos y que permita la obtención de un soporte de cultivo apropiado para el cultivo de las plantas.

5

### Descripción de la invención

Ahora se ha descubierto, y es el fundamento de la invención, que es posible multiplicar microorganismos del género *Trichoderma* usando un medio de cultivo particular que contiene fibras de madera para preparar un soporte de cultivo de plantas.

10

De este modo, la invención concierne, según un primer aspecto, a un procedimiento de multiplicación *in situ* de microorganismos del género *Trichoderma* que comprende etapas de desinfección, de multiplicación y de amplificación por etapas:

15

- la desinfección de la fibra de madera durante su fabricación proporciona inmediatamente un sustrato propicio para el cultivo de *Trichoderma*, en una sola etapa. Se puede hacer que *Trichoderma* crezca sobre virutas de madera, pero se requiere una esterilización después de la fabricación de las virutas. En el caso de la fibra, la fabricación y la esterilización son simultáneas;
- la multiplicación *in situ* del hongo *Trichoderma* permite inocular el soporte de cultivo de las plantas en microorganismos útiles y limitar la cantidad de contaminantes. La multiplicación *in situ* permite aportar solo una pequeña cantidad de microorganismos con respecto a la que estará contenida en el producto acabado. Los microorganismos se multiplican espontáneamente gracias al consumo particular del soporte de cultivo;
- la ampliación del hongo *Trichoderma* por etapas sucesivas evita la desinfección de masas importantes de materia. Las condiciones de multiplicación son cada vez menos severas a lo largo de las etapas. Este método difiere de la inoculación en peso de la totalidad del soporte del cultivo de plantas.

20

25

De acuerdo con un modo de realización de la invención, el procedimiento comprende:

30

- la siembra, con una suspensión madre de propágulos de *Trichoderma*, de un medio de cultivo esterilizado que contiene entre aproximadamente 25 % y aproximadamente 50 % en peso de fibras de madera, así como sustancias nutritivas, agua y un modificador de pH, teniendo dichas fibras un contenido de aire por volumen comprendido en el intervalo que varía de aproximadamente 55 % a aproximadamente 90 %, estando dicho medio libre de contaminantes fúngicos y teniendo un contenido de contaminantes bacterianos inferior o igual a  $10^2$  UFC/g;
- el cultivo del medio de cultivo sembrado para obtener un inóculo primario en el que el factor de multiplicación de los propágulos alcanza  $2 \cdot 10^4$  a  $10^5$ .

35

Es particularmente importante suprimir los contaminantes fúngicos del medio de cultivo y reducir la cantidad de bacterias por debajo de  $10^2$  UFC/g. La eliminación de los *Aspergillus* y de los *Trichoderma* autóctonos es en particular necesaria ya que determinadas cepas de estos hongos pueden competir con los microorganismos inoculados. El medio desinfectado es particularmente propicio para la inoculación y el desarrollo de microorganismos útiles. Los microorganismos inoculados no encuentran organismos competidores y pueden desarrollarse libre y rápidamente. Preferentemente, el medio de cultivo se esteriliza en autoclave en las condiciones habituales (121 °C, aproximadamente 30 min) antes de inocularse y después incubarse.

40

45

De manera ventajosa, la concentración final de propágulos del inóculo primario se encuentra en el intervalo de aproximadamente  $10^8$  a aproximadamente  $10^{10}$  propágulos/g.

50

De manera igualmente ventajosa, el cultivo de *Trichoderma* comprende un periodo de incubación de al menos dos semanas.

De acuerdo con otro modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende adicionalmente:

55

- la preparación de un segundo medio de cultivo que contiene fibras de madera desinfectadas, particularmente con calor, teniendo dichas fibras de madera un contenido de aire por volumen comprendido en el intervalo que varía de aproximadamente 55 % a aproximadamente 90 %;
- la inoculación de dicho medio de cultivo con 0,001 % a 5 % en peso del inóculo primario;
- el cultivo del medio de cultivo así inoculado para obtener un inóculo secundario en el que el factor de multiplicación de los propágulos alcanza de  $10^3$  a  $10^5$ . De manera ventajosa, la concentración final de propágulos en el inóculo secundario está en el intervalo de aproximadamente  $10^7$  a  $10^9$  propágulos/g.

60

La invención también concierne, en un segundo aspecto, a un procedimiento de preparación de un inóculo secundario de *Trichoderma* que comprende:

65

- la preparación de un medio de cultivo que contiene fibras de madera desinfectadas, particularmente por calor,

teniendo dichas fibras de madera un contenido de aire por volumen comprendido en el intervalo de aproximadamente 55 % a aproximadamente 90 %;

- la inoculación de dicho medio de cultivo con 0,001 % a 5 % de un inóculo primario *Trichoderma*, que puede obtenerse como se describe anteriormente, cuya concentración de propágulos está en el intervalo que varía de  $10^8$  a  $10^{10}$  propágulos/g;
- el cultivo del medio de cultivo así inoculado para obtener un inóculo secundario cuya concentración final de propágulos está en el intervalo que varía de aproximadamente  $10^7$  a aproximadamente  $10^9$  propágulos/g.

De manera ventajosa, el cultivo del medio inoculado con el inóculo primario comprende un periodo de incubación de al menos dos semanas.

Preferentemente, el medio de cultivo utilizado para la preparación del inóculo primario y el utilizado para la preparación del inóculo secundario, comprenden, cada uno de ellos, fibras de madera que tienen un contenido de aire por volumen comprendido en el intervalo que varía de aproximadamente 60 % a aproximadamente 85 %, preferentemente de aproximadamente 70 % a aproximadamente 85 %.

De manera ventajosa, las fibras de madera contenidas en los diferentes medios de cultivo mencionados anteriormente se obtienen por extrusión de virutas de madera, en particular de astillas de madera, en una extrusora, preferentemente una extrusora de doble tornillo. En un modo de realización de la invención las virutas de madera se extruyen en presencia de salvado de trigo.

De manera totalmente ventajosa, la cepa de *Trichoderma* que se pretende multiplicar es la cepa *Trichoderma atroviride* MUCL45632.

En el presente documento también se describe un medio de cultivo tal como el definido anteriormente en referencia al primer o segundo aspecto de la invención.

#### Condiciones de producción de *Trichoderma*

El medio de cultivo está constituido por materias fermentables, más particularmente, glúcidos, lípidos y proteínas. Se requieren minerales, tales como fósforo, potasio, magnesio y azufre. También existen determinados factores que favorecen el crecimiento y la esporulación. El calcio, el cobalto, el hierro, el manganeso y el cinc (Mandels y Reese, 1957) se citan como elementos favorables para el crecimiento y la producción de celulasa por *Trichoderma viride*.

Parece que los hongos *Trichoderma* se desarrollan en medios ácidos. La acidificación vuelve al medio de cultivo selectivo para *Trichoderma* inhibiendo el crecimiento de las bacterias. En estas condiciones, la adición de un modificador de pH en el medio es ventajosa; la modificación puede ser del orden de 0,01 a aproximadamente 6 unidades de pH.

La patente GB1573850 describe la producción de *Trichoderma* por cultivo en cereales acidificados a un pH < 4,5 y enriquecidos en cobre, en bolsas de plástico herméticas que se llenan periódicamente con aire y su atmósfera se vacía. También describe el fraccionamiento periódico de lechos de cultivo para favorecer la homogeneidad del medio.

La solicitud de patente EP-A-1 876 232, que concierne en particular a la cepa de *Trichoderma atroviride* MUCL45632, describe un medio de cultivo apropiado para la producción de propágulos de este hongo: « el medio de cultivo está esencialmente constituido por un sustrato de origen vegetal rico en poliholósidos tales como almidón, hemicelulosa y celulosa. Este sustrato podrá estar constituido, de manera no limitativa, por granos de cereales (cebada, avena) o de leguminosas (soja, altramuz, haba), por subproductos de la industria de cereales (salvado de cereales, germen de trigo, cáscaras de arroz), por tortas de extracción de plantas oleaginosas (girasol, algodón), por desechos de la industria del azúcar y de la industria del almidón (pulpa de remolacha, bagazo de caña de azúcar), por pajas o virutas de madera. El sustrato vegetal debe triturarse toscamente para formar una masa permeable al agua y al aire. El medio podrá complementarse con elementos minerales útiles para el crecimiento del hongo: nitrato, amoniaco, ortofosfato, potasio, magnesio, calcio y oligoelementos. El pH estará ventajosamente acidificado utilizando un ácido preferentemente mineral, como el ácido clorhídrico, el ácido sulfúrico o el ácido ortofosfórico, entre pH 2,7 y pH 4 y preferentemente entre 2,7 y 3,3 ». Estas condiciones convienen de una manera general a otros *Trichoderma*, pero el experto en la materia adaptará, si fuera necesario, las condiciones del cultivo para obtener un rendimiento óptimo de propágulos.

El cultivo de *Trichoderma* puede realizarse en diferentes recipientes: bolsas, frascos, cajas o tanques, en materiales adecuados, tales como acero inoxidable, vidrio y materiales plásticos. La madera también es adecuada, pero puede ser atacada por los *Trichoderma* y puede alterarse debido a la humedad.

La temperatura del cultivo de los *Trichoderma* depende de las cepas. La mayoría de los *Trichoderma* brotan a partir de 12 °C y hasta 35 °C. Las temperaturas óptimas de crecimiento están en el intervalo de 20 a 28 °C. El consumo de glúcidos por los hongos provoca un calentamiento del medio (17 kJ/g de glúcido oxidado). Este calentamiento debe

ser limitado, ya que por encima de 36 °C, los hongos de *Trichoderma* comienzan a morir. El calentamiento puede controlarse de diferentes maneras:

- 5 • Limitando la cantidad de glúcidos fácilmente oxidables. Esto puede hacerse controlando la cantidad de azúcares simples introducidos en la carga, o utilizando glúcidos complejos, denominados también fibras, que requieren una sucesión de hidrólisis enzimáticas antes de estar disponibles para la oxidación. El almidón ( $\alpha$ -glucano) que se hidroliza rápidamente se considera prácticamente como un azúcar simple. La celulosa de la madera ( $\beta$ -glucano) es un azúcar complejo que se oxida lentamente.
- 10 • Controlando la atmósfera alrededor del medio de cultivo. La reducción del oxígeno y el aumento de la tasa de dióxido de carbono limitan la actividad metabólica de los hongos. Esto puede obtenerse colocando el medio de cultivo en un recinto cerrado y ralentizando los intercambios gaseosos de este recinto con el aire exterior.
- 15 • Controlando la cantidad de agua inicial y la evaporación de agua durante el cultivo. La evaporación de agua es uno de los métodos de disminución de la temperatura de un medio de cultivo. La evaporación es tan intensa como débil es la presión parcial del agua en la atmósfera (higrometría). La reducción de presión parcial se consigue, en particular, aumentando los cambios gaseosos con el aire exterior, en contra con el principio de limitación de los cambios gaseosos expuestos en líneas anteriores.
- 20 • Favoreciendo los intercambios de temperatura maximizando la superficie de los lechos de cultivo en detrimento del volumen, es decir, por ejemplo, utilizando recipientes con forma plana, tales como bolsas o colchones planos.
- Enfriando la atmósfera o el medio de cultivo.

Los hongos consumen oxígeno durante su crecimiento (747 l O<sub>2</sub> / kg de glúcidos oxidados). La oxigenación es esencial, pero puede limitarse a lo estrictamente necesaria para obtener un crecimiento regular. El aire es un vector de contaminantes y es por tanto necesario ventilar con un aire purificado o colocar sistemas que limiten la propagación de contaminantes por vía aérea.

#### 25 Fibras de madera

Las fibras de madera utilizadas en el ámbito de la presente invención son voluminosas y están ventiladas, lo que permite la buena respiración de los microorganismos mediante el interior de la materia; las fibras poseen un contenido de aire por volumen comprendido en el intervalo que varía de aproximadamente 55 % a aproximadamente 90 %, preferentemente en el intervalo que varía de aproximadamente 60 % a aproximadamente 85 %, preferentemente incluso en el intervalo que varía de aproximadamente 70 % a aproximadamente 85 %. Estas fibras de madera se obtienen ventajosamente por extrusión de virutas de madera, particularmente astillas de madera tales como astillas de árboles resiníferos de calidad papelera obtenidas de la albura de la madera. La extrusión se realiza usando una extrusora de doble tornillo. Las fibras de madera obtenidas poseen las siguientes características fisicoquímicas:

- 35 - una densidad aparente seca comprendida en el intervalo que varía de aproximadamente 30 a aproximadamente 100 kg/m<sup>3</sup>, preferentemente en el intervalo que varía de aproximadamente 40 a aproximadamente 100 kg/m<sup>3</sup>, preferentemente incluso en el intervalo que varía de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 kg/m<sup>3</sup>;
- 40 - una porosidad comprendida en el intervalo que varía de aproximadamente 88 a aproximadamente 98 % por volumen;
- una retención de aire comprendida en el intervalo que varía de aproximadamente 55 a aproximadamente 80 %, preferentemente en el intervalo que varía de aproximadamente 55 a aproximadamente 70 % por volumen;
- 45 - una retención en agua comprendida en el intervalo que varía de aproximadamente 18 a aproximadamente 33 %, preferentemente en el intervalo que varía de aproximadamente 23 a aproximadamente 33 % por volumen;
- una conductividad eléctrica inferior o igual a aproximadamente 0,5 mS/cm, preferentemente en el intervalo que varía de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5 mS/cm, preferentemente incluso en el intervalo que varía de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,5 mS/cm.

50 Las fibras de madera utilizadas en el ámbito de la presente invención pueden obtenerse por el procedimiento descrito en la solicitud de patente FR 11 58555 depositada el 26 de septiembre de 2011 y que se describe más adelante en el presente documento en referencia a las Figuras 1 a 3 adjuntas:

- 55 - La Figura 1 es una vista esquemática superior de una instalación de desfibrado que permite la realización de dicho procedimiento, en la cual la pared del cilindro está seccionada;
- La Figura 2 es una vista esquemática que corresponde a una vista de la instalación de la Figura 1 en sección en el plano II-II de la Figura 1, omitiéndose las partes del tornillo 14 presentes en este plano;
- La Figura 3 es una sección según la línea III-III de la Figura 1.

60 De acuerdo con este procedimiento, se introducen virutas de madera (16) en un cilindro desfibrador (10) que contiene dos tornillos paralelos (12, 14) accionados por rotación para engranarse entre sí mediante sus roscas (12B, 14B) respectivas, presentando dichas roscas sucesivamente, en el sentido (S) desde aguas arriba a aguas abajo, al menos una serie aguas arriba y una serie aguas abajo de secciones (SM, SI, SA) comprendiendo cada una de ellas, una zona aguas arriba de accionamiento (SME, SIE, SAE) en la que las virutas se accionan hacia aguas abajo, y una zona aguas abajo de desaceleración (SMF, SIF, SAF) a través de la cual las virutas se impulsan bajo el efecto del accionamiento proporcionado por la zona de aguas arriba, desacelerándose las virutas así accionadas en el

## ES 2 609 101 T3

5 cilindro (10) en las zonas de desaceleración y transformándose en fibras (24) que se recuperan a la salida del cilindro desfibrador (10), estando comprendido el tiempo de residencia de las virutas en el cilindro (10) entre 15 y 80 segundos, garantizándose una presión al menos sensiblemente igual a 9,0 MPa (90 bares) aguas arriba de la zona de desaceleración aguas abajo (SMF) de la serie aguas arriba (SM), de tal manera que en el cilindro (10) se alcance una temperatura comprendida entre 120 °C y 150 °C sin aporte de calor externo.

En un modo de realización de este procedimiento, el tiempo de residencia de las virutas en el cilindro (10) está comprendido entre 25 y 60 segundos.

10 En otro modo de realización de este procedimiento, se hacen girar los tornillos (12, 14) a una velocidad comprendida entre 250 y 400 vueltas por minuto, preferentemente entre 300 y 380 vueltas por minuto. Esta velocidad de giro parece ser bastante elevada para garantizar un desfibrado eficaz de las virutas. La longitud de los tornillos y la carga en el cilindro de las virutas de madera pueden por tanto determinarse para garantizar el tiempo de residencia deseado de las fibras en el cilindro. Por ejemplo, se seleccionarán tornillos cuya longitud esté comprendida entre  
15 1.600 mm y 3.000 mm. Si la longitud del tornillo supera los 2.000 o 2.300 mm, es ventajoso prever que contengan, además de series aguas arriba y aguas abajo de secciones, una serie intermedia, que también tenga una zona aguas arriba de accionamiento y una zona aguas abajo de desaceleración.

20 En otro modo de realización de este procedimiento, en las zonas aguas arriba de accionamiento (SME, SIE, SAE), las virutas se ponen en contacto con roscas de paso directo, mientras que, en las zonas aguas abajo de desaceleración (SMF, SIF, SAF), las virutas se ponen en contacto con roscas de paso inverso.

25 En otro modo de realización de este procedimiento, en las zonas aguas arriba de desaceleración (SMF, SIF, SAF), las virutas se hacen pasar a través de muescas (12C, 14C) que presentan las roscas (12B, 14B).

30 En otro modo de realización de este procedimiento, cada rosca de paso inverso de la zona aguas arriba de desaceleración (SAF) de la serie aguas arriba (SA) comprende de 2 a 6 muescas y la relación  $R_{sd}$  entre el caudal de las fibras que salen y la suma de las secciones de las muescas de una rosca de este tipo, está comprendida entre 60 y 80  $\text{mm}^2/\text{m}^3$ , preferentemente entre 70 y 75  $\text{mm}^2/\text{m}^3\text{h}^{-1}$ .

35 De este modo, determinándose las muescas como se indica anteriormente, la alimentación de virutas en el cilindro que determina la carga de las virutas en el cilindro, se realiza de tal manera que la relación entre la suma de las secciones de las muescas de una rosca y el caudal de las fibras que salen, esté en el intervalo indicado anteriormente. En estas condiciones, se obtiene de manera sencilla una presión de al menos 9,0 MPa (90 bares), sin necesitar una estructura de cilindro complejo. El caudal de fibras que salen se determina midiendo, según la norma NF EN 12580, el volumen de las fibras recogidas a la salida del cilindro expresado en  $\text{m}^3$ , en una hora.

40 La instalación representada en las figuras comprende un cilindro 10 en el que se disponen dos tornillos 12, 14 accionados entre sí. En efecto, el entreje e entre los dos tornillos es inferior al diámetro exterior de sus roscas. Los árboles 12A y 14A de los tornillos 12 y 14 están accionados por rotación mediante un motor M y se mantienen por rotación mediante cojinetes, tales como los cojinetes 15.

45 Como se observa mejor en la Figura 3, la pared externa del cilindro tiene forma de dos partes de cilindros secantes adaptados, cada uno de ellos, al diámetro de los tornillos a12 y 14. El cilindro presenta, preferentemente en toda su longitud, una tapa que se abre formando una de sus paredes longitudinales para permitir su mantenimiento y su limpieza, si fuera necesario.

50 Los virutas o astillas 16 que deben estar desfibradas, es decir reducidas a fibras, se cargan en el cilindro a través de una alimentación 20, que sitúa en el extremo aguas arriba 10A del cilindro y que tiene, por ejemplo, la forma de una tolva situada en la cara superior del cilindro, en la cual las virutas se reconducen por cualquier medio apropiado, por ejemplo, mediante una cinta transportadora de tornillo, no representada.

55 En su extremo aguas abajo 10B, el cilindro presenta una salida 22. Se trata, por ejemplo, de un canal situado en la cara inferior del cilindro y que deja caer las fibras 24 por gravedad a una cinta de banda transportadora 26. Esta cinta transportadora puede estar dotada de un túnel (no representado), aireado con un gas, tal como aire, preferentemente filtrado, para enfriar progresivamente las fibras durante su transporte.

60 La abertura de la pared del cilindro formada en la alimentación 20 es ventajosamente simétrica con respecto al plano vertical medio entre los ejes 12A y 12B de los tornillos para garantizar la buena distribución de las virutas sobre los dos tornillos desde su entrada en el cilindro. Incluso, la abertura formada en la salida 22 del cilindro es ventajosamente simétrica con respecto al mismo plano vertical.

Debido a la rotación de los tornillos, las virutas se accionan en el sentido S que va de aguas arriba a aguas abajo.

65 En la pared inferior del cilindro se disponen uno o más filtros de extracción 28 que sirven para la extracción de los jugos que provienen del desfibrado o de las aguas de lavado de las virutas, permitiendo así regular la humedad final

## ES 2 609 101 T3

del producto. Por ejemplo, estos filtros se colocan en el extremo entre las zonas de desaceleración que se describirán a continuación.

5 Los dos tornillos 12 y 14 giran en el mismo sentido R y a la misma velocidad de giro. En efecto, en cada sección de tornillos enfrentados, las roscas de dos tornillos van en el mismo sentido.

10 Para cada tornillo, las roscas presentan una serie aguas arriba SM y una serie aguas abajo SA de secciones. En esta caso, las roscas presentan además una serie intermedia SI situada entre la serie aguas arriba SM y aguas abajo SA. De este modo, las series SM, SI y SA, se disponen sucesivamente desde aguas arriba hacia aguas abajo del cilindro.

15 Cada una de estas series comprende en sí misma una zona aguas arriba de accionamiento, respectivamente SME, SIE y SAE para las series aguas arriba, intermedias y aguas abajo, así como una zona aguas abajo de desaceleración, respectivamente SMF, SIF y SAF para las series aguas arriba, intermedias y aguas abajo. Estas zonas de accionamiento y de desaceleración se clasifican respectivamente aguas arriba y aguas abajo ya que, para cada serie, la zona de accionamiento está aguas arriba de la zona de desaceleración en el sentido S de avance de las virutas durante el desfibrado.

20 Se observa que, en las zonas de accionamiento SME, SIE y SAE, las roscas 12B y 14B de los tornillos 12 y 14, son de paso directo. Esto significa que, debido al giro de los tornillos en el sentido R, estas roscas hacen avanzar de manera natural aguas arriba el material que está situado entre ellas. En cambio, en las zonas de desaceleración SMF, SIF y SAF, las roscas 12B y 14B son de paso inverso, es decir, que el giro de los tornillos en el sentido R tienen a hacer retroceder aguas arriba el material que está situado entre ellas.

25 Como resultado, para cada serie, durante el desfibrado el material tiene tendencia a aglutinarse en la interfaz entre la zona de accionamiento y la zona de desaceleración. Sin embargo, para permitir el transporte del material aguas arriba a través de cada zona de desaceleración, las roscas de las zonas de desaceleración presentan interrupciones o muescas 12C, 14C. De este modo, estas muescas forman zonas de estrangulamiento a través de las cuales se obliga a pasar el material, bajo el efecto del empuje ejercido, aguas arriba, por el material accionado aguas abajo por la zona de accionamiento aguas arriba.

30 Las muescas se observan mejor en la Figura 3 que es un corte vertical tomado inmediatamente aguas arriba de una zona de desaceleración (en este caso, la zona de desaceleración de la serie aguas arriba SM) y muestra la organización de una zona de desaceleración. En este caso, para la zona de desaceleración de cada uno de los dos tornillos 12 y 14, cada rosca comprende 5 muescas idénticas, respectivamente 12C y 14C distribuidas regularmente de manera angular.

35 Los ejes geométricos de los tornillos representados con las referencias 12A y 14A son los ejes de giro de sus árboles portadores, 12P y 14P respectivamente. Las secciones de los tornillos, siendo ventajosamente desmontables, sus roscas son llevadas por manguitos, respectivamente 12M y 14M, que se montan sobre los árboles portadores y están unidas por rotación por cualquier medio apropiado, por ejemplo acanaladuras axiales (no representadas).

40 Para cada rosca, las muescas están delimitadas radialmente entre la periferia radial externa de la rosca y su periferia radial interna, delimitada por la superficie exterior del manguito, respectivamente 12M y 14M. Por ejemplo, el diámetro externo de cada tornillo, delimitado por la periferia radial externa de su rosca, es de 240 mm, la altura radial h de una muesca es de 44 mm y la anchura de una muesca es de 16 mm. De este modo, para una rosca, es decir siguiendo una rosca del tornillo sobre un ángulo de 360°, se obtiene una suma de secciones de muescas de esta rosca de  $5 \times 44 \times 16 = 3520 \text{ mm}^2$ .

45 Ventajosamente, en una zona de desaceleración del tornillo 12 o 14, las muescas 12C o 14C de dos roscas consecutivas del mismo tornillo están ligeramente desplazadas de manera angular. Para ilustrar esta característica en la Figura 3, las muescas de las roscas que están situadas en primer lugar a partir del plano de corte, se han representado con líneas gruesas, mientras que las muescas que equipan las roscas situadas inmediatamente aguas arriba de estas primeras roscas se han representado en líneas finas. En este caso, el desplazamiento angular es del orden de 10 a 20 grados y está orientado en el sentido de rotación R de los tornillos, de manera que una línea que une dos muescas correspondientes de dos roscas adyacentes está orientada en el mismo sentido que las roscas de paso directo.

50 La alimentación de la instalación se realiza en modo continuo y el caudal de alimentación se ajusta para cumplir con los parámetros de presión y de temperatura citados anteriormente.

55 De este modo, la instalación comprende ventajosamente al menos un sensor de temperatura CT situado aguas arriba de la zona aguas debajo de desaceleración SMF de la serie aguas arriba (en la región del plano de corte III-III). Puede establecerse una tabla de correspondencia entre la temperatura y la presión. De este modo, un aumento de la temperatura revelado por el sensor de temperatura CT puede revelar un riesgo de aumento de presión muy

importante. En este caso, la instalación puede regularse disminuyendo el caudal de alimentación de las virutas de madera. También puede preverse una medida directa de la presión usando un sensor de presión CP situado en la misma región que el sensor de temperatura CT. Las medidas de esos sensores (al menos la del sensor de temperatura CT) pueden proporcionarse en la entrada de un microprocesador que proporciona un control al sistema de alimentación en virutas de madera, por ejemplo, un tornillo sin fin, como se indica anteriormente. Si no se dispone de ninguna medida directa de presión, el microprocesador puede disponer, en la memoria, de una tabla de correspondencia de temperatura/presión. Si se efectúa una medida directa de la presión, el microprocesador puede controlar el sistema de alimentación en virutas de madera en función de los datos de temperatura/presión que le son proporcionados. Para una variedad de madera determinada y una humedad conocida, puede establecerse una relación, por un lado entre los parámetros de presión y de temperatura y, por otro lado, la potencia eléctrica consumida por el motor que acciona el tornillo por rotación (o la intensidad eléctrica liberada, sin la tensión eléctrica es constante, como suele ser lo habitual). Esta relación puede determinarse de manera empírica mediante ensayos. Conociéndose esta relación, se pueden obtener los parámetros de presión y de temperatura deseados ajustando la alimentación de las virutas de madera de manera que se consuma una potencia diana.

Un aspecto esencial del procedimiento de enriquecimiento por multiplicación sobre fibra de madera es la necesidad de enfriar la fibra de madera después de su fabricación. El enfriamiento debe efectuarse en condiciones que preserven la propiedad microbiana inicial.

La madera que pasa a través de las extrusoras de tornillo o en las desfibradoras de vapor se calienta a temperaturas que pueden alcanzar los 150 °C. A la salida de las máquinas, la expansión y la evaporación del agua disminuyen la temperatura. Las medidas indican temperaturas de 50 a 80 °C a la salida de las máquinas. La temperatura óptima de incorporación de los microorganismos depende de las especies utilizadas. Determinadas bacterias termófilas soportan sin dificultad temperaturas de 50 a 60 °C, sin alteración de la capacidad de multiplicación. Esto se observa con bacterias tales como *Bacillus* y *Paenibacillus*. Para los otros microorganismos, temperaturas superiores a 45 °C son críticas para la supervivencia de las formas de resistencia.

La inoculación de un sustrato que contiene fibras de madera solo puede realizarse habiendo disminuido su temperatura por debajo de la temperatura límite de crecimiento de los microorganismos inoculados. Para los *Trichoderma*, en general, el límite se encuentra a 37 °C.

El enfriamiento de la fibra de madera requiere, o un paso en un flujo de aire filtrado frío, o un periodo de reposo en un recipiente cerrado durante un periodo suficiente para que la temperatura sea inferior a 37 °C en cualquier punto.

El transporte de la fibra de madera caliente sobre una banda transportadora colocada en un túnel ventilado con aire filtrado es un método apropiado para enfriar grandes cantidades de fibras calientes estériles, sin que haya riesgo de recontaminación.

#### Medio de cultivo

En un modo de realización de la invención, el medio de cultivo utilizado para la preparación del inóculo primario, y el utilizado para la preparación del inóculo secundario, pueden esterilizarse directamente a través de pases en una extrusora de doble tornillo, con lo cual no se requiere ninguna etapa de esterilización en autoclave. En este modo de realización, virutas de madera, particularmente astillas de madera, se extruyen en una extrusora de doble tornillo, en la que se introducen los diferentes constituyentes del medio de cultivo (particularmente sustancias nutritivas, el modificador de pH y agua) en forma de mezcla líquida. La temperatura de extrusión es ventajosamente del orden de 120 °C. Se obtiene así un medio de cultivo esterilizado.

#### Multiplicación *in situ* de *Trichoderma*

De manera general, durante la multiplicación *in situ*, la producción comienza por un cultivo madre de microorganismos obtenido en el laboratorio sobre medios de microbiología convencionales. Este cultivo madre sirve para preparar un inóculo primario, obtenido el por crecimiento de microorganismos sobre un medio a base de fibras vegetales "activadas" por la adición de nutrientes a base de glúcidos y minerales y convenientemente desinfectadas. Los microorganismos se multiplican entre 10<sup>4</sup> y 10<sup>5</sup> veces, en cuanto al número de propágulos, dentro del inóculo primario. El inóculo primario es un producto intermedio destinado ya sea para a inocular terrenos o ya sea, preferentemente, para producir un inóculo secundario.

El inóculo secundario es a base de fibras vegetales "activadas" o no en glúcidos y minerales. El inóculo secundario de ser biológicamente adecuado, sin ser necesariamente estéril. La multiplicación en el inóculo secundario es más baja, de 10<sup>3</sup> a 10<sup>5</sup> veces, en cuanto al número de propágulos. Este inóculo secundario está en sí mismo destinado a inocular los terrenos.

En el ámbito de la invención, convienen dos niveles de amplificación de los *Trichoderma* para alcanzar un factor de multiplicación total de 200.000 a 1.000.000 entre el cultivo madre y el terreno acabado.

El cultivo madre se prepara en placas de Petri sobre un medio esterilizado, adecuado para la multiplicación de hongos *Trichoderma*. Los medios convenientes son el caldo de dextrosa de patata (PDB, del inglés *potato dextrose broth*), el agar de dextrosa de patata (PDA, del inglés *potato dextrose agar*), el agar de Malta (MA o MA2) o el medio de Mc Faden y Sutton de rosa de Bengala/ estreptomycin / formol (RB-S-F).

5 El inóculo primario se prepara en el laboratorio. El cultivo madre sirve para preparar una suspensión de propágulos en agua estéril. La suspensión se incorpora en el medio de cultivo activado destinado para formar el inóculo primario. El medio de cultivo activado se prepara con materias primas esterilizadas. Comprende fibras de madera y preferentemente sustratos nutritivos, modificadores de pH y agua. Si el medio de cultivo no está directamente  
10 esterilizado como se indica anteriormente, la esterilización se efectúa por calentamiento a alta temperatura (121 °C), con presión de vapor de agua en autoclave. La incubación del inóculo primario precisa de 2 a 3 semanas para obtener propágulos con un óptimo de su viabilidad. Si no está contaminado con otros microorganismos, el inóculo primario de *Trichoderma* se conserve a una temperatura inferior a 22 °C durante varios meses. La conservación de 4 a 6 °C es incluso mejor. En el inóculo primario, la multiplicación observada alcanza normalmente  $2 \cdot 10^4$  a  $10^5$ . La  
15 concentración final de propágulos está en el intervalo de  $10^8$  a  $10^{10}$  propágulos/g.

El inóculo secundario se produce en laboratorio, en un entorno adecuado pero no estéril, a partir de materias desinfectadas por calentamiento. El desfibrado de las virutas de madera en un desfibrador de tornillo (típicamente una extrusora) que produce un calentamiento mecánico, (100-120 °C), o en un desfibrador de disco a presión de  
20 vapor de 0,30 a 0,80 MPa (3 a 8 bares) conduce a la obtención de fibras de madera desinfectadas. La fibra de madera debe enfriarse antes de la inoculación a una temperatura compatible con la supervivencia de *Trichoderma*, por tanto menos de 37 °C. El propio medio de cultivo (que contiene las fibras de madera « desinfectadas ») está desinfectado, por ejemplo, por acidificación y/o por adición de sulfito (o, como alternativa, por filtración esterilizante, rayos ultravioletas, calor). También es posible, al igual que para la preparación de inóculo primario, desinfectar el  
25 medio de cultivo a través de pases en una extrusora de doble tornillo. La incubación del inóculo secundario requiere de 2 a 3 semanas a una temperatura comprendida entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 25 °C. También se han realizado ensayos de estabilidad a una temperatura de 22 °C durante periodos largos de 5 meses siempre con una estabilidad de la viabilidad de esporas de *Trichoderma*. La multiplicación en inóculo secundario alcanza en general  $10^3$  a  $10^4$ . La concentración final en el inóculo secundario está en el intervalo de  $10^7$  a  $10^9$   
30 propágulos/g.

El inóculo secundario puede después incorporarse en terrenos comerciales a razón de 0,02 a 0,5 % m/m, o aproximadamente de 0,5 a 2 m<sup>3</sup> de inóculo secundario / 1000 m<sup>3</sup> de terreno acabado. El inóculo secundario puede combinarse con agentes protectores de *Trichoderma* durante su incorporación en los terrenos. El objetivo es obtener  
35 una concentración final de  $10^4$  a  $10^6$  propágulos/g en el terreno acabado. La dosificación óptima depende de la cepa de *Trichoderma* empleada y de los efectos deseados. La concentración apropiada de *Trichoderma atroviride* MUCL45632 (descrita en la solicitud de patente EP-A-1 876 232) es de  $10^5$  propágulos/g con un mínimo tolerable de  $10^4$  propágulos/g.

40 La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos proporcionados exclusivamente a título ilustrativo.

#### **Ejemplo 1: preparación de un inóculo primario**

##### *Preparación de la suspensión madre*

45 Se cultiva el hongo *Trichoderma atroviride* MUCL45632 en placas de Petri sobre un medio apropiado (PDA) para que produzca espora. Las esporas se recuperan en agua estéril raspando la superficie de la placa. Esta suspensión se dosifica en esporas totales y usando agua estéril, la concentración se ajusta a  $1 \cdot 10^7$  esporas/ml en esporas totales de *Trichoderma*.

##### *Preparación del medio de cultivo*

a) Se mezclan 217 g de salvado de trigo (utilizado para alimentación animal) y 540 g de astillas de madera (materia seca: 60-70 %) y se extruye esta mezcla en una extrusora de doble tornillo de tipo KRO 200 disponible  
55 en la compañía Cletral, y cuyas características son las siguientes:

Longitud (mm): 1600  
Zona de compresión: 2  
Rotación: Co  
60 Temperatura: 120 °C

Las fibras de madera presentan (después de la extrusión) una masa volúmica aparente seca de 40 kg/m<sup>3</sup>.

b) En un vaso de precipitados se mezcla:

agua	722 g
vitamina C	1,1 g

## ES 2 609 101 T3

glicerol	21,7 g
sulfito de sodio	0,65 g
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> al 84 %	20,9 g
CoCl <sub>2</sub>	0,003 g

La fracción líquida b) se vierte en la fracción sólida a) y se homogeniza. La mezcla se vierte en una bolsa de polipropileno de 2 l para autoclave. Después del llenado, la bolsa se precinta dejando una abertura de 7 cm tapada con algodón cardado. Después, la bolsa se esteriliza en autoclave durante 35 min a 121 °C.

5

Después de la esterilización en autoclave:

pH 1/5 vol: 3,1  
Materia seca: 32,8 %  
Masa total: 1523 g

10

### *Siembra (inoculación) del medio*

Se añadieron 150 ml de suspensión madre de *Trichoderma* a 1.10<sup>7</sup> esporas/ml a la bolsa o sea 1.10<sup>6</sup> esporas/g de medio y se homogeneizó.

15

### *Cultivo*

La bolsa se colocó en una estufa ajustada a 27 °C durante 4 días, y después se mantuvo la temperatura a 25 °C. En la parte inferior de la bolsa opuesta a la abertura con algodón, se colocó una aguja unida a una alimentación de aire estéril a presión por un tubo para aportar 10 l/h de aire durante el cultivo. Después de 7 días, para estimular la esporulación, se mezclaron las bolsas manualmente. Al cabo de dos días, comenzaron a aparecer los filamentos del hongo. A los 4 días, el medio de cultivo comienza a calentarse. Se alcanza una temperatura de 28 °C - 30 °C. Se deja que el cultivo se desarrolle durante 21 días.

20

25

### *Observaciones al final del cultivo*

Al final del cultivo se mide:

El pH 1/5 vol: 3,3  
La materia seca: 32 %

30

La viabilidad y el grado de contaminación del medio de cultivo se indican en la Tabla 1. Las esporas viables se contabilizan de acuerdo con la norma NF ISO 7954.

35

Tabla 1

Dosificaciones	Esporas totales	Propágulos/g	Contaminantes bacterianos (UFC/g)
21 días de cultivo	1,8.10 <sup>9</sup>	1,0.10 <sup>9</sup>	3,8.10 <sup>4</sup>
1 mes de almacenamiento en el frigorífico	2,0.10 <sup>9</sup>	1,1.10 <sup>9</sup>	3,3.10 <sup>5</sup>
2 meses de almacenamiento en el frigorífico	1,8.10 <sup>9</sup>	1,2.10 <sup>9</sup>	nd
3 meses de almacenamiento en el frigorífico	1,5.10 <sup>9</sup>	1,1.10 <sup>9</sup>	< 10 <sup>4</sup>
1 mes de almacenamiento a temperatura ambiente	2,1.10 <sup>9</sup>	2,2.10 <sup>9</sup>	2.10 <sup>2</sup>
2 meses de almacenamiento a temperatura ambiente	2,3.10 <sup>9</sup>	1,0.10 <sup>9</sup>	6,8.10 <sup>3</sup>
4 meses de almacenamiento a temperatura ambiente	2,5.10 <sup>9</sup>	1,4.10 <sup>9</sup>	nd
6 meses de almacenamiento a temperatura ambiente	1,3.10 <sup>9</sup>	1,6.10 <sup>9</sup>	nd
nd = no determinado			

De la lectura de esta tabla se constata que todos los lotes conservan una viabilidad superior o igual a 10<sup>9</sup> esporas/g después de 3 meses en el frigorífico a 5 °C. También se constata que todos los lotes conservan una viabilidad superior o igual a 10<sup>9</sup> propágulos/g después de 6 meses a temperatura ambiente. Es preferible obtener un producto sin contaminantes, aunque las bacterias presentes en este ensayo no hacen que disminuya la viabilidad de *Trichoderma*.

40

**Ejemplo 2:** preparación de un inóculo secundario

*Preparación del medio de cultivo*

- 5 a) Se mezclan 118 kg de salvado de trigo (utilizado para la alimentación animal) y 481 kg de astillas de madera (materia seca: 60-70 %) y esta mezcla se extruye en una extrusora de doble tornillo de tipo KRO 200 (véase ejemplo 1).  
b) En una cubeta, se mezcla:

Agua	483 kg
vitamina C	0,966 kg
sulfito de sodio	0,240 kg
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> al 84 %	7,77 kg

10 La mezcla debe hacerse de manera que no se contamine el futuro cultivo.

La fracción líquida b) se vierte en la fracción sólida a) y se homogeniza en un mezclador.

15 *Siembra (inoculación) con el inóculo primario*

En 167 l de agua limpia, se añaden 133 g de sulfito de sodio y la bolsa del inóculo primario del ejemplo anterior. Se homogeneiza la suspensión y se deja reposar durante 24 h. Se vierte la suspensión en el mezclador que contiene el medio de cultivo y se mezcla todo. La siembra se realiza a  $1 \cdot 10^6$  esporas totales/g de medio.

20 *Cultivo*

Se vierte la mezcla en 50 bolsas de polipropileno de 25 kg precintadas con una abertura tapada con algodón y una inyección de aire. Este sistema limita la pérdida de agua. Como alternativa, pueden utilizarse 50 bolsas de polipropileno trenzadas de 25 kg, pero el medio se seca durante el cultivo. Las bolsas se separan entre sí para evitar que se produzca el calentamiento.

El cultivo se realiza en una sala limpia cerrada a una temperatura comprendida entre 19 °C y 25 °C. Deben evitarse las corrientes de aire y el paso de personal se limita al estrictamente necesario. El cultivo se desarrolla durante 21 días.

*Observaciones al final del cultivo en bolsas precintadas*

Al final del cultivo las fibras han tomado un color verde indicativo de la presencia de esporas de *Trichoderma*.

35 En la Tabla 2 se indica la viabilidad y el grado de contaminación del medio de cultivo. Las esporas viables se contabilizan de acuerdo con la norma NF ISO 7954.

Tabla 2

Dosificaciones	Esporas totales/g	Propágulos/g	Contaminantes bacterianos (UFC/g)
21 días de cultivo	$8,8 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^9$	$7,8 \cdot 10^4$
1 mes de almacenamiento a 25 °C	$1,9 \cdot 10^9$	$1,2 \cdot 10^9$	$2,1 \cdot 10^5$
2 meses de almacenamiento a 25 °C	$2,2 \cdot 10^9$	$1,1 \cdot 10^9$	nd
5 meses de almacenamiento a 25 °C	$1,6 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^9$	nd
7 meses de almacenamiento a 25 °C	$9,0 \cdot 10^8$	$6,7 \cdot 10^8$	nd
nd = no determinado			

40 *Observaciones al final del cultivo en bolsas trenzadas*

Al final del cultivo se mide:

- 45 La materia seca 38,9 %  
El pH: 3

En la Tabla 3 se indica la viabilidad y el grado de contaminación del medio de cultivo. Las esporas viables se contabilizan de acuerdo con la norma NF ISO 7954.

50

Tabla 3

Dosificación	Esporas totales/g	Propágulos/g	Contaminantes bacterianos (UFC/g)
21 días de cultivo	$9,7 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^8$	$9,5 \cdot 10^2$

**Ejemplo 3:** estabilidad de *Trichoderma* en las materias primas y el terreno

- 5 La estabilidad de la viabilidad de la cepa de *Trichoderma* es una propiedad particularmente notable que responde a los objetivos de los usuarios que buscan productos que puedan transportarse y almacenarse sin riesgo a perder la temperatura ambiente y sin el problema de tener que respetar la cadena del frío.

- 10 Los ensayos realizados sobre algunas materias primas y un terreno comercial muestran que las esporas de *Trichoderma atroviride* MUCL45632 no se mueren cuando se cultivan, en presencia de fibras de madera de la invención, en condiciones de conservación templadas. En la Tabla 4 se indican los resultados.

Tabla 4

Dosificaciones (propágulos/g)	Teórico	Inicio	1 mes de almacenamiento	2 meses de almacenamiento	3 meses de almacenamiento
fibra de la invención	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^7$	$9,5 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^6$
turba rubia	$5 \cdot 10^6$	$6,3 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^5$	$4,5 \cdot 10^4$
fibra de coco	$5 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$	$9,6 \cdot 10^5$
corteza reciente	$5 \cdot 10^6$	$4,7 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^4$
corteza compuesta	$5 \cdot 10^6$	$5,2 \cdot 10^6$	$4,4 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$
terreno comercial	$1 \cdot 10^7$	$5,8 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^4$

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de multiplicación de una cepa de *Trichoderma*, que comprende:
  - 5 - la siembra, con una suspensión madre de propágulos de *Trichoderma*, de un primer medio de cultivo esterilizado que contiene entre aproximadamente 25 % y aproximadamente 50 % en peso de fibras de madera, agua, sustancias nutritivas y un modificador de pH, teniendo dichas fibras un contenido de aire por volumen comprendido en el intervalo que varía de aproximadamente 55 % a aproximadamente 90 %, estando dicho medio libre de contaminantes fúngicos y teniendo un contenido de contaminantes bacterianos inferior o igual a  $10^2$  UFC/g,
  - 10 - el cultivo del medio de cultivo así sembrado para obtener un inóculo primario en el que el factor de multiplicación de los propágulos alcanza  $2 \cdot 10^4$  a  $10^5$ .
2. Procedimiento de multiplicación de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la concentración final de propágulos del inóculo primario está en el intervalo de  $10^8$  a  $10^{10}$  propágulos/g.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el cultivo del medio comprende un periodo de incubación de al menos dos semanas.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que adicionalmente comprende:
  - la preparación de un segundo medio de cultivo que contiene fibras de madera desinfectadas, teniendo dichas fibras de madera un contenido de aire por volumen comprendido en el intervalo que varía de aproximadamente 55 % a aproximadamente 90 %;
  - 25 - la inoculación de dicho segundo medio de cultivo con 0,001 % a 5 % en peso del inóculo primario;
  - el cultivo del medio de cultivo así inoculado para obtener un inóculo secundario en el que el factor de multiplicación de los propágulos alcanza de  $10^3$  a  $10^5$ .
- 30 5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la concentración final de propágulos en el inóculo secundario está en el intervalo de  $10^7$  a  $10^9$  propágulos/g.
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que el cultivo del medio comprende un periodo de incubación de al menos dos semanas.
- 35 7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las fibras de madera tienen un contenido de aire por volumen comprendido en el intervalo que varía de aproximadamente 60 % a aproximadamente 85 %, preferentemente de aproximadamente 70 % a aproximadamente 85 %.
- 40 8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende una etapa previa de extrusión de virutas de madera, particularmente astillas de madera, usando una extrusora de doble tornillo para obtener las fibras de madera que van a incorporarse en el primer medio de cultivo y/o el segundo medio de cultivo.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que las virutas de madera se extruyen en presencia de salvado de trigo.
- 45 10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 y 9, en el que las fibras de madera pueden obtenerse mediante un procedimiento según el cual se introducen virutas de madera (16) en un cilindro desfibrador (10) que contiene dos tornillos paralelos (12, 14) accionados por rotación para engranarse entre sí mediante sus roscas (12B, 14B) respectivas, presentando dichas roscas sucesivamente, en el sentido (S) que va de aguas arriba a aguas abajo, al menos una serie aguas arriba y una serie aguas abajo de secciones (SM, SI, SA) comprendiendo cada una de ellas una zona aguas arriba de accionamiento (SME, SIE, SAE) en la que las virutas se accionan hacia aguas abajo y una zona aguas abajo de desaceleración (SMF, SIF, SAF) a través de la cual las virutas se impulsan bajo el efecto del accionamiento proporcionado por la zona de aguas arriba, desacelerándose las virutas así accionadas en el cilindro (10) en las zonas de desaceleración y transformándose en fibras (24) que se recuperan a la salida del cilindro desfibrador (10), estando comprendido el tiempo de residencia de las virutas en el cilindro (10) entre 15 y 80 segundos, garantizándose una presión al menos sensiblemente igual a 9,0 MPa (90 bares) aguas arriba de la zona de desaceleración aguas abajo (SMF) de la serie aguas arriba (SM), de tal manera que en el cilindro (10) se alcance una temperatura comprendida entre 120 °C y 150 °C sin aporte de calor externo.
- 50 11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el primer medio de cultivo y/o el segundo medio de cultivo está(n) esterilizado(s) por su paso a través de una extrusora de doble tornillo.
- 60 12. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la cepa de *Trichoderma* es la cepa *Trichoderma atroviride* MUCL45632.
- 65 13. Procedimiento de preparación de un inóculo secundario de *Trichoderma*, que comprende:

## ES 2 609 101 T3

- la preparación de un medio de cultivo que contiene fibras de madera desinfectadas, teniendo dichas fibras de madera un contenido de aire por volumen comprendido en el intervalo que varía de aproximadamente 55 % a aproximadamente 90 %;
  - la inoculación de dicho medio de cultivo con 0,001 % a 5 % en peso de inóculo primario de *Trichoderma*, cuya concentración de propágulos está en el intervalo que varía de  $10^8$  a  $10^{10}$  propágulos/g;
  - el cultivo del medio de cultivo así inoculado para obtener un inóculo secundario, cuya concentración de propágulos está en el intervalo que varía de  $10^7$  a  $10^9$  propágulos/g.
- 5
- 10
14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el cultivo del medio comprende un periodo de incubación de al menos dos semanas.
15. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 13 y 14, en el que las fibras de madera tienen un contenido de aire por volumen comprendido entre el intervalo de aproximadamente 60 % a aproximadamente 85 %, preferentemente de aproximadamente 70 % a aproximadamente 85 %.
- 15
16. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, que comprende una etapa previa de extrusión de virutas de madera, particularmente de astillas de madera, usando una extrusora de doble tornillo para obtener las fibras de madera que van a incorporarse en el medio de cultivo.
- 20
17. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que las virutas de madera se extruyen en presencia de salvado de trigo.
- 25
18. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el medio de cultivo se esteriliza por su paso a través de una extrusora de doble tornillo.

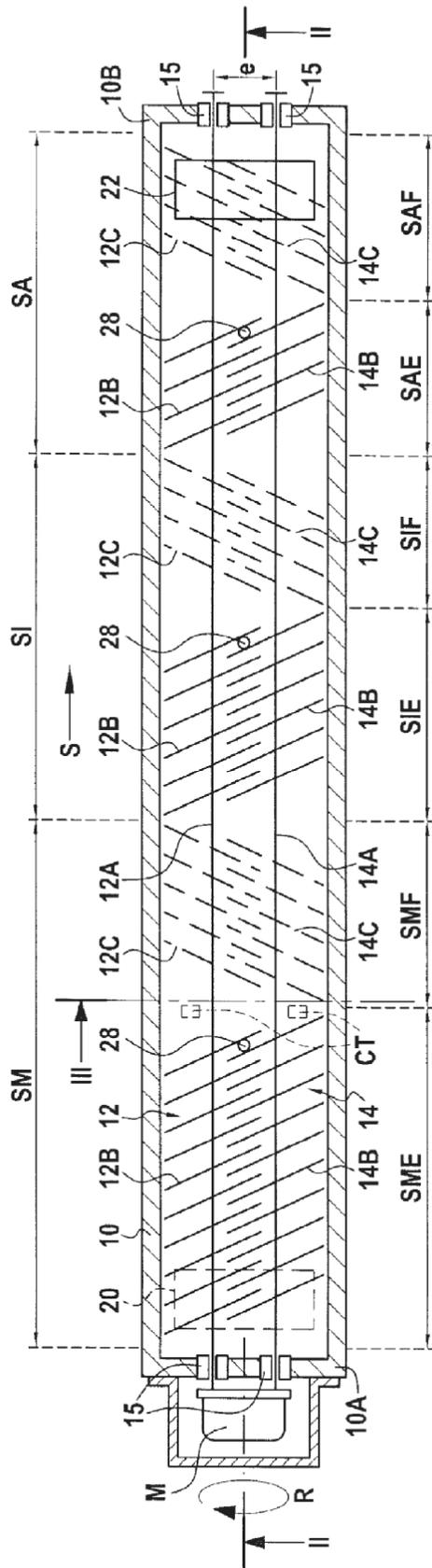


FIG. 1

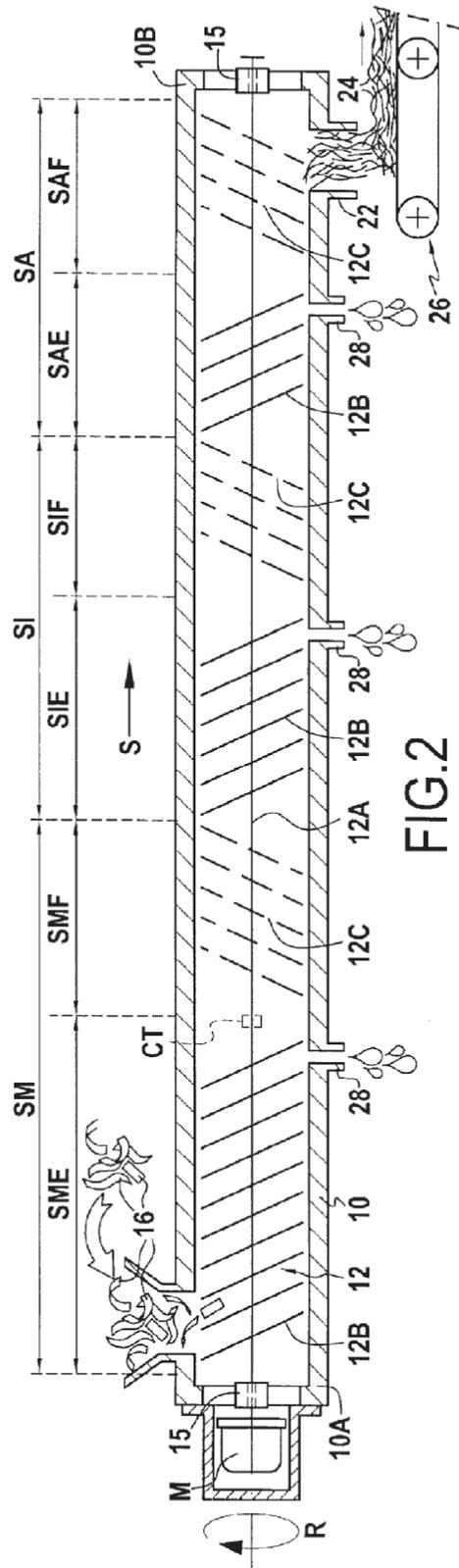


FIG. 2

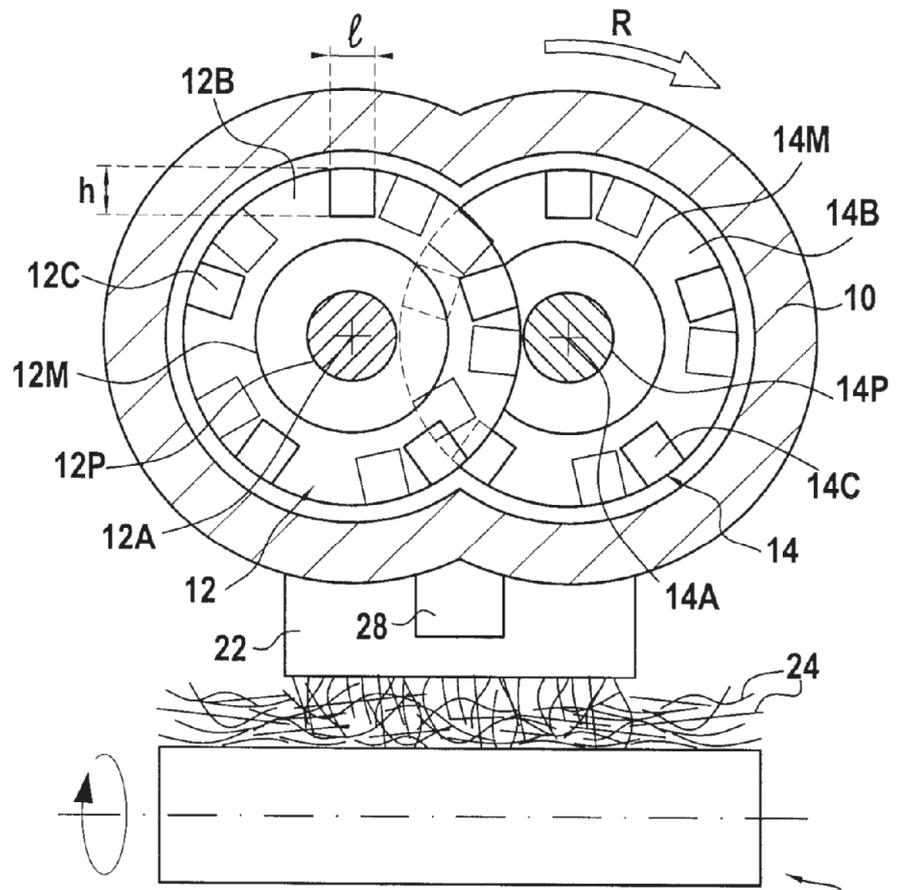


FIG.3

26