

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 786**

21 Número de solicitud: 201700806

51 Int. Cl.:

C05F 5/00 (2006.01)

C05F 11/08 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.08.2017

30 Prioridad:

31.08.2016 EP 16382408.9

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.02.2018

71 Solicitantes:

MICROGAIA BIOTECH S.L. (100.0%)
Parque Científico de Campus Universitario de
Espinardo km 388 carretera de Madrid-Espinardo
30100 Murcia ES

72 Inventor/es:

SANCHEZ LOPEZ, Cristobal;
PASCUAL VALERO, Jose Antonio;
VOSÁTKA, Miroslav;
LÁTR, Ales y
GIANINAZZI, Silvio

74 Agente/Representante:

DIAZ PACHECO, Maria Desamparados

54 Título: **Procedimiento de elaboración de un sustrato orgánico para estimulación del crecimiento en germinación y desarrollo de plantas y sustrato orgánico**

57 Resumen:

Procedimiento de elaboración de un sustrato orgánico para estimulación del crecimiento en germinación y desarrollo de plantas y sustrato orgánico. Procedimiento de elaboración de un sustrato orgánico que comprende iniciar compostaje de restos de poda de vid, añadir quitina a los restos de poda de vid, inocular una cepa del microorganismo *Trichoderma harzianum* e inocular una mezcla de especies del género *Glomus*.

ES 2 656 786 A1

DESCRIPCIÓN

- 5 Procedimiento de elaboración de un sustrato orgánico para estimulación del crecimiento en germinación y desarrollo de plantas y sustrato orgánico

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 10 La presente invención se refiere a la elaboración de un sustrato orgánico para estimulación del crecimiento en germinación y desarrollo de plantas. En particular, dicho procedimiento comprende compostaje de restos de poda de vid, adición de quitina, una cepa del microorganismo *Trichoderma harzianum* y una mezcla de especies del género *Glomus*.

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

- 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
20 medioambientales.

Por otro lado una enmienda orgánica, es cualquier tipo de material orgánica capaz de mejorar la calidad del suelo y del cultivo que se esté produciendo en el mismo, dado que esta aporta parte de los nutrientes necesarios, además de mejorar las propiedades del suelo.

25

La evolución de los sustratos y enmiendas orgánicas es más que manifiesta en los últimos tiempos, exigiéndosele cada vez una mayor calidad a las mismas, así como funcionalidades concretas, esperando de ellas cada vez menor dependencias de insumos externos. Por ello, se ha ampliado el campo de aplicaciones, tanto como sustratos como enmiendas orgánicas.

- 30 En el primer caso destaca el empleo para el uso de millones de plántulas en un sector tan tecnificado como es el semillero, donde se producen plántulas a partir de semilla, sobre el mínimo volumen de sustrato orgánico existente. En este caso se ha empleado turba como material de referencia, pero este tiene varias problemáticas, desde medioambientales por la necesidad de su importación, el sobrecoste que este tipo de material tiene, así como la
35 heterogeneidad de las partidas dependiendo no solo del origen sino de la partida en cuestión. Por otro lado, también se ha producido un crecimiento en el cultivo sin suelo propiamente dicho para lo cual se emplea fibra de coco y perlita, que aunque tienen una buena respuesta,

tienen varios problemas como es la dependencia de su importación y la dificultad de su eliminación después de su empleo. Las enmiendas orgánicas son otro punto que se está innovando existiendo la tendencia de producirlas de un modo específico para un fin concreto, el de mejorar los rendimientos, bien de un modo directo mejorando las características del
5 suelo, o directamente mediante el aporte de elementos clave para el cultivo como son los nutrientes o microorganismos capaces de movilizar nutrientes denominados biofertilizantes o biestimulantes.

El aumento de la demanda de éstos produce una creciente sensibilidad hacia el agotamiento
10 de recursos no renovables y el deterioro medioambiental. Esta creciente demanda de substratos orgánicos hace que se platee el uso de compost como un substrato orgánico, si bien no todos los composts pueden ser utilizados como substrato, porque estos deben de cumplir el requisito mínimo de permitir el adecuado crecimiento de los cultivos que se desarrollen sobre ellos.

15

El empleo de restos de poda procedentes de los principales cultivos leñosos tiene implicaciones medioambientales que pueden ser negativas, como es el caso de la quema; o bien positivas como es el aprovechamiento de las características físicas, físico-químicas, químicas y biológicas para su utilización como substrato orgánico, alternativo a la turba, o
20 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. Además, la ventaja de manipular un residuo vegetal desde su origen hasta la obtención del producto final mediante compostaje, pueden permitir incrementar
25 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.

30 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,
35 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 utilizados como sustratos para

el cultivo de plantas, aunque se hace necesaria aplicaciones externas de fertilizantes y plaguicidas químicos.

El empleo de quitina como coadyuvante durante el proceso de compostaje, tiene como efecto el facilitar la instauración del microorganismo T78, tal y como se definió en la patente ES 2360318. Existe una patente donde se describe la producción de un sustrato supresor mediante la incorporación de una cepa de *Trichoderma hamatum* conjuntamente con *Flavobacterium balustinum* (US 4,900,348). US 4,642,131, describe un método en el que *Trichoderma hamatum* se emplea en combinación con bacterias. Sin embargo, ninguna de ambas patentes, describe el potencial uso como potenciador del crecimiento, centrándose en el control de enfermedades. Por otro lado, existe una patente, ES 2188385, 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, si bien puesto que es una mezcla física de un material orgánico con un microorganismo, no potenciando de modo alguno la instauración del microorganismo en el material orgánico, por lo que su capacidad de supervivencia y estabilidad 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 estudios previos, se plantea la inmovilización de T78 mediante el uso de un material inorgánico y otros factores adicionales para el control de enfermedades 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.

También existen estudios en los que se emplean micorrizas con objeto de mejorar el establecimiento de un sistema radicular que permite un mejor acondicionamiento y vigor de la planta micorrizada, lo que produce un ahorro en nutrientes por un lado, y un mayor crecimiento vegetal. En este sentido, la incorporación de micorrizas junto con materiales orgánicos han resultado muy diversos dependiendo de la cepa y del tipo de compost a emplear. El empleo de microorganismos beneficiosos tales como la cepa T78 en un mejor grado de micorrización en plantas de tomate, ha sido realizado con éxito en algunos estudios, aunque es dependiente de la cepa de *Trichoderma* a emplear, así como de la cepa de micorriza.

No existen estudios en los que se haya realizado la combinación de compostaje de restos de poda, con la incorporación secuencial de elementos que da como resultado final un sustrato orgánico biotizado. Los elementos que se incorporan en proceso, facilitan secuencialmente la instauración del siguiente, siendo en primer lugar quitina, que una vez incorporada y parcialmente descompuesta de un modo natural, permite el éxito de la inoculación e

instauración de T78, que una vez incorporada e instaurada permite o facilita la incorporación del AMFS, dando lugar al sustrato biotizado, objeto de esta patente.

Por tanto un sustrato como el planteado en la presente invención, concebido desde su origen para ser nicho ecológico y nutricional de microorganismos específicos y elaborado 5 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.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

10

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de elaboración de un sustrato orgánico para estimulación del crecimiento en germinación y desarrollo de plantas, que comprende:

(a) iniciar compostaje de restos de poda de vid,

15 (b) añadir quitina a los restos de poda de vid durante la fase termófila del compostaje,

(c) inocular una cepa del microorganismo *Trichoderma harzianum* al producto resultante de la etapa anterior al finalizar la fase termófila del compostaje e

(d) inocular una mezcla de especies del género *Glomus* al producto resultante de la etapa anterior durante la fase de maduración del compostaje.

20

Otra realización es el procedimiento según el primer aspecto de la invención, donde la proporción de *Trichoderma harzianum* / mezcla de especies del género *Glomus* es 1:1.

Otra realización es el procedimiento según el primer aspecto de la invención, donde la cepa 25 del microorganismo *Trichoderma harzianum* es la cepa *Trichoderma harzianum* T78 identificada por el número de depósito CECT 20714 y por que la mezcla de especies del género *Glomus* es una mezcla de las especies *Glomus intraradices*, *Glomus claroideum*, *Glomus mosseae* y *Glomus etunicatum*.

30 El sustrato orgánico de cultivo es apto para el desarrollo de plántulas hortícolas a nivel de semillero, cultivo sin suelo e incorporación como enmienda orgánica al suelos de cultivo, inoculado con microorganismos que le confieren capacidad bioestimulante y/o biofertilizante.

La combinación de especies que forman parte del inóculo y su relación proporcional, el 35 momento y la forma de incorporación de los distintos elementos consiguen funcionalidades bioestimulantes y/o biofertilizantes de forma estable y persistente en el sustrato.

La presente invención proporciona un sustrato orgánico apto para el desarrollo y cultivo de plantas en semillero, en cultivo sin suelo y, aplicado como enmienda orgánica, en horticultura intensiva.

- 5 El sustrato orgánico es capaz de sustituir los sustratos tradicionales en cultivo sin suelo como es la turba o fibra de coco, así como enmiendas orgánicas de alto valor añadido. El sustrato orgánico se caracteriza por presentar propiedades adicionales y específicas a los sustratos orgánicos del mercado, fundamentalmente capacidades bioestimulantes y biofertilizantes.
- 10 La presente invención proporciona un sustrato orgánico, biotizado funcionalmente, para producción agrícola tecnificada, como la germinación y desarrollo de plántula hortícola en semilleros y la producción en cultivo sin suelo. Este sustrato también es adecuado para su empleo, como enmienda orgánica, en suelos de cultivo. Su empleo mejora los rendimientos de cosecha de los cultivos ensayados, lo que debe ser atribuido al efecto sinérgico y conjunto
- 15 de la combinación específica empleada.

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 (actividad bioestimulante y biofertilizante) debido a la

20 adecuada instauración de los microorganismos descritos.

El sustrato de cultivo objeto de la presente invención incorpora quitina. 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 y favoreciendo así

25 la bioestabilización de la materia orgánica, actúa como inductor de activación y fuente nutritiva de la cepa *Trichoderma harzianum* T78; esta última, inoculada en el momento adecuado del proceso de compostaje para asegurar su instauración de modo estable, favorecerá la acción de la mezcla de especies del género *Glomus*, aumentando sus índices de micorrización, durante el cultivo de la planta en el sustrato, produciendo significativas mejoras de los

30 rendimientos de cosecha ensayados

En el procedimiento del primer aspecto de la invención, la quitina se aplica tras el primer pico de la fase termófila, aprovechando el volteo necesario, la cepa *Trichoderma harzianum* T78 se incorpora al final de esta fase del proceso de compostaje y la mezcla de especies del

35 género *Glomus* se inocula durante la fase de maduración del proceso y previo al afino del material final obtenido. El empleo del producto obtenido produce una mejora en los cultivos ensayados con menores necesidades de insumos químicos (fertilizantes y plaguicidas de

síntesis), contribuyendo a una agricultura sostenible, respetuosa con el medio ambiente y la salud de los seres vivos. Además, el material de partida de este sustrato, restos de poda de vid, pasaría de ser un “residuo” a un “recurso”, valorizable económicamente, permitiendo darle una salida medioambiental adecuada, evitando la problemática de su eliminación mediante su
5 quema indiscriminada. Al mismo tiempo, este recurso renovable contribuye a reducir las necesidades de uso de sustratos procedentes de fuentes no renovables como las turbas.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un sustrato orgánico obtenible según el procedimiento del primer aspecto de la invención.

10

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un sustrato orgánico según el segundo aspecto de la invención para uso en estimulación del crecimiento en germinación y desarrollo de plantas.

15 Otra realización es el sustrato orgánico del tercer aspecto de la invención, donde dichas plantas se cultivan sin suelo o con suelo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 Figura 1. Peso fresco de plantas de maíz tratadas con las diferentes combinaciones de micorriza y cepas de *Trichoderma harzianum*.

Figura 2. Peso seco de plantas de maíz tratadas con las diferentes combinaciones de micorriza y cepas de *Trichoderma harzianum*.

25

Figura 3. Peso fresco de plantas de tomate tratadas con las diferentes combinaciones de micorriza y cepas de *Trichoderma harzianum*.

Figura 4. Peso seco de plantas de tomate tratadas con las diferentes combinaciones de
30 micorriza y cepas de *Trichoderma harzianum*,

Figura 5. Altura promedio, en centímetros por plántula, de las 300 plántulas de melón de cada tratamiento ensayado en semillero con diferentes sustratos y mezclas de los mismos.

35 Figura 6. Peso seco promedio, en gramos por plántula, de las 300 plántulas de melón de cada tratamiento ensayado en semillero con diferentes sustratos y mezclas de los mismos.

Figura 7. Altura promedio, en centímetros por plántula, de las 300 plántulas de cebolla de cada tratamiento ensayado en semillero con diferentes sustratos y mezclas de los mismos.

Figura 8. Peso seco promedio, en gramos por plántula, de las 300 plántulas de cebolla de
5 cada tratamiento ensayado en semillero con diferentes sustratos y mezclas de los mismos.

Figura 9. Altura promedio, en centímetros por plántula, de las 300 plántulas de pimiento de cada tratamiento ensayado en semillero con diferentes sustratos y mezclas de los mismos.

10 Figura 10. Peso seco promedio, en gramos por plántula, de las 300 plántulas de pimiento de cada tratamiento ensayado en semillero con diferentes sustratos y mezclas de los mismos.

Figura 11. Peso total, en gramos por tratamiento, de las 9 plantas de cada tratamiento ensayado de producción de tomate en cultivo sin suelo con diferentes sustratos orgánicos y
15 mezclas de los mismos.

Figura 12. Peso promedio, en gramos por fruto, de un fruto (unidad) de cada tratamiento ensayado de producción de tomate en cultivo sin suelo con diferentes sustratos orgánicos y mezclas de los mismos.
20

Figura 13. Peso promedio, en kilos de uva por planta, de la producción de las 96 plantas de cada tratamiento ensayado en cultivo de vid (año 3º tras la plantación).

Figura 14. Peso promedio, en kilos de uva por planta, de la producción de las 96 plantas de
25 cada tratamiento ensayado en cultivo de vid (año 4º tras la plantación).

DESCRIPCIÓN DE MODOS DE REALIZACIÓN

EJEMPLO 1

30 **Determinación de la combinación de especies y su relación proporcional para obtener un sustrato con capacidades biofertilizantes y bioestimulantes derivadas de una actividad microbiana sinérgica que aumenta los índices de micorrización de las plantas cultivadas**

35 Estudio factorial de diferentes micorrizas y especies y cepas de Trichoderma sp sobre el cultivo de maíz y tomate, evaluando el grado de micorrización y contenido de unidades formadoras de colonia de Trichoderma harzianum.

El objetivo de esta Actividad fue el seleccionar diferentes micorrizas (AMFs) y cepas de Trichoderma, que a priori por sus características poseyesen efectos característicos de su género, es decir que a priori posean capacidad de supervivencia y acción en condiciones de campo.

Selección de microorganismos

Para ello, se dispuso de dos pools de cepas de AMFs (AMF1 y AMF2), las cuales se habían inmovilizado en zeolita, un medio característico en la inmovilización de este microorganismo. Por el otro lado se dispuso de tres cepas diferentes del género Trichoderma. Estos fueron seleccionados por su capacidad de resistir en condiciones de bajo contenidos en materia orgánica y bajo contenido hídrico, condiciones habituales en campo. Las cepas seleccionadas fueron la cepa T38, T55 y T78 inmovilizadas en arcilla, en este caso bentonita.

El número de esporas viables para cada una de las tres cepas de Trichoderma se realizó mediante cultivo en PDA-rosa bengala. El número de esporas estaba en torno a 10(7) UFC por gramo, no existiendo diferencia alguna dependiendo de las cepas de Trichoderma de partida.

Realización del experimento-cultivo de plantas de maíz

Una vez seleccionados tanto las dos micorrizas como las tres cepas de *Trichoderma*, se procedió a la preparación de contenedores de 5 L, los cuales se rellenaron de un suelo agrícola, previamente esterilizado para evitar efectos de micorrización natural, impidiendo la observación de la interacción a estudiar. En cada una de los contenedores, se plantó una semilla de maíz, al ser esta muy sensible al efecto de la micorrización; para lo cual se realizó un pequeño hoyo en el centro de la maceta, colocando 5 gramos del preparado de micorriza y 1 gramo de cada uno de los preparados de Trichoderma, colocándose encima de la mezcla la semilla, cubriéndola con tierra y procediendo al riego por inmersión de los contenedores sobre bandejas de agua, con el objeto de que el agua humectase el suelo por capilaridad y evitando así el posible lavado del material biológico inoculado. Tras 5 horas en inmersión y cuando se observó que el agua había llegado a la parte superficial, se procedió a su extensión en un invernadero de un modo aleatorio. Cada uno de los tratamientos se compuso de 10 réplicas, con el fin de que los resultados tuviesen validez estadística.

35

Los tratamientos dispuestos fueron:

Tabla 1. Combinaciones de cepas *T. harzianum*-pool de micorrizas ensayadas

AMFS T78	AMFS2 T78	T78
AMFS T55	AMFS2 T55	T55
AMFS T38	AMFS2 T38	T38
AMFS	AMFS2	control

Los contenedores se dispusieron durante 45 días, tras los cuales se procedió a su levantamiento, realizando el peso fresco y peso seco de las plantas de maíz, conteo de *Trichoderma* y porcentaje de micorrización.

De este estudio se pudo concluir como las tres cepas de *Trichoderma* producían un aumento en el crecimiento de las plantas, siendo este mayor en el caso de la cepa T78 respecto a las otras dos (Figura 1 y 2). En cuanto a las micorrizas indicar como la AMFS sí mostró un aumento de crecimiento de las plantas de maíz en cuanto al control, aunque el aumento fue menor que el de las muestras que incorporaban la cepa T78. En la Tabla 1, se muestran los porcentajes de micorrización y los niveles de *Trichoderma harzianum* T78 de los distintos tratamientos; de ellos se destaca como los porcentajes de micorrización fueron nulos en el suelo control y los tratamientos que solo incorporaban *Trichoderma*; sin embargo, cuando incorporaban micorriza, bien AMFs o AMFs2, mostraron una micorrización, que en general se veía potenciada en los tratamientos en los que se incorporaba *Trichoderma*, en especial en aquellos en el que el tratamiento de *Trichoderma* incorporado fue T78 como en el caso de la AMFs2 y sus combinaciones con *Trichoderma*; la inoculación de la AMFS sí mostró niveles significativos de porcentaje de micorrización, que se veían aumentados por la presencia de las diferentes cepas de *Trichoderma* aunque en menor medida que la AMFs2. Los mayores niveles de micorrización y el mayor tamaño en planta se mostró en el consorcio AMFs-T78.

Tabla 2. Porcentaje de micorrización y unidades formadoras de colonias de las diferentes cepas de *Trichoderma harzianum* empleadas en el consorcio para el cultivo de maíz.

	Porcentaje micorrización	Desviación Estándar	<i>Trichoderma</i> log (ufc / g)	Desviación Estándar
AMFS T78	75	8	4,48	0,09
AMFS T55	56	7	4,30	0,08
AMFS T38	59	7	4,00	0,03
AMFS	53	6	0,00	0,00
Control	0	0	0,00	0,00

AMFS2 T78	66	6	4,48	0,07
AMFS2 T55	50	4	4,30	0,09
AMFS2 T38	53	7	4,30	0,20
AMFS2	42	5	0,00	0,00
T78	0	0	5,70	0,41
T55	0	0	4,48	0,10
T38	0	0	5,00	0,10

Realización del experimento-cultivo de plantas de tomate en condiciones controladas a nivel de semillero

5

Este ensayo sobre cultivo de tomate, se realizó con las mismas variables que el ensayo anterior, con el objeto de poder realizar una selección contrastada no solo con un cultivo. Este ensayo se realizó a nivel de semillero, empleando los recipientes habituales de semillero de 150 alveolos por tratamiento, tomando de cada bandeja 50 plantas calculando la media de los mismos, tomando para cada uno de los tratamientos 5 réplicas que consistían en 5 bandejas. En este caso, los alveolos se rellenaron con turba rubia habitual de germinación de plántula en semillero, y en cada una de ellas se añadió el equivalente de cada uno de los microorganismos en proporción equivalente de 0,3 g de micorriza por 0,1 g de Trichoderma por semilla.

15

Los resultados mostrados fueron equivalentes a los observados en el ensayo anterior, con la salvedad de que en este caso se observaron niveles de micorrización mucho menores al caso del maíz, ya que este cultivo es menos sensible a la micorrización, y también porque este primer ensayo se realizó a nivel de semillero, cuyos contenedores son pequeños pudiendo esto afectar al efecto micorrización, o a que el tiempo de contacto no fue suficiente en el caso de semillero. Está estipulado que el tiempo mínimo para observar una adecuada micorrización está en torno a 50 días, y estos casos el tiempo de permanencia en los semilleros fue de menos de 30 días. En cuanto al tipo de micorriza, de nuevo los tratamientos con AMF mostraron mejores resultados de micorrización que la AMF2 (Tabla 2), además de un mayor peso fresco y peso seco de las plantas de tomate, evaluadas estas en el momento en el que se realizaría el trasplante a campo (Figuras 3 y 4).

25

Tabla 3. Porcentaje de micorrización y unidades formadoras de colonias de las diferentes cepas de *Trichoderma harzianum* empleadas en el consorcio para el cultivo de tomate a nivel de semillero.

30

	Porcentaje micorrización	Desviación Estándar	Trichoderma log (ufc / g)	Desviación Estándar
AMFS T78	38	4	4,48	0,10
AMFS T55	18	3	4,30	0,10
AMFS T38	17	2	4,00	0,08
AMFS	28	4	0,00	0,00
Control	0	0	0,00	0,00
AMFS2 T78	22	2	3,48	0,07
AMFS2 T55	20	2	3,30	0,09
AMFS2 T38	22	2	4,00	0,09
AMFS2	17	3	0,00	0,00
T78	0	0	5,65	0,41
T55	0	0	4,45	0,03
T38	0	0	5,00	0,09

También la AMF mostró una mejor sinergia con las cepas de *Trichoderma* que la AMF2. Los mejores resultados en cuanto al tamaño de planta, estado nutricional y porcentaje de micorrización ocurrieron para el tratamiento conjunto AMF-T78.

5

La combinación de micorriza AMF y la cepa de *Trichoderma harzianum* T78 mostró el mejor crecimiento de las plantas de maíz y tomate, además de ser aquellas que mostraron el menor antagonismo entre ellos.

10 **EJEMPLO 2**

Obtención de un sustrato orgánico a partir de residuos de poda de vid mediante la inoculación secuencial de quitina, *T. harzianum* T-78 y AMFS durante el proceso de su compostaje.

15 Una vez establecida la combinación de *T. harzianum* y AMFs, se estudia el modo de inocularlos de forma estable y en concentración suficiente durante el proceso de compostaje de residuos de poda de vid.

Al final de la fase termófila del proceso de compostaje de los sarmientos de vid se inocula el 20 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.

Transcurrida la fase de maduración se inocula el pool de AMFs, mezcla de 350 propágulos/gramo de las especies *Glomus intraradices*, *G. claroideum*, *G. mosseae*, *G. etunicatum*, en proporción 1:1 al inóculo de *T. harzianum* T-78.

EJEMPLO 3

Validación del empleo del sustrato orgánico biotizado para ensayo en semillero

10

Se acondicionó granulométricamente el sustrato biotizado a fin de asemejar sus características físicas a los sustratos de cultivo comúnmente utilizados. Se comparó el desarrollo de plántulas de diversas especies hortícolas, en condiciones de semillero, entre distintos sustratos comerciales, preparados específicos de semilleros profesionales y el sustrato biotizado objeto de la presente invención. Se ensayaron tanto los productos puros, como mezclas de los sustratos convencionales con diferentes proporciones del sustrato biotizado, según los tratamientos de la siguiente tabla

15

Tabla 4. distintos sustratos de cultivo y mezclas ensayadas

Tratamientos	DESCRIPCION
1	ELMIR sustrato comercial 100%
2	sustrato comercial + sustrato biotizado 50:50 (V/V)
3	sustrato comercial + sustrato biotizado 80:20 (V/V)
4	Turba rubia 100%
5	Turba rubia + sustrato biotizado 50:50 (V/V)
6	Turba rubia + sustrato biotizado 80:20 (V/V)
7	Mezcla turba rubia-negra (Projar) 100%
8	Mezcla turba rubia y negra (Projar) + sustrato biotizado 50:50 (V/V)
9	Mezcla turba rubia y negra (Projar) + sustrato biotizado 80:20 (V/V)
10	sustrato biotizado 100%

20

Para cada especie de cultivo se prepararon dos bandejas de poliestireno de 150 alveolos de cada una de las distintas composiciones, y se dividieron en dos sectores. Se emplea el tipo de alveolo empleado habitualmente para el cultivo vegetal específico en semilleros comerciales y se cultivan en condiciones de semillero, con riego y fertilización, el tiempo

necesario para cada especie, entre los 45 días de melón y los 60 días de cebolla. Al final del mismo se determina el peso seco y la altura de las 300 plántulas de cada tratamiento por cada especie.

5 Se ensayaron los cultivos de melón, cebolla y pimiento.

Tabla 5. Promedio de peso seco y altura de las plántulas en los distintos tratamientos ensayados

Tratamiento	Melon (Figs. 5 y 6)		Cebolla (Figs. 7 y 8)		Pimiento (Figs. 9 y 10)	
	Peso seco (g)	Altura (cm)	Peso seco (g)	Altura (cm)	Peso seco (g)	Altura (cm)
1	0,231	12,56	0,051	8,81	0,079	8,36
2	0,262	13,55	0,093	13,47	0,138	12,95
3	0,213	12,42	0,072	11,85	0,088	13,42
4	0,194	9,74	0,072	11,93	0,107	9,50
5	0,273	14,47	0,112	16,72	0,198	16,40
6	0,232	10,98	0,102	13,82	0,181	14,16
7	0,252	10,78	0,093	13,89	0,092	9,52
8	0,232	12,64	0,084	13,41	0,200	13,77
9	0,193	10,44	0,085	14,59	0,157	13,39
10	0,225	12,64	0,093	14,42	0,140	12,56

10 En todos los casos, se observa como los tratamientos que incorporaron el sustrato biotizado mostraron un mayor rendimiento en cuanto a peso seco y altura en comparación con los tratamientos tradicionales (Figuras 5 a 10), bien fuese el específico empleado para ese cultivo en semillero, bien la mezcla comercial de turba rubia y negra bien a la propia turba rubia. Los resultados más sobresalientes se encontraron en los que se empleó el sustrato biotizado en
15 mezcla con turba rubia o por sí solo.

EJEMPLO 4

Validacion del empleo del sustrato orgánico biotizado para ensayo en cultivo sin suelo

20 Se acondicionó granulométricamente el sustrato biotizado a fin de asemejar sus características físicas a los sustratos de cultivo comúnmente utilizados. Se comparó la producción, de un cultivo sin suelo de tomate (variedad Optima) en invernadero en distintos

sustratos orgánicos comerciales y el sustrato biotizado objeto de la presente invención. Se ensayó tanto en los productos puros, como en mezclas de los sustratos convencionales con diferentes proporciones del sustrato biotizado, según los tratamientos de la siguiente tabla

5 Tabla 6. Distintos sustratos de cultivo y mezclas ensayadas

Tratamientos	DESCRIPCION
1	Fibra de coco
2	Fibra de coco + sustrato biotizado 50:50 (V/V)
3	Fibra de coco + sustrato biotizado 80:20 (V/V)
4	Turba negra 100%
5	Turba negra + sustrato biotizado 50:50 (V/V)
6	Turba negra + sustrato biotizado 80:20 (V/V)
7	Sustrato biotizado 100%

Cada tratamiento consta de 9 plantas, tres sacos de cultivo, con tres plantas cada uno, dispuestos al azar en el invernadero. El cultivo de tomate tuvo una duración de 9 meses. A partir del mes 3 se recolectó fruto siguiendo el criterio de recolección habitual en cultivo sin suelo, siendo de modo habitual el recolectar entre dos y tres veces por semana en la época de verano, y una sola en la época invernal. en los cuales de un modo periódico se fue recolectando los frutos, los cuales se dividieron en 25 recolecciones. La Tabla 7 muestra el número de frutos y el peso total producido en cada tratamiento, mientras que la Figura 11 muestra el peso total producido por cada tratamiento y la Figura 12 el peso medio de los frutos recogidos.

De los resultados obtenidos destacó que el sustrato biotizado mostró unos resultados similares a los de la fibra de coco, siendo inferiores a los obtenidos por parte de la turba negra. Sin embargo, es importante remarcar como la proporción del 20% de sustrato biotizado mezclado con la fibra de coco produjo un aumento significativo en la producción.

A su vez la combinación del sustrato biotizado con la turba negra mostró además de un aumento en el número de frutos un aumento en el peso de los mismos. Esto último es reflejo de un aumento en la calidad y precio de los frutos obtenidos.

Las diferencias obtenidas deben de atribuirse al efecto del compost biotizado, puesto que en todos los casos el riego efectuado era equivalente para todos los tratamientos. El mejor aprovechamiento de los recursos por parte de los composts que incorporaron microorganismos fue la causa de la obtención de una mejora de los rendimientos. El que se obtuviese una igual producción en el compost biotizado que en la fibra de coco, y que se aumentase de forma significativa cuando este se incorporaba con la fibra de coco, es atribuible a que la estructura que confiere la fibra de coco es óptima y la incorporación del compost biotizado en la proporción del 20% aplicó las características óptimas aportadas por el compost biotizado.

10

Tabla 7. Peso total y nº de frutos de la cosecha de los distintos tratamientos en cultivo sin suelo de tomate

15

TRATAMIENTO	Peso total (Kg)	Nº frutos
1	47,41	276
2	58,75	356
3	55,09	299
4	63,81	387
5	64,95	365
6	71,95	378
7	46,52	273

20

EJEMPLO 5

Validación del empleo del sustrato orgánico biotizado como enmienda orgánica.

25

Se ensayó el efecto de la adición del sustrato biotizado, como enmienda orgánica, en el momento de plantación de una viña de vinificación, variedad Macabeo, conducción en vaso y en régimen de regadío. Se comparan los siguientes tratamientos:

30 Tabla 8. Tratamientos realizados en cultivo de vid.

Tratamientos	DESCRIPCION
1	Sustrato biotizado
2	Control. Turba negra

35

En el momento de la plantación, se añade, en el hoyo de plantación, un kilogramo de la enmienda correspondiente a cada tratamiento, en 96 hoyos por tratamiento, dispuestos al azar. Las condiciones de cultivo, a partir de entonces, son las mismas para toda la parcela. Riego localizado (2.000m³/Ha.), fertiirrigación (solución NPK 8-4-10), tratamientos preventivos con azufre micronizado 98%.

Se comparó la producción de dos cosechas consecutivas, correspondientes al tercer y cuarto año desde la plantación, para cuando ya se ha estabilizado la misma.

10 Tabla 9. Promedios de producción de los distintos tratamientos en los años 3 y 4 tras la plantación de vid

TRATAMIENTO	Promedio (Kg/planta)	
	Año 3 (Fig. 13)	Año 4 (Fig. 14)
1	2,16	4,09
2	1,18	2,79

15 REFERENCIA A DEPÓSITO DE MATERIAL BIOLÓGICO

La cepa *Trichoderma harzianum* T78 ha sido depositada el 22 de noviembre de 2006 de acuerdo al Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes, en la autoridad internacional de depósito Colección Española de Cultivo Tipo (CECT) con dirección Parc Científic Universitat de València, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia, España), por Microgaia Biotech, SL, con dirección en Parque Científico de Murcia, Campus Espinardo, Edificio S - Ctra. Madrid, Km. 388. 30100 Espinardo (Murcia, España).

25 La cepa *Trichoderma harzianum* T78 ha sido identificada por el depositante mediante la referencia T 78, y recibió el número de depósito CECT 20714 por la autoridad internacional de depósito.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de elaboración de un sustrato orgánico para estimulación del crecimiento en germinación y desarrollo de plantas, caracterizado por que comprende:
 - (a) iniciar compostaje de restos de poda de vid,
 - 5 (b) añadir quitina a los restos de poda de vid durante la fase termófila del compostaje,
 - (c) inocular una cepa del microorganismo *Trichoderma harzianum* al producto resultante de la etapa anterior al finalizar la fase termófila del compostaje,
 - (d) inocular una mezcla de especies del género *Glomus* al producto resultante de la etapa anterior durante la fase de maduración del compostaje.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la proporción de *Trichoderma harzianum* / mezcla de especies del género *Glomus* es 1:1.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por que la cepa del microorganismo *Trichoderma harzianum* es la cepa *Trichoderma harzianum* T78 identificada por el número de depósito CECT 20714 y por que la mezcla de especies del
15 género *Glomus* es una mezcla de las especies *Glomus intraradices*, *Glomus claroideum*, *Glomus mosseae* y *Glomus etunicatum*.
4. Sustrato orgánico obtenible según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Sustrato orgánico según la reivindicación 4 para uso en estimulación del crecimiento en germinación y desarrollo de plantas.
- 20 6. Sustrato orgánico para uso según la reivindicación 5, caracterizado por que dichas plantas se cultivan sin suelo o con suelo.

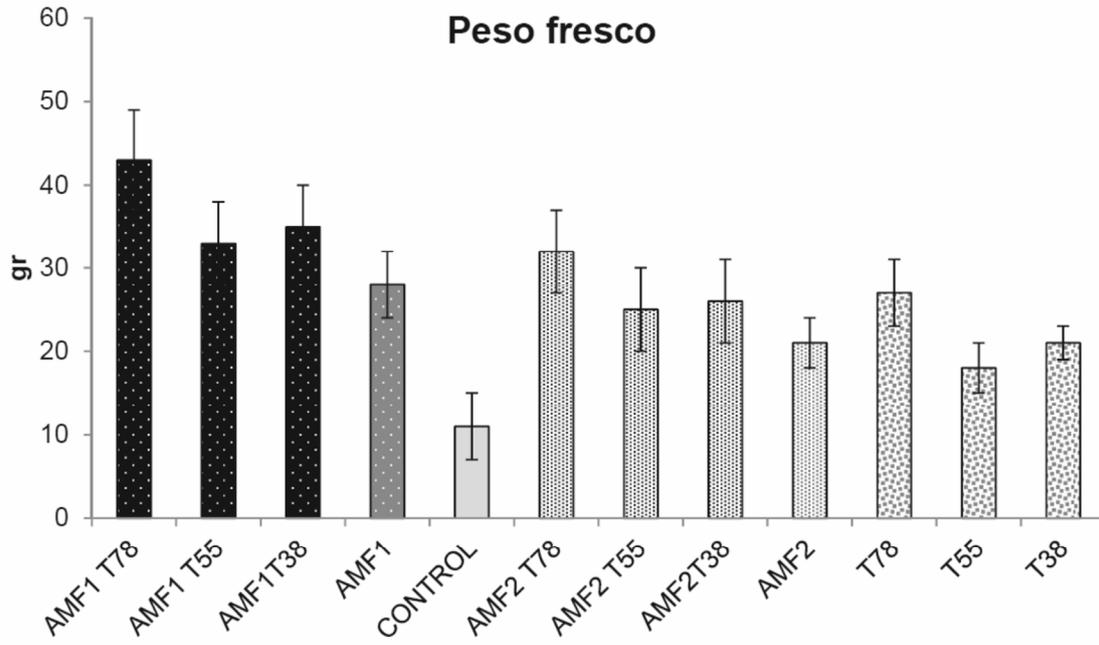


Fig. 1

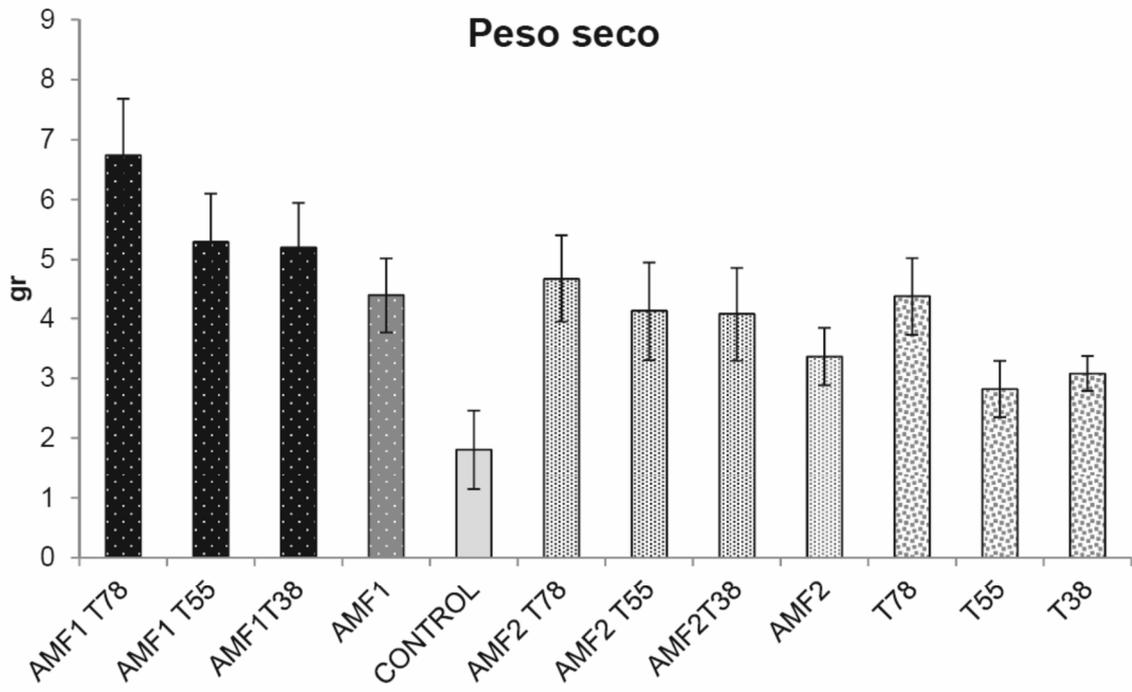


Fig. 2

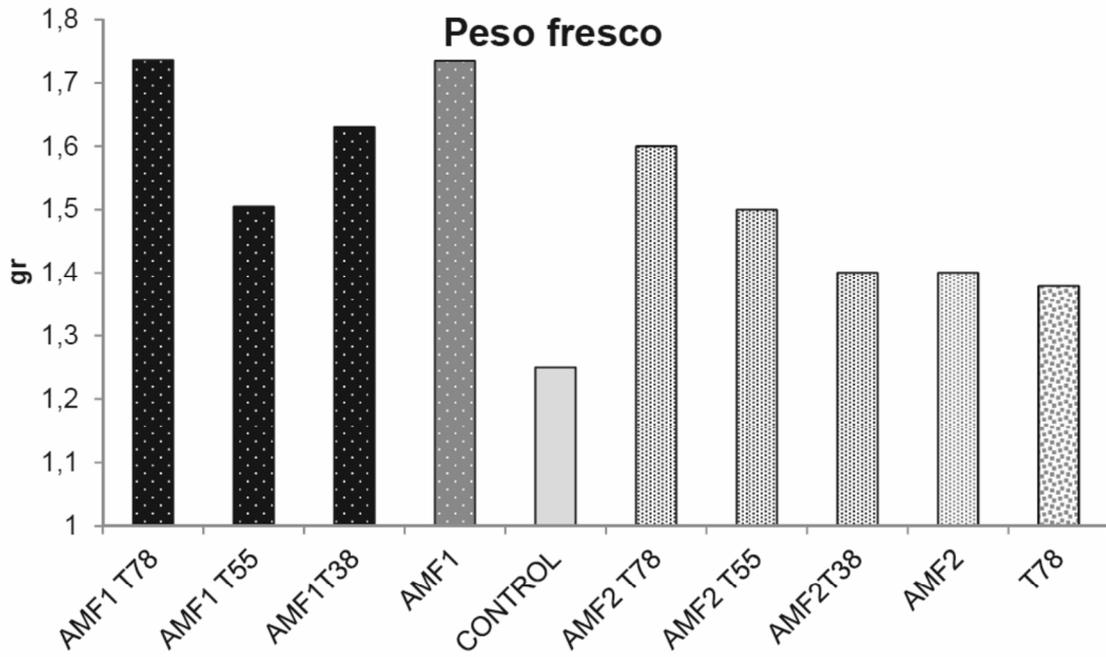


Fig. 3

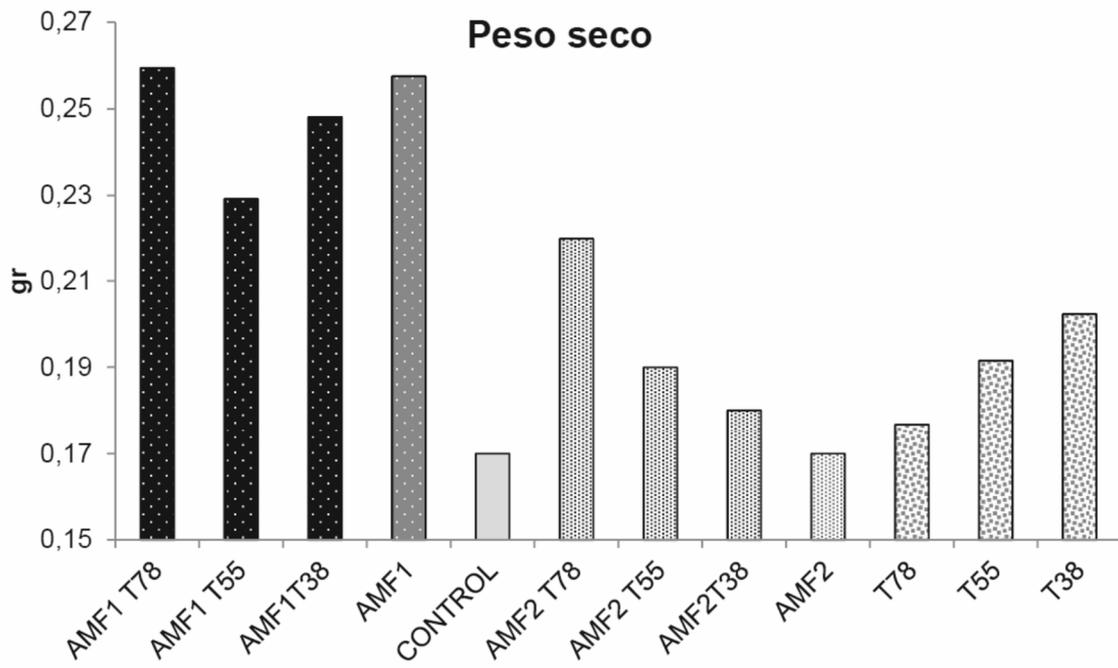


Fig. 4

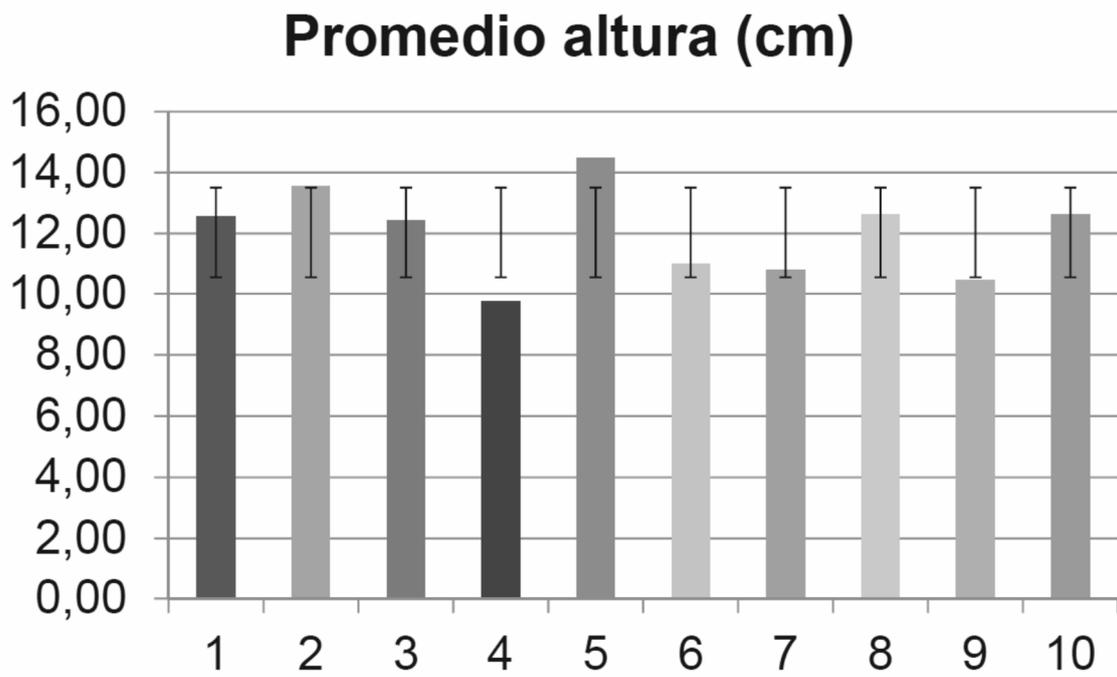


Fig. 5

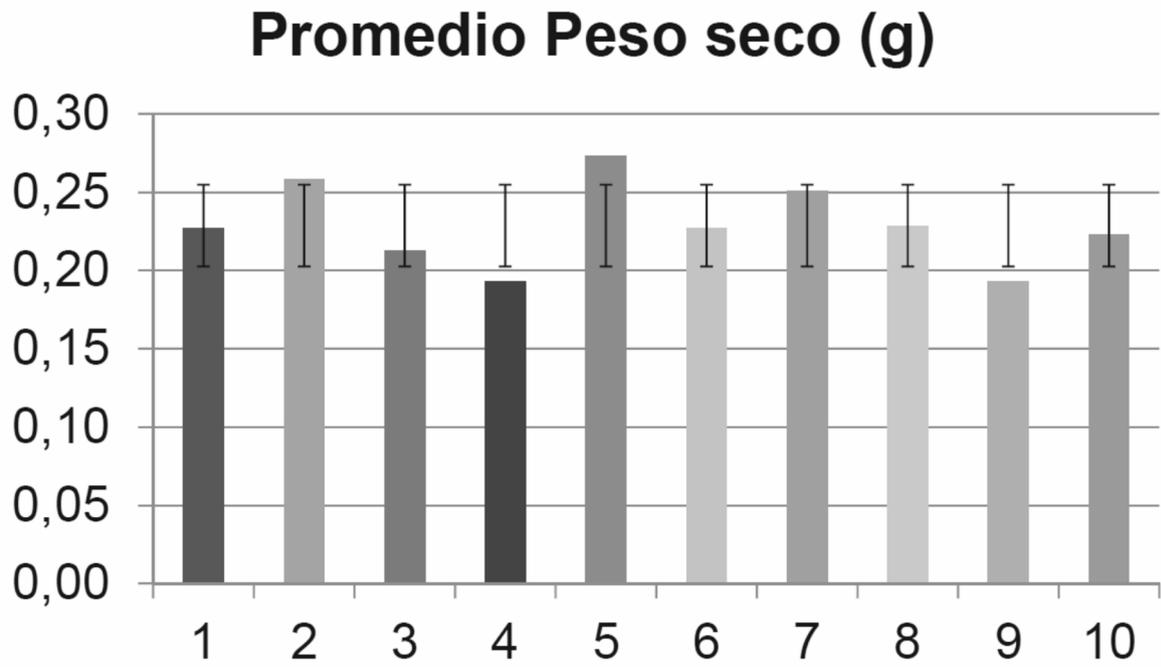


Fig. 6

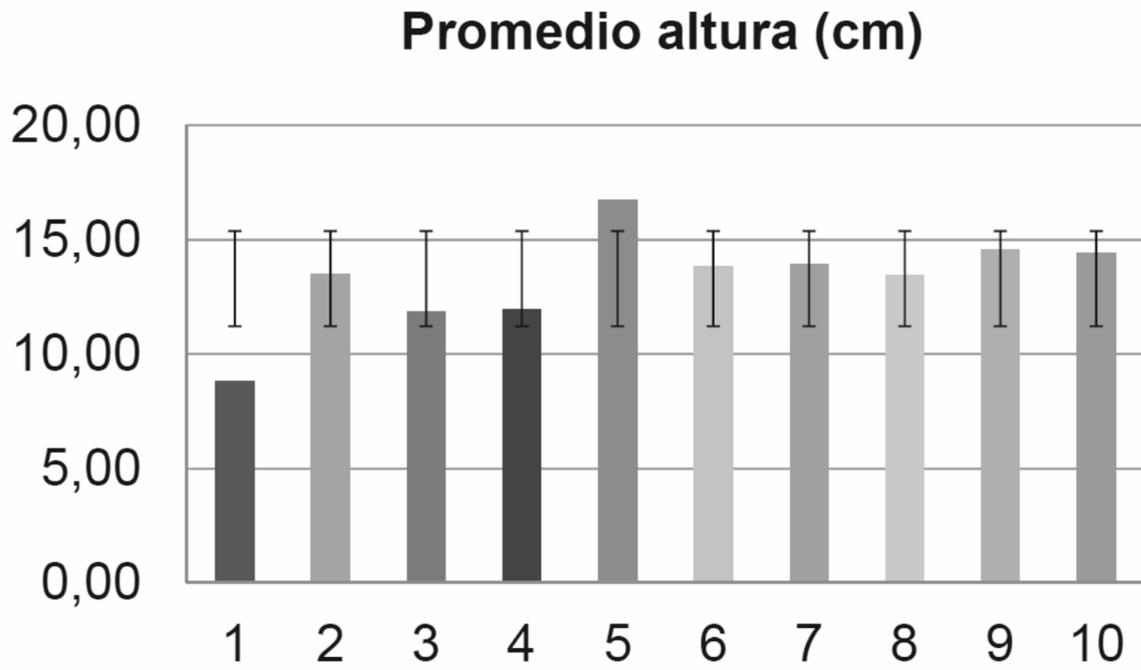


Fig. 7

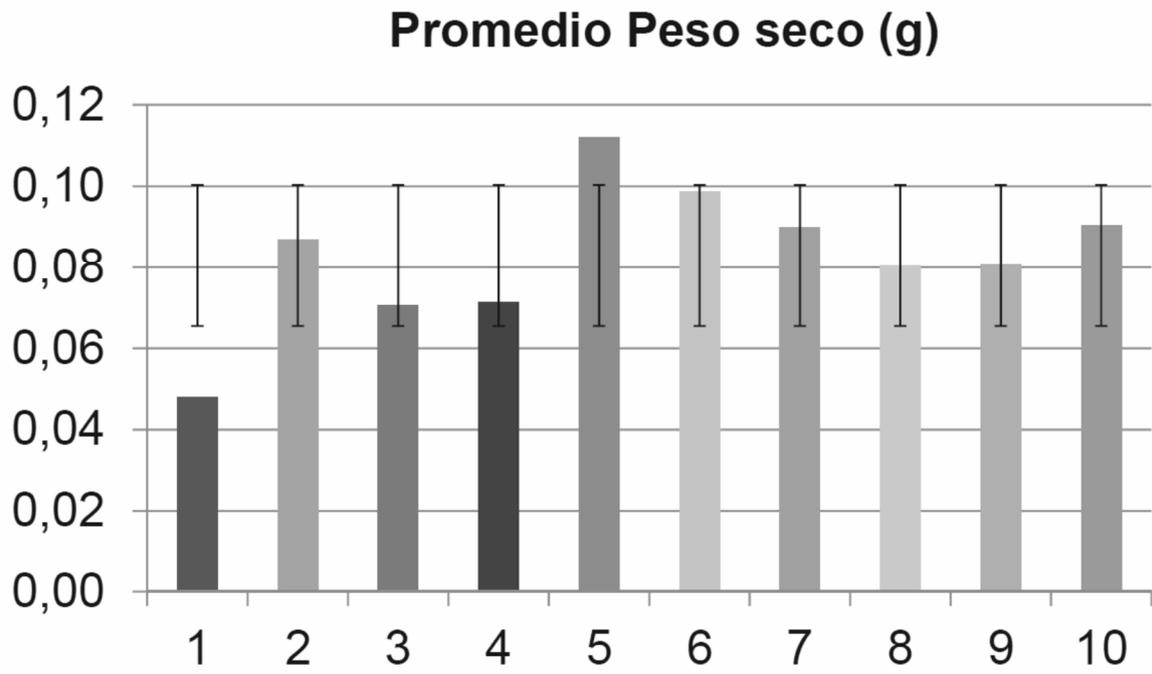


Fig. 8

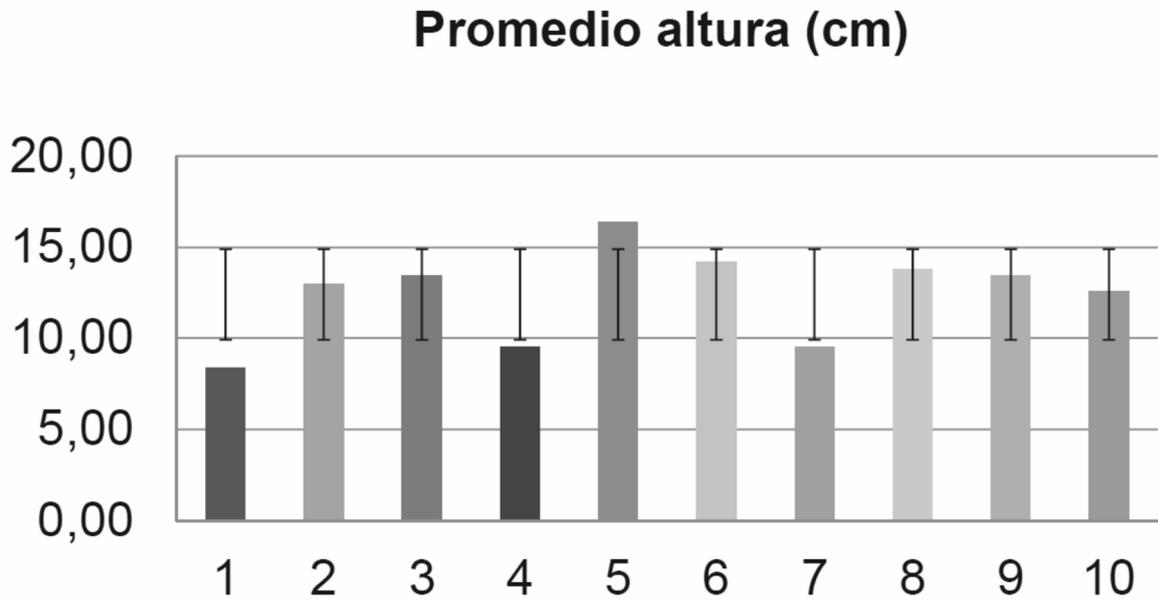


Fig. 9

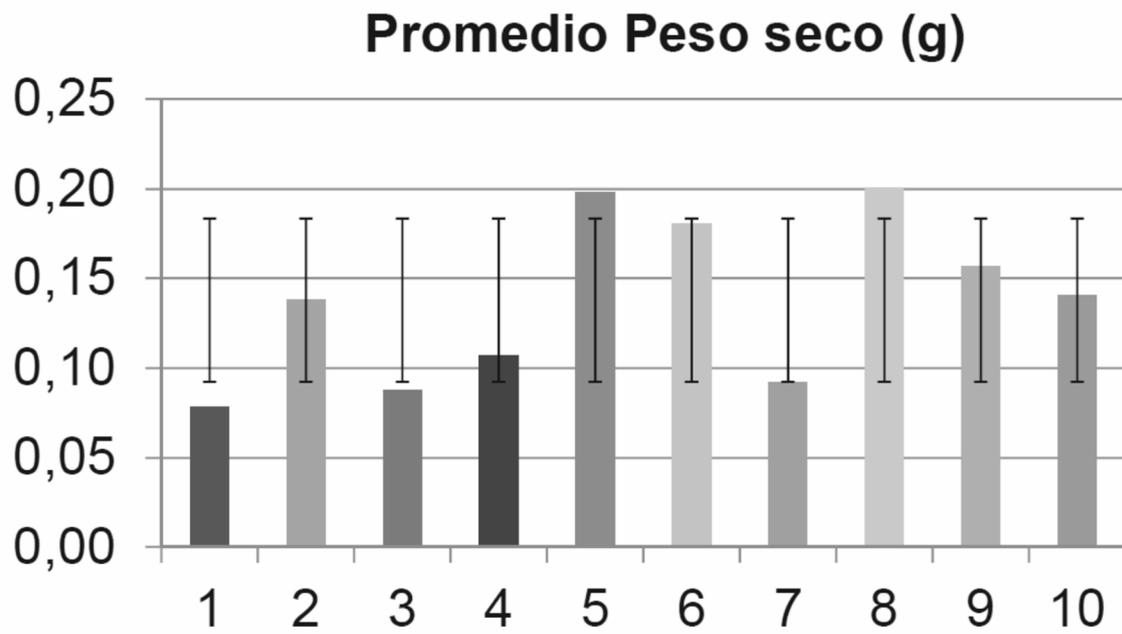


Fig. 10

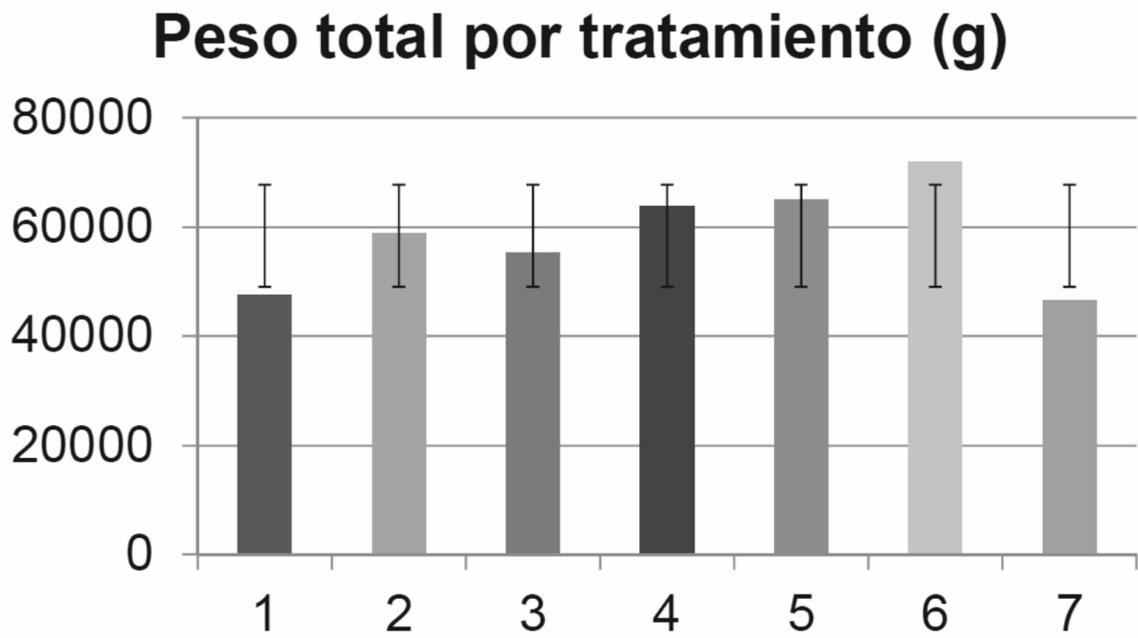


Fig. 11

Peso medio de los frutos por tratamiento (g)

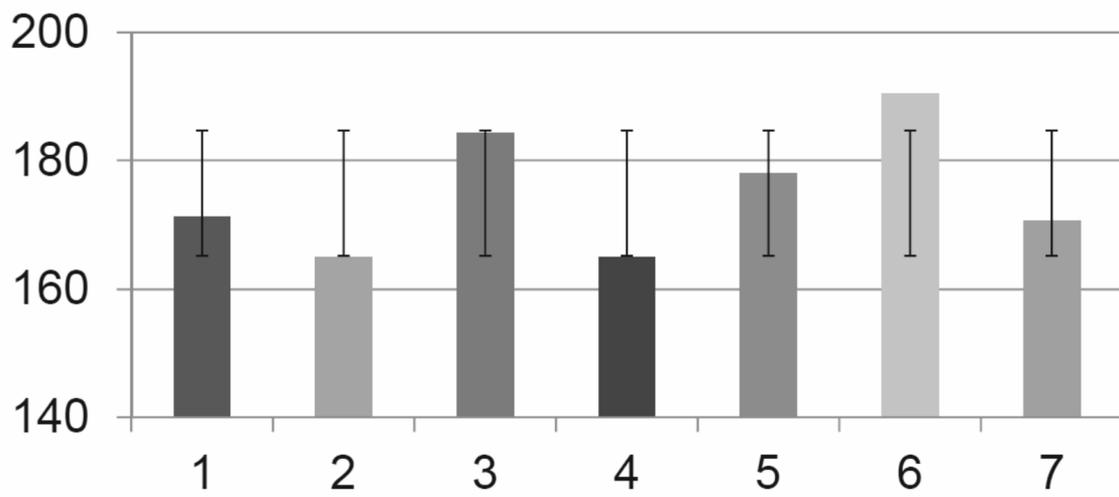


Fig. 12

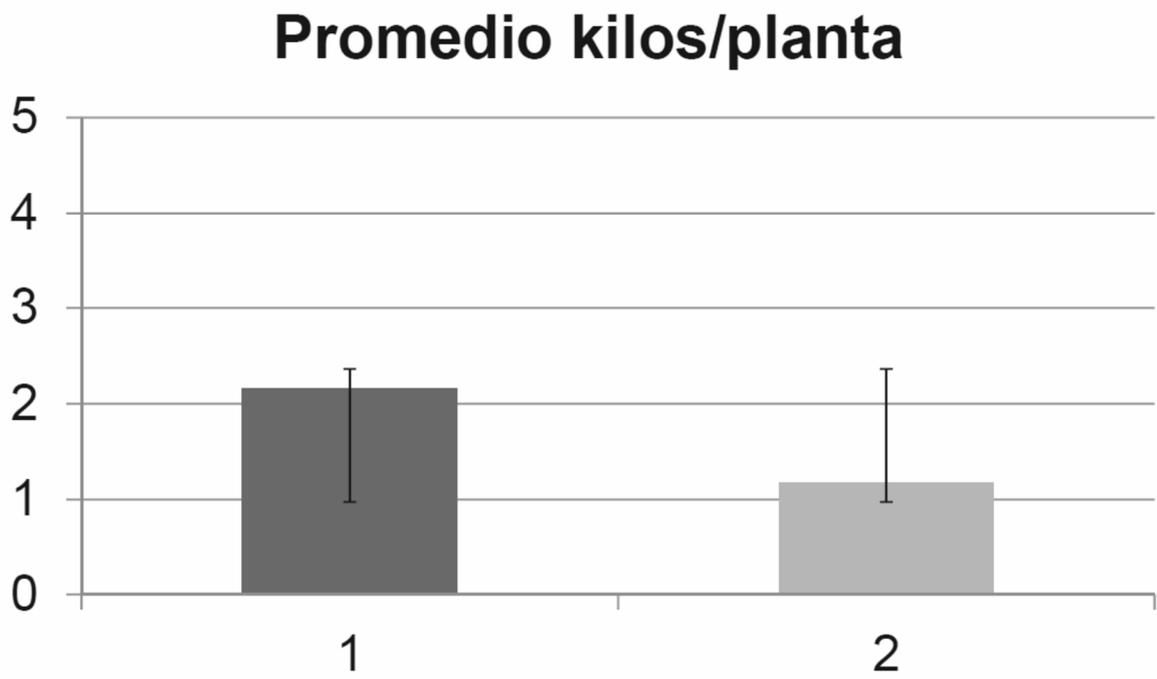


Fig. 13

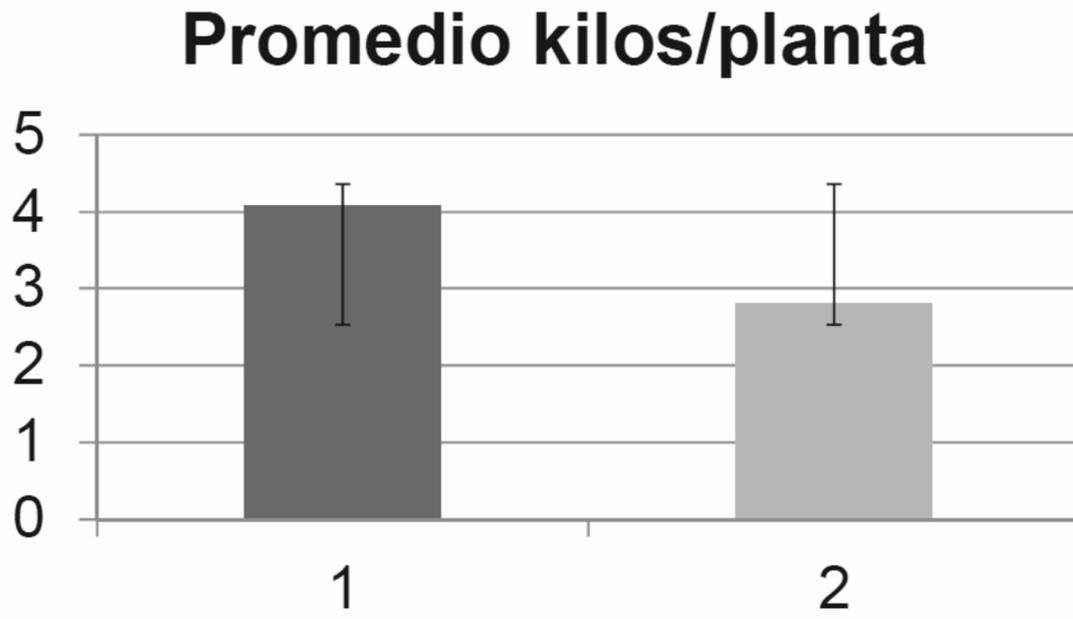


Fig. 14



②① N.º solicitud: 201700806

②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.08.2017

③② Fecha de prioridad: **31-08-2016**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C05F5/00** (2006.01)
C05F11/08 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	ES 2360318 A1 (MICROGAIA BIOTECH, S.L.) 03/06/2011, todo el documento.	1-6
Y	ALBRECHTOVA, J. et al. "Dual inoculation with mycorrhizal and saprotrophic fungi applicable in sustainable cultivation improves the yield and nutritive value of onion". THE SCIENTIFIC WORLD JOURNAL, 2012, Vol. Vol. 2012, N° Article ID 374091, Páginas 1-8, <DOI: 10.1100/2012/374091>. todo el documento.	1-6
Y	MWANGI, M.W. et al. Inoculation of tomato seedlings with <i>Trichoderma harzianum</i> and arbuscular mycorrhizal fungi and their effect on growth and control of wilt in tomato seedlings. BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, Abril-Junio 2011, Vol. 42, N° 2, Páginas 508-513, ISSN 1517-8382. resumen.	1-6

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 n.º:

Fecha de realización del informe
29.12.2017

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/2

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

C05F

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, HCAPLUS, BIOSIS