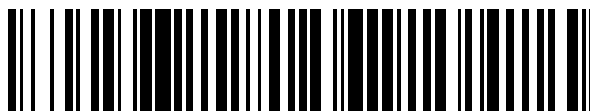


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 528**

51 Int. Cl.:

C02F 1/78 (2006.01)

A01N 59/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.01.2017** **E 17150031 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019** **EP 3192371**

54 Título: **Método para la desinfección de suelos agrícolas**

30 Prioridad:

18.01.2016 ES 201630043

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

21.06.2019

73 Titular/es:

AGROZONO, S.L. (100.0%)

Autovía de Ademuz, salida 12

46184 San Antonio de Benageber, Valencia, ES

72 Inventor/es:

VILLANUEVA DECODES, EMILIO JESÚS

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 717 528 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

Método para la desinfección de suelos agrícolas

5 **Sector de la técnica**

La presente solicitud de patente describe un método para desinfectar suelos y otros sustratos de cultivo agrícola mediante la utilización de ozono, más específicamente el uso de agua ozonizada generada en el lugar y momento de su aplicación.

10

Antecedentes

El cambio climático, el aumento de la población, y la inminente escasez de recursos naturales, hacen necesario cambiar los modelos de producción agrícola tradicionales y sustituirlos por sistemas de producción más sostenibles.

15

Por otro lado, desde 1840 se sabe que el ozono es el oxidante más potente que existe. Adicionalmente, su eficiencia como agente germicida y bactericida ha sido también demostrada con diversos estudios. En agricultura, se ha demostrado que el ozono aporta beneficios adicionales, tanto para el cultivo como para el cultivador, tales como: mayor crecimiento de las plantas, menor tiempo de maduración del fruto, mayor producción y sabor, y menor riesgo de enfermedades.

20

Hasta hace poco se ha permitido el uso Bromuro de metilo, compuesto muy eficaz y ampliamente conocido. Desde su prohibición, se están empleando otros productos químicos registrados como Cloropirrina, 1-3 Dicloropropeno o mezcla de ambos (Agrocelhone), Metam-sodio, Metam-potasio, Metil tioisocianato. Sin embargo, todos estos productos deben ser manipulados por personal acreditado según el Real Decreto 1311/2012, son peligrosos para las personas, el medio ambiente, en especial aguas superficiales y subterráneas, y el plazo de seguridad para las plantaciones es de más de un mes, debiendo tener durante ese tiempo el suelo improductivo.

25

Por otro lado, los métodos de desinfección utilizados hasta la fecha en agricultura utilizan aditivos químicos que originan residuos. Este no es el caso en la utilización de ozono para desinfectar suelos o sustratos de uso agrícola y, por lo tanto, no es necesario establecer un plazo de espera hasta la puesta en cultivo.

30

Sin embargo, la inestabilidad del ozono en el medio hace que no sea posible su almacenamiento y que éste deba producirse bajo demanda en el lugar de aplicación, lo que requiere una elevada demanda energética, lo que supone un gran inconveniente. Por ese motivo, hasta la fecha no se conocen métodos que permitan una desinfección eficaz del suelo utilizando ozono.

35

La generación artificial de ozono generalmente se realiza mediante la activación del oxígeno del aire por descargas eléctricas de alto voltaje. Esta energía eléctrica rompe la molécula de oxígeno, recombinando sus átomos para formar OZONO. Del mismo modo que lo hace la Naturaleza en las tormentas.

40

La liberación de energía al generar ozono es un proceso endotérmico, cuya energía proviene de la descarga eléctrica. De la misma forma, el ozono se descompone espontáneamente en oxígeno diatómico, con liberación del exceso de energía, por lo cual debe generarse en el momento y lugar de su empleo inmediato. Para ello se emplean los equipos denominados "ozonizadores" o generadores de ozono.

45

Desde finales del siglo 19, se vienen estudiando las propiedades desinfectantes y antisépticas del ozono y desde entonces se viene utilizando con gran eficacia en tratamientos ambientales. Su capacidad para romper moléculas con doble enlace y anillos aromáticos mediante el mecanismo denominado ozonólisis, hacen que el ozono tenga muchas aplicaciones, entre ellas, como bactericida, viricida, fungicida y deodorante; destruyendo con gran rapidez estreptococos, estafilococos, colibacilos, etc., así como las más energéticas toxinas difterianas y tetánicas.

50

Generalmente, el ozono se utiliza para llevar a cabo una o más de las siguientes acciones fundamentales funciones: microbicida, deodorante y oxigenante. Entre ellas, la actividad microbicida es quizás la propiedad más importante del ozono. Debido a sus propiedades oxidantes, el ozono puede ser considerado como uno de los agentes microbicidas más rápidos y eficaces que se conoce. Su acción posee un amplio espectro que engloba la eliminación de bacterias, hongos, virus y nematodos.

55

Adicionalmente, el ozono también se suele utilizar por su actividad deodorante, siendo de gran utilidad en todo tipo de locales de uso público y en el tratamiento de ciertos olores de origen industrial, olor a personas, humedad, tabaco, comidas, etc. Por un lado, el ozono oxida la materia orgánica (ozonólisis) y, por otro lado, ataca a los microbios que se alimentan de ella. Existe una amplia gama de olores que pueden ser atacados por el ozono.

60

En las grandes ciudades, donde existen gran cantidad de locales cerrados y poco ventilados, es con mucha frecuencia apreciable el enrarecimiento del aire como consecuencia de una carencia de oxígeno, la cual habitualmente identificamos como aire viciado. El ozono, por su mayor poder oxigenante, contribuye a mejorar la

65

eficiencia de las células de los organismos superiores en cuanto al aprovechamiento del oxígeno disponible, mediante la estimulación de varias enzimas que intervienen en estos procesos. Además, la descomposición del ozono es necesariamente en oxígeno, que se ubicará allí donde haya penetrado el gas ozono, en el aire, en el agua, o bajo tierra.

Tal como se ha mencionado anteriormente, la acción de desinfección del ozono se produce por oxidación. Más específicamente, la acción de desinfección del ozono se produce en condiciones de pH bajo por oxidación molecular y se produce en medios de pH elevado por oxidación mediante hidroxilos. Debido a estas propiedades oxidantes, el ozono está considerado como uno de los agentes microbicidas más rápido y eficaz que se conoce.

Como método alternativo a la utilización de ozono, en el estado de la técnica también se conocen métodos de desinfección basados en el uso de cloro. En este tipo de procesos, la acción desinfectante se produce cuando el cloro se extiende por las paredes celulares y oxida la enzima y, en consecuencia, son métodos de desinfección lentos. Sin embargo, los métodos de desinfección basados en ozono resultan ventajosos, ya que en estos métodos las membranas celulares se destruyen o descomponen en un proceso muy rápido donde, como ventaja adicional, el ozono se inactiva transformándose en oxígeno. De forma más específica, el ozono actúa sobre la pared celular del microorganismo degradándola lo que crea un "agujero" por el que pierde su fluido celular. La desinfección mediante ozono se denomina bacteriólisis.

Adicionalmente, los tratamientos basados en ozono requieren una dosis residual de desinfectante y un periodo de aplicación significativamente menor que en métodos de desinfección basados en aditivos químicos tal como el cloro. Así, generalmente, es necesaria una dosis de ozono residual de 0,1 mg/l durante 5 segundos, frente a las 4 horas necesarias para el cloro. También se ha determinado que se necesitan ppm de ozono durante cuatro minutos para eliminar microorganismos. El ozono también puede matar el 99 % de 60.000 coliformes/ml en aguas contaminadas en 2,8 segundos con una dosis de ppm, con la misma dosis de cloro se necesitan 15.000 segundos.

Otra ventaja significativa de utilizar ozono en la eliminación de microorganismos es que no se producen resistencias debido a que su mecanismo de acción se basa en la ruptura de la pared celular. Generalmente, las bacterias de espora aeróbica se desinfectan más fácilmente que la bacteria de espora anaeróbica. La eficacia de la desinfección en solución es más elevada frente a la bacteria del ácido láctico y, por lo tanto, también frente a la levadura de los hongos.

En la Figura 1 vemos el tiempo necesario que el patógeno ha de estar en contacto con el ozono, ya sea en el aire o mezclado con agua, para ser destruido.

Tal como se ha mencionado anteriormente, las propiedades desinfectantes del ozono son ampliamente conocidas.

Kazuhiro Fujiwara et al. se refieren al efecto de agua ozonizada en la población de *Fusarium oxysporum* (Science and engineering, vol. 28 n.º 2, pág. 125-127, 1 mayo, 2006).

El documento EP1 671 528 se refiere al tratamiento de suelos con ozono. También se conocen métodos para desinfectar el aire o agua utilizando este compuesto. Sin embargo, aunque en ocasiones se ha utilizado agua desinfectada con ozono como agua de riego, hasta el momento no se conoce un método efectivo para desinfectar suelos y otros sustratos de cultivo agrícola utilizando ozono como desinfectante.

Descripción

En un primer aspecto, la presente solicitud de patente se refiere a un método para desinfectar suelos u otros sustratos de cultivo agrícola, caracterizado porque comprende:

- obtener un suelo u otro sustrato de cultivo agrícola a su capacidad de campo;
- tratar el suelo o sustrato a capacidad de campo de la etapa anterior con agua ozonizada que contiene mín. 2 ppm de ozono, preferentemente entre 5 y 6 ppm de ozono, donde el agua ozonizada se prepara in situ con un equipo de producción de ozono conectado al suministro de agua con un pH entre 5,0 y 8,5, preferentemente el tratamiento con ozono se aplica durante entre 1 h 30 min y 2 horas; y
- dejar transcurrir entre 30 min y 24 horas desde el tratamiento con ozono; e
- inocular el suelo o sustrato agrícola desinfectado con al menos una especie de microorganismo beneficioso.

La utilización de ozono en la desinfección de suelos implica una serie de problemas técnicos que no se habían solucionado hasta el momento. Más específicamente, no se conocía un sistema efectivo para producir la cantidad de ozono necesaria para el tratamiento del terreno de una forma económicamente viable. Por otro lado, debido a que la vida útil del ozono es de pocos minutos, es necesario que la producción de ozono se pueda realizar con movilidad, es decir, que se pueda producir el ozono en el lugar de aplicación y durante el tratamiento. En relación con lo anterior, para conseguir una mayor efectividad del tratamiento de desinfección, se prefiere que el equipo de producción de ozono sea de pequeñas dimensiones, capaz de acceder a los cabezales de riego sin dificultad.

En el método de desinfección de suelos u otros sustratos de cultivo agrícola que se describe en esta solicitud de patente, el ozono en forma de gas se mezcla íntimamente con el agua de riego hasta saturar el agua con ozono gas, permitiendo así su transporte efectivo hasta las capas más profundas del suelo. De forma preferida, la mezcla de agua y ozono tiene lugar con ozono gas en forma de nanoburbujas. Así, en el método de la presente invención se obtiene una movilidad del ozono mucho mayor en el sustrato que si se inyectara ozono gas directamente, por lo que su puesta en práctica es mucho menos complicada y costosa.

En la presente invención se entiende por la frase "otros sustratos de cultivo agrícola" aquellos sustratos utilizados en agricultura hidropónica, es decir, cultivos donde las raíces crecen en un medio artificial formado por diversos materiales permeables con capacidad de retener humedad y nutrientes.

El equipo de producción de ozono que se utiliza en el método de desinfección que se describe en la presente invención se puede desplazar al lugar de tratamiento y, además, permite la modificación de parámetros tal como:

- la concentración de ozono producido, en función de la carga de oxígeno,
- la producción de ozono en peso, en función de la intensidad de corriente empleada,
- el tiempo de aplicación del tratamiento de ozonización,
- el porcentaje de mezcla agua/ozono y el tamaño de las burbujas de gas en la mezcla,
- la presión y el caudal de agua de riego en la salida del equipo.

Esta versatilidad permite adaptar cada tratamiento a las condiciones específicas del suelo o sustrato a tratar, en particular, la estructura del suelo y el tipo y grado de la infección a tratar, así como también permite adaptar las condiciones del tratamiento a las calidad del agua de riego que se va a utilizar.

En realizaciones preferidas del método de la presente invención, el equipo de producción de ozono comprende dos partes principales: en una de ellas se produce el ozono a partir de oxígeno y, en la otra, el ozono se inyecta a la red de agua de riego, pasando posteriormente a un tanque de mezclado.

En el método para desinfectar suelos y sustratos de cultivo agrícola que se describe en esta solicitud de patente resulta especialmente ventajoso la utilización de los equipos de ozonización AGR-60, con un caudal de trabajo de 3000 l/h, o AGRZ-800, con un caudal de trabajo entre 10.000-45.000 l/h y capaz de tratar superficies de cultivo de 1 Ha.

Un problema adicional relacionado con la utilización de ozono para desinfectar suelos o sustratos de uso agrícola es la baja solubilidad del ozono en agua, si bien esta solubilidad es mayor a la del oxígeno, no deja de ser complicada, como la de cualquier gas mezclado con un líquido.

Para solucionar este problema técnico y conseguir llegar a la saturación del agua de riego con gas ozono, el método para desinfectar suelos u otros sustratos agrícolas de la presente invención comprende la utilización de un tanque de mezclado, donde se disminuye el tamaño de las burbujas generadas al inyectar el gas en el agua de riego hasta conseguir las denominadas nanoburbujas. De este modo, la carga de gas ozono que lleva cada litro de agua es muy superior a la que se podía alcanzar hasta la fecha, permitiendo el uso de un menor número de reactores generadores de ozono, así como un menor consumo eléctrico y una disminución en el tamaño del equipo necesario para aplicar el tratamiento, permitiendo la movilidad del mencionado equipo.

Para la obtención de las nanoburbujas de ozono se debe conseguir una recirculación del agua mezclada con ozono a través de unos tamices cerámicos, con una presión entre 1 y 6 atm, en función del caudal de agua de riego. Por ejemplo, para un caudal de 40.000 l se necesita una presión de 3 atm en el mezclador. Esta presión y caudal se puede regular automáticamente mediante una válvula automática pilotada.

La utilización de ozono en concentraciones bajas, en particular entre 0,4 y menos de 2 ppm, permite desinfectar el agua usada para el tratamiento, puesto que el ozono no actúa solo como desodorizante y oxidante de las sustancias orgánicas disueltas, sino también como desinfectante.

Tal como se ha mencionado anteriormente, el ozono es un agente oxidante y un germicida. En consecuencia, se puede utilizar para la oxidación de materia orgánica presente en el agua, dando lugar a olor y color en el agua tratada. El ozono se usa cada vez más como agente oxidante por su eficiencia, su potencial REDOX es de 2,07 eV. Gracias a su potencial oxidante el ozono tiene la ventaja de reducir el tiempo que normalmente se requiere para la desinfección.

La utilización de este tipo de agua ozonizada aporta al cultivo agua de calidad, libre de patógenos, pero carente de capacidad desinfectante en el suelo, ya que la baja carga de ozono se ve inactivada rápidamente al contacto con la materia orgánica presente en el suelo. Así, el empleo de agua con ozono a bajas concentraciones (inferior a 2 ppm), ya sea para riego por goteo, como nebulización o micro-aspersión, aporta agua libre de patógenos, lo que permite crecer a las plantas en un medio favorable y aséptico para el cultivo. Sin embargo, estas condiciones tienen una persistencia muy breve, por lo que se precisa regar con este sistema de forma prácticamente continua, lo que impide

la colonización de microorganismos beneficiosos.

Sin embargo, el método que se describe en esta solicitud de patente permite desinfectar un suelo u otro sustrato de cultivo agrícola mediante su tratamiento con agua que contiene una cantidad suficientemente elevada de ozono disuelto, en particular, contiene una cantidad igual o superior a 2 ppm. De esta forma, el método de la presente invención permite conseguir, mediante aplicaciones puntuales del tratamiento, no solo la desinfección del agua de riego, sino también de las conducciones utilizadas y del suelo o sustrato de cultivo agrícola tratado, ya que este método permite que el agua ozonizada llegue al suelo y penetre en profundidad manteniendo su carga de ozono y, por tanto, su poder desinfectante.

El suelo o sustrato a tratar debe encontrarse en capacidad de campo antes de realizar el tratamiento con ozono. Por ello, de ser necesario, se aplica agua previamente al suelo o sustrato hasta alcanzar su capacidad de campo, cantidad que dependerá de las características y estructura del suelo, por ejemplo, arenoso, arcilloso; dependerá del cultivo existente o aquellos a implantar; y dependerá del sistema de riego empleado y de los hábitos de riego del agricultor.

El ozono en forma de gas no tiene prácticamente movilidad en el suelo, ya esté el suelo compactado o aireado. Una vez mezclado el ozono con el agua de riego se extiende con facilidad sobre un suelo en capacidad de campo, alcanzando los extremos del bulbo de riego, en el caso de emisores, o las capas más profundas, en el caso de aspersión, rápidamente.

La vida útil del ozono a una temperatura del agua de 15 °C es de 30 minutos, y a 25 °C es de 15 minutos, por lo que hemos de conseguir que el ozono producido recorra las tuberías hasta el emisor y se mueva por el terreno en capacidad de campo hasta el exterior del bulbo de riego antes de que se degrade y transforme en oxígeno. Los inventores han observado que, al aplicar el método de la presente invención, el tiempo necesario para que drene agua con ozono en un cultivo hidropónico es inferior a esa vida útil.

En realizaciones preferidas de la presente invención, el tratamiento con ozono tiene lugar durante un periodo de tiempo entre 1 h 30 min y 2 horas, de esta forma se garantiza que el agua con carga desinfectante llegue hasta los límites del bulbo de riego, consiguiendo la desinfección de los microorganismos existentes.

Teniendo en cuenta que la desinfección con ozono no genera resistencias por el modo de acción, el método de la presente invención permite conseguir la desinfección total del suelo o sustrato tratado. Una vez terminado el tratamiento con ozono, el método comprende inocular al menos una especie de microorganismo beneficioso que colonice de nuevo ese espacio vacío e impidan así el acceso al mismo de patógenos oportunistas. Preferentemente, estos microorganismos beneficiosos se seleccionan del grupo que consiste en *Trichoderma*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* y una combinación cualquiera de los anteriores.

La inoculación con microorganismos beneficiosos tiene lugar entre 30 min y 24 horas después de finalizar el tratamiento con ozono. El plazo mínimo de 30 min permite la degradación del ozono residual en oxígeno antes de la inoculación. Por otro lado, la aplicación de estos microorganismos antes de 24 horas, permite evitar que la zona tratada quede expuesta a una rápida entrada de patógenos oportunistas que, pueden llegar a ser más agresivos y dañinos que antes de desinfectar, dado que no habrá microorganismos beneficiosos que neutralicen sus efectos.

La aplicación de agua en las diferentes etapas del método que se describe en esta solicitud de patente puede realizarse por cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia, preferiblemente mediante riego localizado o aspersión. En particular, se prefiere que el aporte de agua con ozono tenga lugar mediante riego por goteo al suelo, ya que de esta forma se produce una acción desinfectante más efectiva, eliminando bacterias, hongos, virus y nematodos inicialmente presentes en el suelo o sustrato a tratar. Preferentemente, los microorganismos beneficiosos se aplican preferentemente en el bulbo desinfectado.

En otras realizaciones preferidas, la inoculación con microorganismos tiene lugar mediante un inyector situado en el equipo de ozonización.

La eficacia de la desinfección del patógeno está influenciada por el tiempo de contacto, la concentración de ozono, la temperatura del agua utilizada como vía de movilidad, el pH y las sustancias orgánicas e inorgánicas disueltas. Así pues podemos afirmar que el poder de la desinfección aumenta con un pH bajo (preferentemente entre 5,0 y 7,0; siendo el óptimo un pH entre 5,6 y 6,5) y con una temperatura del agua baja. Cuando menor es la temperatura mejor es la disolución del gas en el agua, siendo preferible un intervalo entre 8 °C y 25 °C, más preferentemente entre 10 °C y 20 °C, siendo la temperatura óptima 15 °C.

En otras realizaciones preferidas, el agua utilizada en el método que se describe en esta solicitud de patente, en particular, el agua de riego utilizada en la etapa de ozonización, está exenta de aditivos tales como abonos minerales o materia orgánica. En el método de la presente invención, el tratamiento con agua ozonizada es más efectivo cuando los niveles de materia orgánica en las tuberías son bajo (preferentemente, se deben alcanzar valores REDOX del agua entre 600 mV y 1100 mV), la temperatura del suelo y agua son también bajos

(preferentemente, entre 10 y 20 °C) y el pH se encuentra preferentemente entre 5,0 y 7,0.

En otras realizaciones preferidas, el método para desinfectar suelos u otros sustratos para el cultivo agrícola se realiza de forma puntual, pudiendo realizarse antes o durante el cultivo. También es posible realizar tratamientos repetidos de ozono, ya que este tratamiento no genera residuos perjudiciales para el cultivo.

Así, la utilización de ozono como desinfectante en el método para desinfectar suelos u otro tipo de sustratos para cultivo agrícola de la presente invención presenta varias e importantes ventajas. Por un lado, debido a sus propiedades oxidantes, el ozono está considerado como uno de los agentes microbicidas más rápidos y eficaces que se conocen. Adicionalmente, la utilización de ozono no contamina el suelo o sustrato tratado, ni deja residuos perjudiciales. Al contrario, como su producto de degradación es el oxígeno, la utilización de ozono favorece el desarrollo radicular y el crecimiento vegetal.

Sin embargo, el ozono generalmente se degrada muy rápidamente lo que dificulta enormemente la realización de tratamientos basados en este compuesto. Por ejemplo, en condiciones de agua sin materia orgánica, pH 7 y una temperatura del agua de 15 °C, la degradación del ozono en oxígeno se produce aproximadamente a los 30 min de generarse. Por este motivo, resulta especialmente ventajoso que el método de la presente invención permita la producción de la cantidad necesaria de ozono en el momento y el lugar donde se precisa su acción desinfectante.

El método que se describe en esta solicitud de patente puede aplicarse a suelos u otros sustratos sin cultivo en producción. En estos casos, el método preferentemente comprende las siguientes etapas:

- preparar el suelo o sustrato para la plantación;
- obtener el suelo o sustrato a su capacidad de campo;
- tratar el suelo o sustrato a capacidad de campo de la etapa anterior con agua ozonizada que contiene mín. 2 ppm de ozono, donde el agua ozonizada se prepara in situ con un equipo de producción de ozono conectado al suministro de agua con un pH entre 5,0 y 8,5;
- dejar transcurrir entre 30 min y 24 horas desde el tratamiento con ozono;
- inocular el suelo o sustrato agrícola desinfectado con al menos una especie de microorganismo beneficioso; y
- plantar el vegetal a cultivar.

La etapa de preparación del suelo o sustrato para la plantación puede comprender realizar las labores de descompactación y formación de caballones o mesetas, instalar la red de riego y, si se precisa, instalar el acolchado si se precisa.

Preferentemente, el tratamiento con agua ozonizada comprendido en el método de desinfección de suelos u otros sustratos para cultivo agrícola que se describe en esta solicitud de patente comprende la aplicación, mediante la red de riego en el bulbo desinfectado, de microorganismos beneficiosos que colonicen nuevamente el suelo de cultivo e impidan la recolonización por parte de patógenos.

La plantación puede realizarse con los sistemas habituales, incluso la colocación de túneles o acolchados que se precisen para el normal desarrollo del cultivo.

El método de la presente invención ha mostrado ser eficaz para desinfectar suelos frente a hongos fitopatógenos tales como, por ejemplo *Sclerotinia sp*, *Fusarium oxysporium* y *Phytophthora citrophthora*. Más específicamente, en ensayos realizados se obtuvo una desinfección del 100 % frente a los hongos fitopatógenos mencionados anteriormente.

Adicionalmente, este método de desinfección también resulta eficaz frente a poblaciones de bacterias mesófilas patógenas tales como, por ejemplo, *Erwinia amylovora* y *Clavibacter michiganensis*. En los ensayos realizados respecto a estas bacterias se obtuvo una mortandad inferior al 50 % tras una primera aplicación de agua ozonizada. Posteriormente, tras una segunda aplicación, se mantuvo una reducción de al menos el 50 %.

Como resultado de la reducción de las poblaciones de microorganismos que se consigue con el método de desinfección de la presente invención, se consigue un incremento en el desarrollo vegetativo de las plantas cultivadas en dicho suelo o sustrato.

Así, el método de la presente invención permite utilizar ozono como desinfectante del suelo o sustrato, ya que permite generar de forma efectiva la cantidad necesaria de ozono en el lugar y momento en que se requiere. Por tanto, este método proporciona una alternativa viable a la desinfección de suelos agrícolas, como paso previo a la implantación del cultivo, evitando el uso de fitosanitarios, la contaminación y la acumulación de residuos en suelo y planta. Esto es debido a que el ozono tiene un gran poder oxidante, eliminando a los microorganismos ya que la liberación de radicales de oxígeno en grandes cantidades elimina la microbiota del suelo.

De forma alternativa, el método que se describe en esta solicitud de patente puede aplicarse a suelos u otros sustratos con cultivo en producción, tanto de hortalizas como de frutales. En estos casos, el método preferentemente

comprende las siguientes etapas:

- obtener el suelo o sustrato a su capacidad de campo;
 - tratar el suelo o sustrato de la etapa anterior con agua ozonizada que contiene mín. 2 ppm de ozono, donde el agua ozonizada se prepara in situ con un equipo de producción de ozono conectado al suministro de agua con un pH entre 5,0 y 8,5;
 - dejar transcurrir entre 30 min y 24 horas desde el tratamiento con ozono;
 - inocular el suelo o sustrato agrícola desinfectado con al menos una especie de microorganismo beneficioso.
- El método que se describe en esta solicitud de patente permite desinfectar suelos u otros sustratos de cultivo agrícola de forma instantánea, sin dejar residuos nocivos ya que el único subproducto resultante de la degradación del ozono en el suelo es el oxígeno, que es muy beneficioso para el desarrollo radicular y la implantación de microorganismos beneficiosos.
- Tanto en el empleo de desinfecciones químicas como en técnicas de Solarización, el tiempo de espera después de la desinfección necesaria para que ésta sea efectiva es de entre 20 y 60 días. De forma ventajosa, el método de desinfección de la presente invención permite la desinfección del suelo con el cultivo implantado, es decir, permite la aplicación de ozono al suelo o sustrato infestado de patógenos mientras los cultivos están creciendo sin dejar ningún tipo de residuo tóxico o que se pueda registrar en análisis del producto recolectado. La inoculación entre 30 minutos y 24 h de microorganismos beneficiosos será la encargada de regenerar el sistema radicular afectado.

También resulta ventajoso que, en caso de producirse una alta infección de patógenos durante el cultivo, el método de la presente invención puede realizarse varias veces, ya que no se generan residuos, ni afecta negativamente la vegetación. Así mismo, también es posible realizar varios tratamientos con ozono (varias aplicaciones de ozono) antes de proceder a la inoculación con los microorganismos beneficiosos.

Adicionalmente, el método de desinfección que se describe en esta solicitud de patente es altamente versátil, ya que puede aplicarse antes o después de la plantación, tras realizar una desinfección química por otro método conocido o sin haber realizado ningún tipo de desinfección previa.

Breve descripción de las figuras

- Figura 1: Un diagrama mostrando el efecto del agua con ozono sobre varios hongos, tales como *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* y *Monilinia fructicola*.
- Figura 2a: Una imagen mostrando los contenedores con sustrato utilizados en el ejemplo 1.
- Figura 2b: Una imagen mostrando el sistema utilizado en el ejemplo 1 para realizar la desinfección de un sustrato según el método de la presente invención.
- Figura 3a: Una gráfica mostrando la supervivencia de hongos fitopatógenos tras la 1ª aplicación del ejemplo 1. Se analiza la cantidad de hongos presente en el sustrato a tiempo cero (t=0) y 24 horas después de la aplicación (t=1), a 20 cm, 40 cm y 60 cm de profundidad.
- Figura 3b: Una gráfica mostrando la supervivencia de bacterias fitopatógenos tras la 1ª aplicación del ejemplo 1. Se analiza la cantidad de bacterias presente en el sustrato a tiempo cero (t=0) y 24 horas después de la aplicación (t=1), a 20 cm, 40 cm y 60 cm de profundidad.
- Figura 4a: Una gráfica mostrando la supervivencia de hongos fitopatógenos tras la 2ª aplicación del ejemplo 1. Se analiza la cantidad de hongos presente en el sustrato a tiempo cero (t=0), 1 día (t=1) y 30 días (t=30) después de la aplicación, a 20 cm, 40 cm y 60 cm de profundidad.
- Figura 4b: Una gráfica mostrando la supervivencia de bacterias fitopatógenos tras la 2ª aplicación del ejemplo 1. Se analiza la cantidad de hongos presente en el sustrato a tiempo cero (t=0), 1 día (t=1) y 30 días (t=30) después de la aplicación, a 20 cm, 40 cm y 60 cm de profundidad.
- Figura 5: Una imagen mostrando el estado de las plantas de tomate tras la primera aplicación del ejemplo 1: Fig. 5a: control; Fig. 5b: tratamiento con ozono.
- Figura 6: Una imagen mostrando el estado de las plantas de tomate tras la segunda aplicación del ejemplo 1. Fig. 6a: control; Fig. 6b: tratamiento con ozono.
- Figura 7: Puntos de muestreo recogidos en el ejemplo 3
- Figura 8: Imágenes mostrando: (A) muestra de suelo bajo la lupa; (B), (C) y (D) vistas en detalle de nematodos.
- Figura 9: Una gráfica mostrando la evolución de la población de nematodos en el suelo tras el tratamiento con ozono y tras la inoculación de microorganismos obtenido en el ejemplo 5.

Ejemplos

Ejemplo 1: Eficacia del tratamiento con ozono en la desinfección de suelos sin cultivo

El objetivo general del estudio era evaluar la eficacia del uso del ozono como estrategia en la desinfección de suelo. En particular, se pretendía estudiar el efecto del método de desinfección sobre plantas de tomate, y relacionar el poder oxidativo del ozono con la eliminación de patógenos a distinta profundidad.

Para conseguir los objetivos mencionados anteriormente, se infectó suelo sin cultivo con las especies fitopatógenas *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Erwinia*, *Phytophthora* y *Clavibacter*. El ensayo fue realizado en Lorca (Murcia). Tuvo lugar al aire libre en cubetas con suelo sin cultivar y donde previamente había sido cultivado tomate, pimiento y melón. Tras la realización de la primera aplicación del método de la presente invención, se trasplantaron plantas de tomate, *Lycopersicum esculentum*, evaluándose la respuesta de la planta a los tratamientos.

Los tratamientos testados fueron: T0 (control) y T1 (ozono). Tras la aplicación del método dos veces consecutivas, se realizó la inoculación de los siguientes microorganismos beneficiosos (mezcla denominada "formulado de microorganismos (1)": *Trichoderma* (4×10^8 UFC), *Bacillus* ($1,5 \times 10^8$ UFC), *Azotobacter* ($1,5 \times 10^8$ UFC) y *Pseudomonas* ($1,5 \times 10^8$ UFC).

El contenido microbiológico del suelo fue evaluado a diferente profundidad: 20, 40 y 60 cm, antes y después de las aplicaciones.

1.1 Protocolo de ensayo

Se instalaron contenedores de un volumen conocido de 1000 l ($1 \times 1 \times 1$ m) en campo. Por otro lado, se seleccionó y homogenizó sustrato procedente de invernadero con cultivo previo de melón, pimiento y tomate. Posteriormente, se llenaron los contenedores con este sustrato.

En laboratorio, se cultivaron *in vitro* las especies de:

- Bacterias fitopatógenas: *Erwinia amylovora* y *Clavibacter michiganensis*
- Hongos fitopatógenos: *Sclerotinia sp.*, *Fusarium oxysporium* y *Phytophthora citrophthora*

Cada microorganismo se cultivó en medio líquido hasta alcanzar una concentración de 10^8 ufc/ml. Para cada uno de las cubetas se preparó 1 litro de solución microbiana.

A continuación se inocularon los microorganismos patógenos en el sustrato, se realizaron riegos periódicos hasta alcanzar la capacidad del sustrato, se tomaron muestras a diferentes profundidades (20 cm, 40 cm y 60 cm) y se realizó el recuento de fitopatógenos en dichas muestras, para verificar la permanencia y presencia de fitopatógenos en el suelo.

Se realizó una primera aplicación del método de desinfección con ozono. Para ello se insertó el equipo de ozonización al sistema de riego y se ajustaron los parámetros de dicho equipo para conseguir agua ozonizada con mín. 2 ppm de ozono disuelto. Posteriormente, se dejó el suelo en reposo durante 30 min y se trasplantaron plantas de tomate, *Lycopersicum esculentum*. Posteriormente, se realizó una segunda aplicación del método de desinfección con ozono en las mismas condiciones indicadas anteriormente y, después de dejar reposar el suelo tratado durante 30 min se inoculó el formulado de microorganismo (1).

En la figura 2a se muestra la colocación de los contenedores en el campo, mientras que en la figura 2b se muestra el montaje realizado para insertar el equipo de ozonización utilizado al sistema de riego.

Para analizar el efecto del tratamiento en la desinfección del suelo, se tomaron muestras a diferentes profundidades (20 cm, 40 cm y 60 cm) y en diferentes fechas, y se analizó la carga microbiana en cada una de las muestras.

Tal como se ha mencionado anteriormente, una vez finalizada la primera desinfección, se trasplantaron plántulas de tomate en las cubetas para evaluar el "efecto residual" del tratamiento. Posteriormente, se realizó el estudio del desarrollo vegetativo de las plantas.

1.2 Tratamientos

Los tratamientos, aplicaciones y muestreos vienen referidos en la siguiente tabla:

Tabla 1: Tratamientos

Código	Descripción	Aplicación 1	Muestreo 1.1	Muestreo 1.2	
T0	Control		12-sep	16-sep	
T1	Ozono	15-sep	12-sep	16-sep	
Código	Descripción	Aplicación 2	Muestreo 2.1	Muestreo 2.2	Muestreo 2.3
T0	Control		14-oct	17-oct	14-nov
T1	Ozono	16-oct	14-oct	17-oct	14-nov

Tras la primera aplicación del método de desinfección, el 19 de septiembre de 2014, fueron trasplantadas 2 plantas

de tomate por contenedor. El efecto residual del ozono fue evaluado.

1.3 Tamaño experimental y diseño

- 5 El tratamiento control corresponde con el contenedor número 1. Dado que solo hay una repetición, durante los muestreos se tomaron 3 submuestras.

Tabla 2: Croquis del diseño experimental

Código	Descripción	Repeticiones	Código Contenedores
T0	Control	3	1,2,3
T1	Ozono (>2ppm)	3	4,5,6

1.4 Parámetros evaluados

Durante el transcurso del ensayo, los parámetros evaluados fueron:

- Caudal y ppm ozono a la salida.
- Evaluación microbiota del suelo (t=0; t=7 días y t=30 días).
- Relación de la profundidad con el posible efecto fungicida.
- Establecidas las plantas de tomate, se evaluó si los tratamientos causaban fitotoxicidad. Los parámetros que se observarán en el cultivo serán la aparición de necrosis y quemaduras en hojas y frutos.
- Desarrollo vegetativo del cultivo.

El efecto de los tratamientos (ozono, control) y su evaluación se determinó mediante el test de Student en el paquete estadístico SPSS. La prueba determina si las medias que arrojan los experimentos son significativamente diferentes con un nivel de confiabilidad ($P > 0.05$). Representados los resultados mediante diagramas de barras, en las tablas de resultados se muestra si existieron diferencias significativas (distinta letra) o si no existen evidencias de diferencias entre los tratamientos (misma letra).

1.5. Resultados

1.5.1 Caudal y Caudal y ppm ozono a la salida

Durante la primera aplicación, los datos recogidos son mostrados en la siguiente tabla:

Tabla 3: Lecturas ozono

Tiempo (minutos)	Equipos implicados	Descripción / Observaciones
0-120	Riego	Saturación de agua
15-20	Equipo de ozono Riego por goteo	Comprobación en 4 ocasiones del análisis para determinar los gramos de ozono por litro de agua. 2 ppm. Nivel mínimo para una buena desinfección
15	Lectura	2 ppm
55	Lectura	2,3 ppm
65	Lectura	2,89 ppm
115	Lectura	4,49 ppm en la salida directa de la bomba 3,92 ppm en el gotero

1.5.2. Evaluación de la población microbiana tras la Aplicación 1

En este apartado se describen los datos obtenidos. Como se explicó en el protocolo de ensayo, fueron tomadas muestras de suelo a distinta profundidad (20 cm, 40 cm y 60 cm) y se realizaron controles de calidad cuantificando el número de hongos y bacterias patógenas.

A. Hongos patógenos

Previo a la incorporación de los tratamientos y 24 horas después de la aplicación, la supervivencia de hongos patógenos fue evaluada. Analizados los datos por tratamiento (ver Figura 3a), encontramos que:

- En el tratamiento control: la carga microbiana fue similar antes y después en todas las profundidades testadas, salvo a 40 cm, donde se produjo un lavado.

- La aplicación de ozono supuso una reducción del 100 % a 20 y 60 cm de profundidad.

B. Bacterias patógenas

- 5 En cada una de las profundidades testadas (20 cm, 40 cm y 60 cm), ambos tratamientos redujeron las poblaciones de bacterias presentes en el suelo (ver figura 3b). En todos las profundidades evaluadas (salvo a 60 cm), las poblaciones de bacterias patógenas fueron inferior al testigo, siendo esta disminución inferior al 50 %.

1.5.3. Evaluación de la población microbiana tras la Aplicación 2

10

A. Hongos patógenos

- 15 Tal como se muestra en la figura 4a, la aplicación de ozono redujo un 100 % los hongos patógenos a una profundidad de 40 y 60 cm, manteniendo la efectividad de ambos productos y prologándose el efecto durante 30 días. A una profundidad de 20 cm, el tratamiento con ozono redujo la población un 100 %, apareciendo trazas de hongos un mes después, posiblemente debido a la contaminación del suelo por factores ambientales.

B. Bacterias patógenas

- 20 El estudio de los datos (ver figura 4b) muestra el poder desinfectante del ozono, aunque la reducción no fue total. Dada la velocidad de reproducción de las bacterias, se estima que tras desaparecer completamente el efecto residual de los productos, se alcanzarán poblaciones similares al control.

1.6. Fitotoxicidad en plantas de tomate

25

Tras la primera aplicación del tratamiento con ozono, se trasplantaron dos plantas de tomate en cada uno de los contenedores. El crecimiento de las plantas fue evaluado durante tres meses, finalizando el análisis de este parámetro en el 2 de enero debido a heladas en la zona (ver figuras 5a y 5b).

- 30 El crecimiento en plantas donde se había aplicado el tratamiento con ozono, mostró un desarrollo vegetativo vigoroso, debido al descenso de microorganismos patógenos; mientras que en plantas control, su desarrollo fue medio-bajo. Dos semanas después de la segunda aplicación, las plantas control murieron causa de la infección (ver figuras 6a y 6b).

1.7. Conclusiones

35

Los resultados obtenidos demostraron que el nivel de desinfección del ozono fue de un 100 % frente a los hongos fitopatógenos testados. Adicionalmente, las poblaciones de bacterias mesófilas patógenas disminuyeron su número tras la aplicación del desinfectante, con una mortandad inferior al 50 % tras la primera aplicación. Durante la segunda aplicación, se mantuvo la reducción del 50 %, con excepción de lo observado a una profundidad de 60 cm, donde la reducción alcanzó el 60 %.

40

Además, en las muestras tratadas con ozono, el desarrollo vegetativo de las plantas de tomate fue vigoroso debido a la reducción de las poblaciones de microorganismos., mientras que en las plantas de tomate cultivadas en contenedores control mostraron un crecimiento bajo-medio y acabaron muriendo debido a la infección de patógenos.

45

Como complemento, tras la primera aplicación se trasplantaron plantas de tomate en cada una de las repeticiones y se evaluó si la aplicación de ozono causaba fitotoxicidad. Tres meses después del trasplante, plantas tratadas con ozono presentaron un crecimiento y desarrollo vegetativo normal, mientras que las plantas control murieron consecuencia del ataque de patógenos presentes en el suelo.

50

Ejemplo 2: Desinfección de nematodos en pimiento var. padrón

- 55 El ensayo se realiza en una finca de Pimientos de Padrón en el mes de mayo de 2015 que presenta un alto grado de afección por nematodos y la propiedad pretende arrancar la plantación pues ya se da por perdida la producción. Sobre una superficie de 500 m² de invernadero, con un consumo de agua de 3000 l/h, se realiza la desinfección con ozono a una dosis de 6 ppm, revisando con las lecturas REDOX que en los emisores de goteo más alejados se obtiene una lectura de 1000 mV, partiendo de un valor en el agua de riego sin ozono de 185 mV.

- 60 Al finalizar el tratamiento se realiza la inoculación del formulado de microorganismos (1) (ver ejemplo 1). Siete días después de realizado el tratamiento se toman muestras de tierra para ver el nivel de infestación de nematodos, observando una disminución del 90 % de la población.

- 65 En particular, tras la desinfección a través de riego ozonizado en cultivo de Pimiento de padrón afectado por nematodos (Meloidogyne) en plena producción, se obtuvieron los siguientes resultados:

- Analítica anterior a la desinfección: *Meloidogyne* sp. 88 juveniles/100 cc suelo
- Analítica posterior a la desinfección: *Meloidogyne* sp. 8 juveniles/ 1 cc suelo.

La parte tratada de la finca se recuperó de los daños y siguió en producción hasta la fecha prevista para su arranque.

Ejemplo 3: Desinfección de nematodos en cultivo de cítricos (limoneros). Efecto de la ozonización e inoculación con microorganismos beneficiosos en el control de nematodos fitopatógenos de suelo

- El presente ensayo en cítricos se realizó una parcela con alto índice de infección por nematodos, durante los meses de mayo y septiembre de 2015. Se evaluó el efecto de dos aplicaciones de ozono y una aplicación final de una mezcla de microorganismos (formulado de microorganismos (2)) formado por: *Bacillus* ($1,5 \times 10^8$ UFC), *Azotobacter* ($1,5 \times 10^8$ UFC) y *Pseudomonas* ($1,5 \times 10^8$ UFC).
- Los parámetros estudiados fueron: evolución de la población de nematodos fitopatógenos, evolución de la población fúngica y tras la aplicación del formulado de microorganismos (2), se realizó un recuento del número de bacterias en suelo. Los resultados mostraron que la aplicación del ozono junto con los microorganismos beneficiosos redujo significativamente la población de nematodos fitopatógenos en suelo.
- Es objetivo de este ensayo fue evaluar la acción del ozono y microorganismos beneficiosos en el control de nematodos fitopatógenos en cítricos.

3.1. Material y métodos

- Sobre una parcela con alta infección por nematodos del género *Pratylenchus* sp, se seleccionaron 4 repeticiones. La figura 7 muestra los puntos de muestreo recogidos.

La fecha de aplicación de los productos fue:

- Ozono: se aplicó a una concentración de 5-6 ppm. Aplicaciones: 21 y 27 de mayo.
- Formulado de microorganismos (2) (Bionema Plus): Una única aplicación de una dosis de 20 l/ha tuvo lugar el 4 de junio.

Tabla 1 Muestreos

Muestreo	Descripción de la aplicación	Fecha
Muestreo 1	Previo a la aplicación	20-may
Muestreo 2	Tras la aplicación 1 de Ozono	21-may
Muestreo 3	Tras la aplicación 2 de Ozono	28-may
Muestreo 4	Tras la aplicación de Bionema Plus	23-sep

3.2. Conclusiones

- Los resultados han mostrado que la aplicación del ozono y la formulación de microorganismos (2) redujeron significativamente la población de nematodos fitopatógenos, disminuyendo desde 50 nem / g hasta 0,2 nem /g, población prácticamente inexistente.

Ejemplo 4: Evolución de nematodos en el suelo tras el tratamiento con ozono e inoculación de microorganismos

- Este ensayo se realizó en T.M. Benifaió (Valencia), en terreno franco-arcilloso. Los tratamientos se realizaron al final de un cultivo de hortalizas, previamente a realizar la nueva plantación de hortalizas tipo pepinos, tomates y pimientos.

- El terreno destacaba por su alto contenido de infección de nematodos, afectando gravemente a la producción del cultivo.

- Se aplicó el método para la desinfección de suelos que se describe en esta solicitud de patente, donde el tratamiento con agua de riego ozonizada (5,5 ppm de ozono) se realizó durante 2 horas, y la inoculación tuvo lugar mediante la aplicación del formulado de microorganismos (1) (ver ejemplo 1) colonizadoras 24 horas después de realizar la desinfección con ozono.

- Tal como puede observarse en la figura 9, antes de aplicar el tratamiento la muestra de suelo extraída presentaba 480 juveniles/ 100 cc de tierra. Tras realizar el tratamiento con ozono, se redujo la presencia de juveniles a 44/100 cc de tierra y 15 días después de realizar la inoculación con el formulado de microorganismos (1), la muestra

analizada presentaba 1 juvenil/100 cc de tierra.

Estos resultados muestran una disminución considerable del porcentaje de nematodos. Así mismo, también se puede observar un incremento en la cantidad de Saprófitos en 20 unidades/100 cc tierra.

- 5 Los diferentes ensayos realizados muestran que, tanto en terrenos desnudos como en terrenos con cultivos en producción, los mejores resultados se obtienen al combinar el tratamiento puntual con ozono (mínimo 2 ppm) en agua de riego, seguido de la inoculación con microorganismos beneficiosos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para desinfectar suelos u otros sustratos de cultivo agrícola, **caracterizado porque** comprende:

- 5 - obtener un suelo u otro sustrato de cultivo agrícola a su capacidad de campo;
- tratar el suelo o sustrato a capacidad de campo de la etapa anterior con agua ozonizada que contiene un mínimo de 2 ppm de ozono, donde el agua ozonizada se prepara in situ con un equipo de producción de ozono conectado al suministro de agua con un pH entre 5,0 y 8,5;
- dejar transcurrir entre 30 min y 24 horas desde el tratamiento con ozono; e
- 10 - inocular el suelo o sustrato agrícola desinfectado con al menos una especie de microorganismo beneficioso.

2. El método para desinfectar según la reivindicación 1, donde el contenido de ozono disuelto en el agua ozonizada es entre 5 y 6 ppm.

15 3. El método para desinfectar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el tratamiento con agua ozonizada se realiza por un periodo de tiempo entre 1 h 30 min y 2 horas.

 4. El método para desinfectar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el microorganismo beneficioso se selecciona del grupo que consiste en *Trichoderma*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* y una combinación cualquiera de los microorganismos anteriores.

20

5. El método para desinfectar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el agua se aplica por riego localizado.

25 6. El método para desinfectar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el suelo o sustrato no tiene cultivo en producción, y el método comprende las siguientes etapas:

- preparar el suelo o sustrato para la plantación;
- obtener el suelo o sustrato a su capacidad de campo;
- 30 - tratar el suelo o sustrato a capacidad de campo de la etapa anterior con agua ozonizada que contiene mín. 2 ppm de ozono, donde el agua ozonizada se prepara in situ con un equipo de producción de ozono conectado al suministro de agua con un pH entre 5,0 y 8,5;
- dejar transcurrir entre 30 min y 24 horas desde el tratamiento con ozono;
- inocular el suelo o sustrato agrícola desinfectado con al menos una especie de microorganismo beneficioso; y
- 35 - plantar el vegetal a cultivar.

7. El método para desinfectar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el suelo o sustrato con cultivo en producción, y el método comprende las siguientes etapas:

- 40 - obtener el suelo o sustrato a su capacidad de campo;
- tratar el suelo o sustrato de la etapa anterior con agua ozonizada que contiene mín. 2 ppm de ozono, donde el agua ozonizada se prepara in situ con un equipo de producción de ozono conectado al suministro de agua con un pH entre 5,0 y 8,5;
- dejar transcurrir entre 30 min y 24 horas desde el tratamiento con ozono; e
- 45 - inocular el suelo o sustrato agrícola desinfectado con al menos una especie de microorganismo beneficioso.

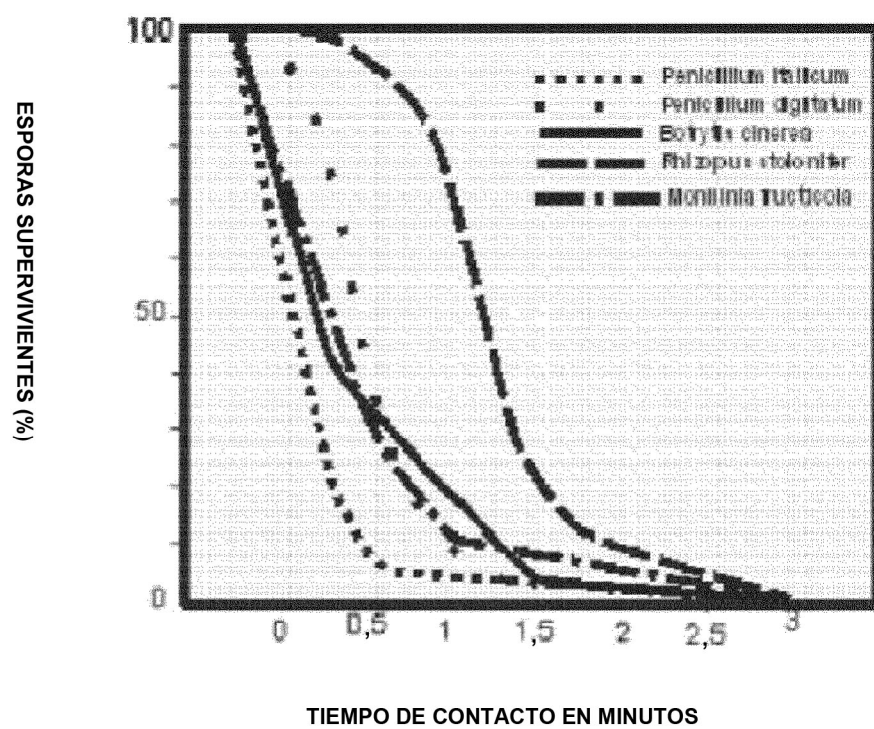


Fig. 1

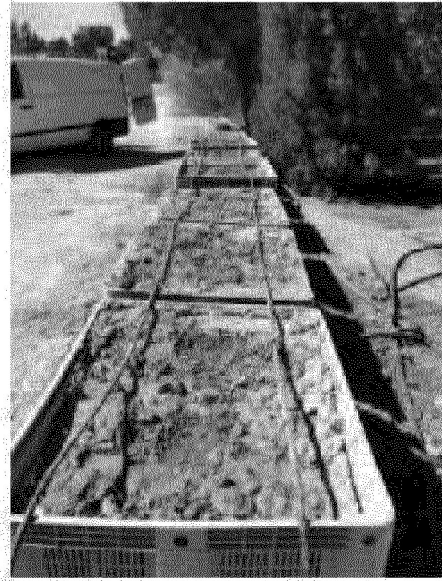


Fig. 2a

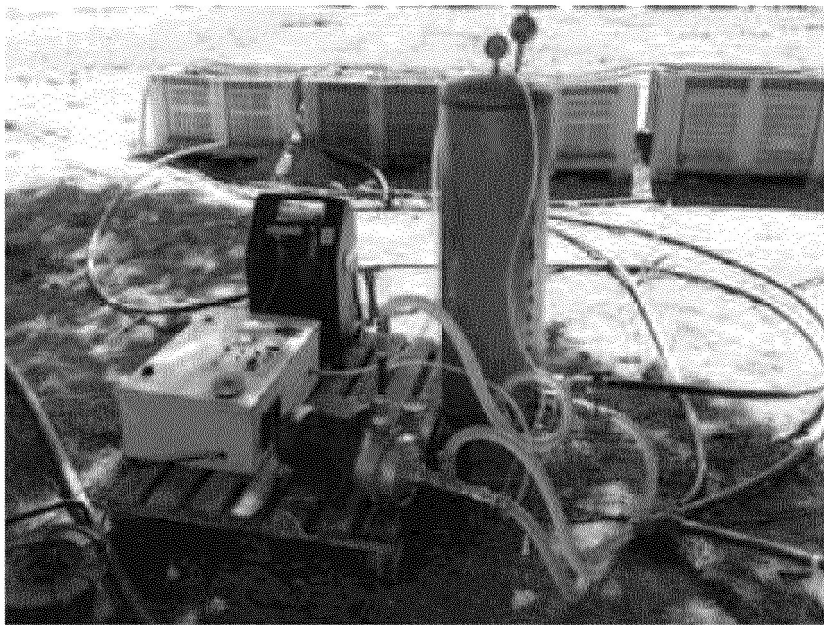


Fig. 2b

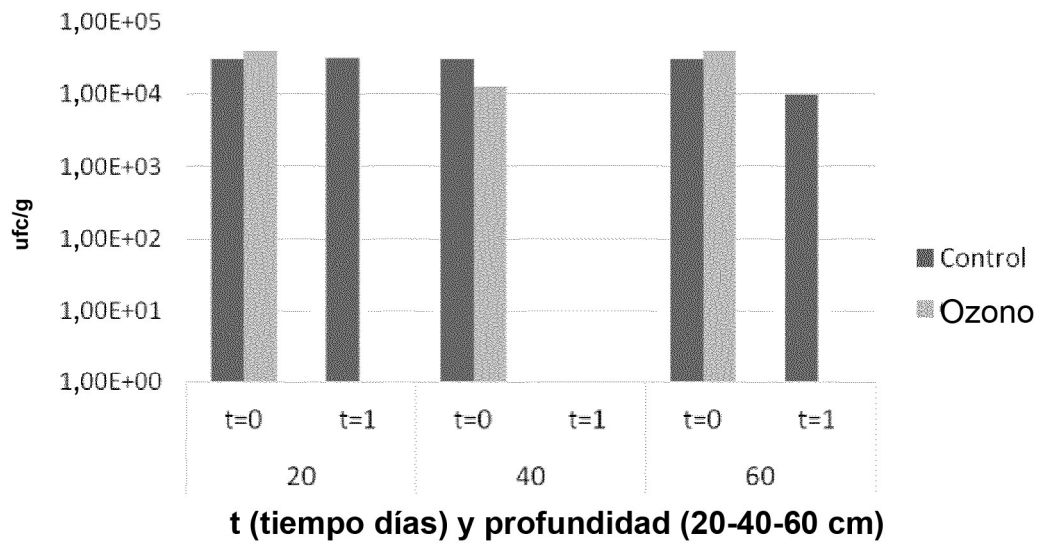


Fig. 3a

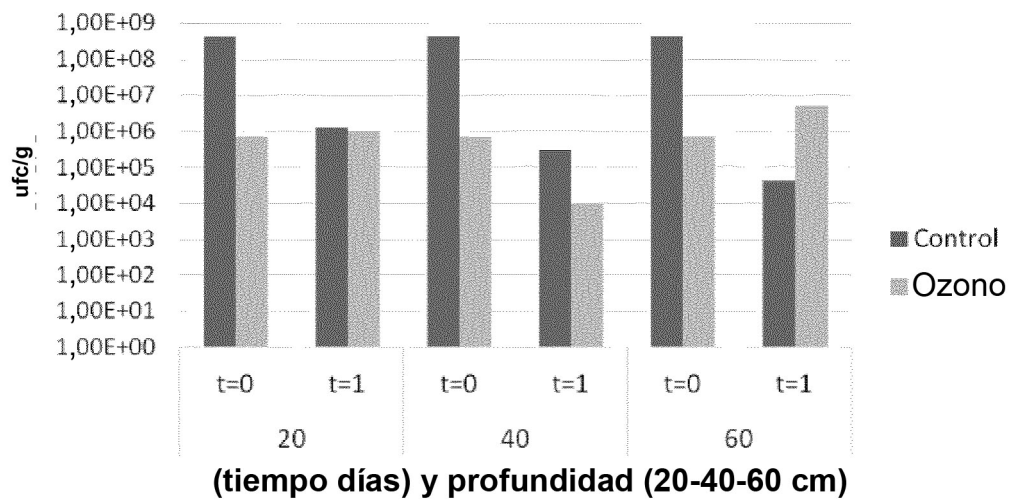


Fig. 3b

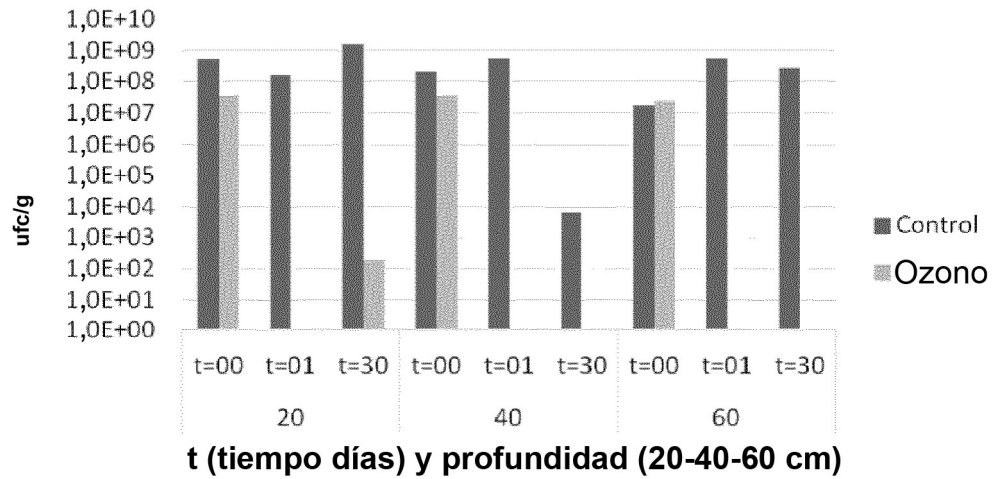


Fig. 4a

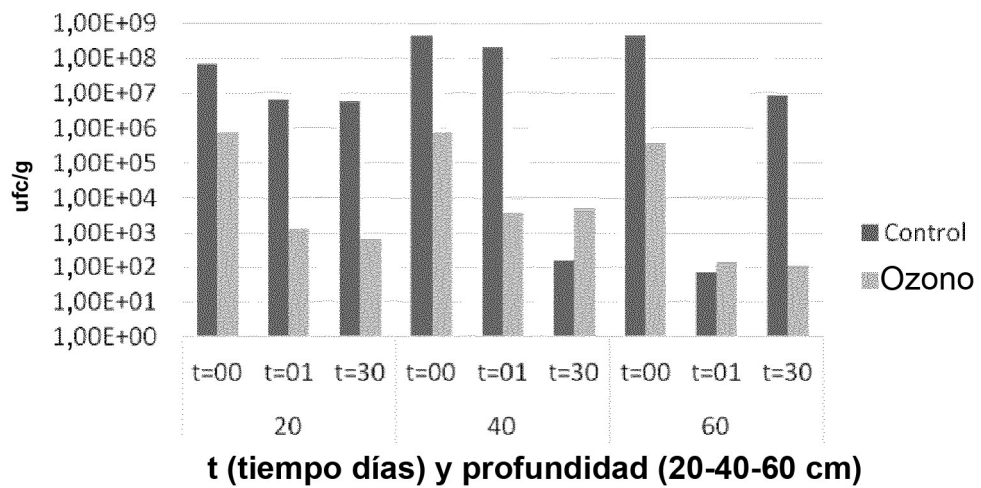


Fig. 4b



Fig. 5a



Fig. 5b



Fig. 6a



Fig. 6b

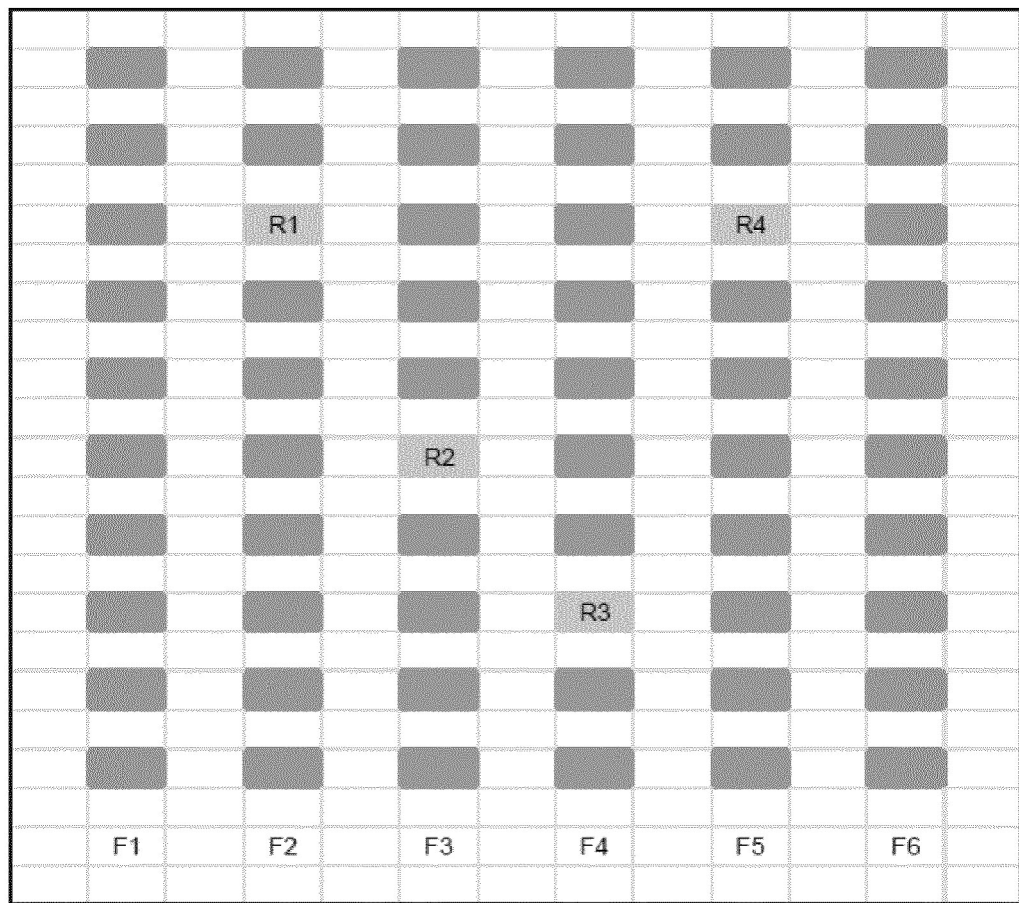


Fig. 7

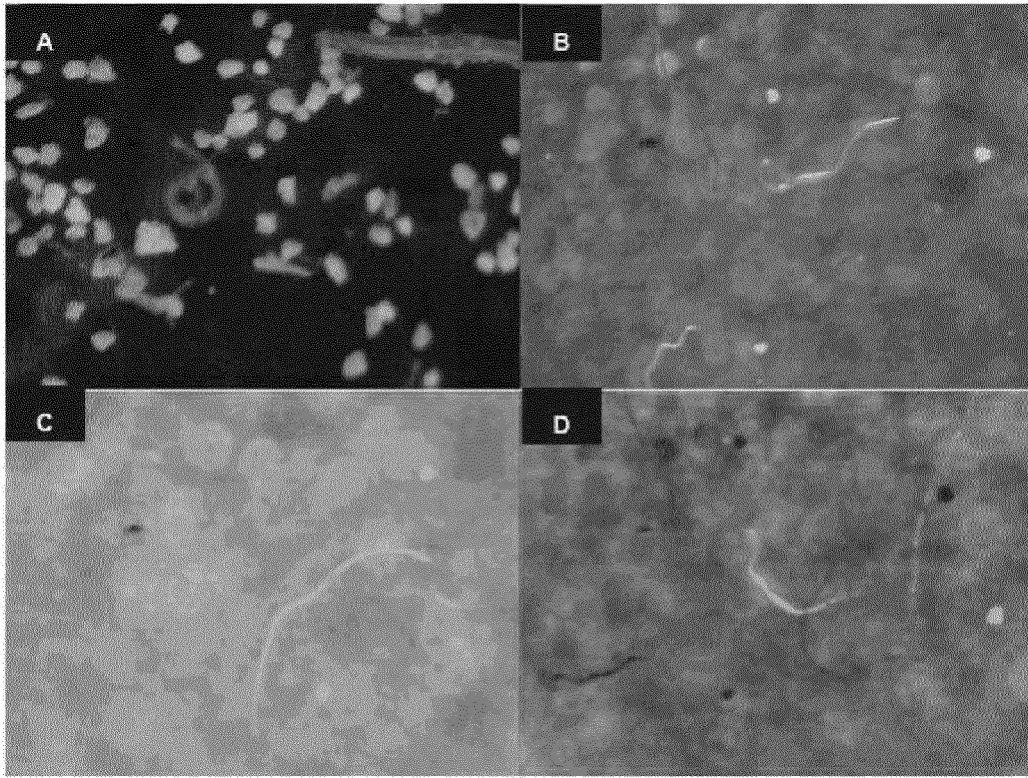


Fig. 8

EVOLUCIÓN NEMATODOS

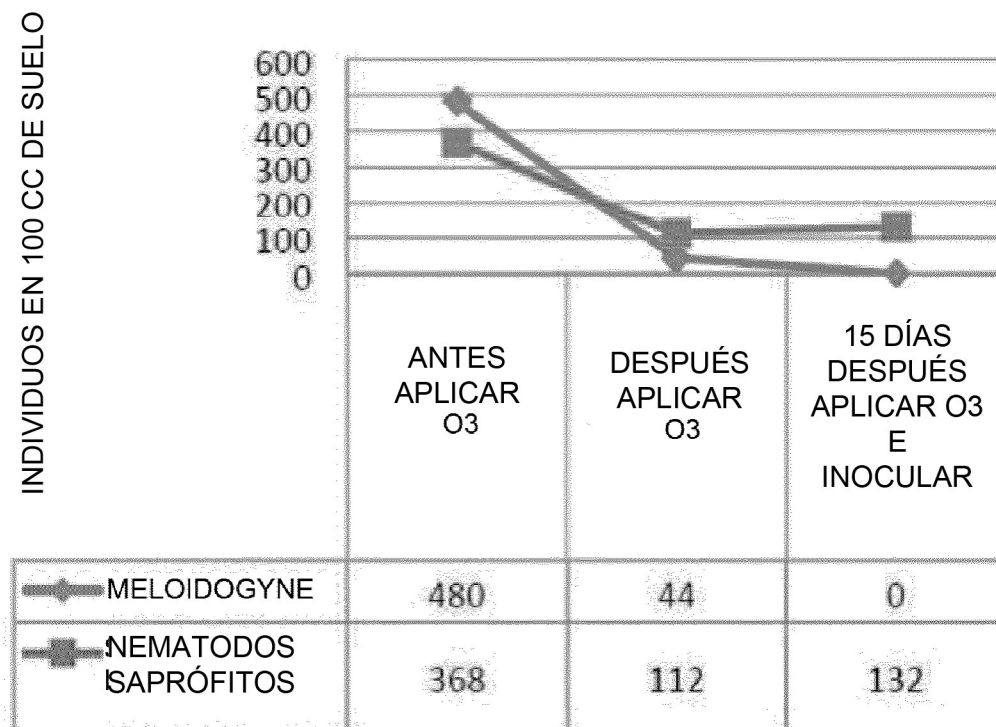


Fig. 9