

①9

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 159 258**

②1 Número de solicitud: 009902551

⑤1 Int. Cl.⁷: C05F 11/08

C05G 3/00

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

②2 Fecha de presentación: **19.11.1999**④3 Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.2001**Fecha de concesión: **28.02.2002**④5 Fecha de anuncio de la concesión: **01.04.2002**④5 Fecha de publicación del folleto de patente:
01.04.2002⑦3 Titular/es: **Consejo Superior de
Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**⑦2 Inventor/es: **Vilariño Rodríguez, Antón y
González Panalta, Beatriz**⑦4 Agente: **No consta**⑤4 Título: **Procedimiento de preparación de un biofertilizante basado en hongos formadores de simbiosis Micorriza Arbuscular.**

⑤7 Resumen:

Procedimiento de preparación de un biofertilizante basado en hongos formadores de simbiosis Micorriza Arbuscular.

La invención consiste en un método de preparación de un biofertilizante obtenido con la mezcla homogénea de un sustrato portador de material propagativo fúngico de Micorriza Arbuscular junto con papel, previamente detoxificado, y su posterior compactación. Así se obtiene un biofertilizante granulado formado por constituyentes de bajo coste aplicable, no sólo a cultivos de invernadero o de vivero, sino a gran escala.

ES 2 159 258 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

1. Título

Procedimiento de preparación de un biofertilizante basado en hongos formadores de simbiosis Micorriza Arbuscular.

2. Sector de la técnica

La invención es un procedimiento de elaboración de un producto de aplicación agrícola y medioambiental.

3. Estado de la técnica

Desde que se descubrió el papel beneficioso de los hongos biotrofos obligados formadores de la simbiosis hongo-planta conocida como Micorriza Arbuscular (MA), sobre el crecimiento y la nutrición de las plantas, han sido propuestos diferentes inoculantes basados en estos microorganismos, con miras a su aplicación a gran escala.

Las primeras referencias acerca de propuestas de preparación de inoculantes a base de hongos MA aparecen en artículos de Crush & Pattison (1975) y de Hattingh & Gerdemann (1975). Witty & Hayman (1978) utilizaron una suspensión de suelo portador de material infeccioso fúngico en 4% metil celulosa, que aplicaron a modo de fluido en el campo a inocular Hall (1979) utiliza una mezcla de material fúngico infeccioso consistente en suelo portador de hongo, y arcilla (5% en peso), al que da formato de píldoras de 14 g de peso Este autor aplica las píldoras en macetas, y obtiene colonización radicular en plantas de *Trifolium repens* L tras 75 días de crecimiento. Pese al supuesto funcionamiento de esas píldoras, la investigación en ese campo no fue continuada debido a lo extremadamente aleatorio del resultado infeccioso.

Diem *et al.* (1981) propusieron el uso de alginato sódico para la vehiculización de material propagativo de hongos MA, pero resultó en un sistema relativamente costoso para inoculación a gran escala y perecedero, con lo cual solo tenía aplicación en inoculaciones de laboratorio o, a lo sumo, en viveros. Dehne & Backhaus (1986) propusieron el uso de pequeños fragmentos de arcilla expandida, previamente utilizada de sustrato para el crecimiento de plantas colonizadas, como inoculante aplicable a gran escala. Estos autores sitúan el óptimo para la inoculación de un cultivo de maíz, en 150 Kg por ha, pero dado que su obtención requiere el mantenimiento de plantas colonizadas cuyo hongo simbiote se extienda por las partículas de arcilla, la extensión que ocuparía el sistema de producción de inoculante, así como el tiempo requerido para al establecimiento fúngico en las partículas de arcilla, hacen que éste carezca de aplicabilidad a gran escala, quedando relegado como los anteriores a inoculaciones de laboratorio o de plantas de vivero.

Existen en la actualidad algunos productos registrados como inoculantes de hongos MA en el mercado (VAMINOC, U.K, KINKON, Japón, MYCORISE, Canada, ENDORIZE, Francia) que utilizan compactantes a base de arcilla, alginato o turba, no obstante, la carestía de tales productos hace dudosa su aplicabilidad a gran escala, recomendándose para inoculación en invernaderos o viveros.

A continuación se concretan las mencionadas

referencias bibliográficas:

Crush, J. R. & Pattison, A. C., 1975 Preliminary results on the production of vesicular arbuscular mycorrhizal inoculum by freeze drying. En *Endomycorrhizas*. Eds.: F.E. Sanders, B. Mosse & P. B. Tinker, pp 483-493, Academic Press, Londres.

Dehne, H. W. & Backhaus, 1986. The use of vesicular -arbuscular mycorrhizal fungi in plant production. I. Inoculum production. *Journal of Plant Disease and Protection* 93: 415-424

Diem, H. G.; Jung, G.; Mugnier, J.; Ganry, F. & Dommergues, Y. R., 1981. Alginate-entrapped *Glomus mosseae* for crop inoculation *Proceedings of the 5th Noprth. Amer. Congress. on Mycorrhizas* pp 23

Hall, I. R., 1979. Soil pellets to introduce vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi into soil. *Soil Biology and Biochemistry* 11: 85-86

Hattingh, M. J. & Gerdemann, J.W., 1975. Inoculation of Brazilian sour orange seed with an endomycorrhizal fungus. *Phytopathology* 65: 1013-1016

Witty, J.H. & Hayman, D.S., 1978, Slurry inoculation of VA mycorrhiza. *Rothamsted Exp. St. Reportfor 1977* 1: 239-240.

4. Descripción de la invención

La invención consiste en un método para la compactación de material propagativo de hongos simbiotes MA no modificados genéticamente, con la finalidad de obtener un Biofertilizante granulado formado por constituyentes de bajo coste aplicable, no sólo a cultivos de invernadero o de vivero, sino a gran escala.

Se expone el procedimiento consistente en la preparación de una mezcla de sustrato portador de material propagativo fúngico MA, junto con papel, y su posterior compactación para obtener un Biofertilizante granulado aplicable a gran escala.

El procedimiento de preparación consiste en mezclar homogéneamente, mediante un procedimiento no destructivo, un sustrato portador de material propagativo fúngico (por ejemplo, arena-vermiculita), con un 5% en peso de fibras de celulosa obtenidas tras el desmenuzamiento y detoxificación de papel.

Una vez mezclados homogéneamente el sustrato portador de material propagativo fúngico MA con las fibras de celulosa detoxificadas, la pasta o mezcla se distribuye en placas dotadas de pequeños pocillos de aproximadamente 0.30 ml Las placas llenas con la mezcla anterior se someten a secado rápido de su contenido mediante aire forzado a temperatura inferior a 22°C, (temperatura ambiente) durante 12 horas en oscuridad, es decir, el material ha de estar seco antes de 12 horas desde su mezcla y distribución en los pocillos.

Finalmente, las píldoras formadas en los pocillos de las placas se extraen y se empaquetan en botes o bolsas opacas que los protejan de la incidencia lumínica y de la humedad, almacenándose

a 6°C, antes de su utilización como tal biofertilizante.

5. Ejemplo de realización de la invención

Se toman 15 g de fibra de celulosa seca obtenida del secado tras detoxificación (eliminación de tintas y colas) de papel, y se depositan en un homogeneizador de cuchillas junto con 500 ml de agua destilada, se homogeneiza durante 35 segundos, y se deja escurrir durante 5 minutos para eliminar el exceso de agua.

Pueden emplearse papeles de periódico viejo, cartón, papel higiénico, papel de filtro de laboratorio, papel de rollo de cocina o de secar las manos, etc., que deben ser tratados por cualquier procedimiento de detoxificación que elimine tintas, en su caso, y las colas empleadas en su elaboración, así como otros posibles aditivos del papel.

El procedimiento de detoxificación para el caso de papel de periódico viejo puede ser cualquiera, pero el aplicado para obtener el prototipo de Biofertilizante consistió en: 1-troceado del papel en fragmentos de 1 a 3 cm² 2-disgregación del papel en agua mediante homogeneizador de cuchillas, 3-hervido en 500 ml de 10% HOH durante 20 min.; 4-lavado exhaustivo en agua de red sobre tamiz de 36 μm Ø; 5-hervido en 500 ml 1 N HCl durante 20 min 6-lavado exhaustivo con agua de red sobre tamiz de 36 μm Ø; 7-hervido "vigilado" durante 10 min en 500 ml de 0,50% detergente comercial para lavadora con blanqueante basado en oxígeno; 8-lavado exhaustivo con agua de red sobre tamiz de 36 μm Ø, 9-hervido "vigilado" en 500 ml de 0.5% ácido acético durante 10 min, 10-lavado exhaustivo en agua de red sobre tamiz de 36 μm Ø; 11-hervido en 500 ml de agua destilada durante 2 períodos de 5 min con recambio de agua al cabo de cada proceso, y secado en estufa a 70°C. La pasta de papel seca libre de tintas y colas es considerada, a partir de este momento, como fibra de celulosa.

La fibra de celulosa escurrida se coloca en un recipiente junto con 285 g de material propagativo MA seco al aire, consistente en substrato arena de cuarzo y vermiculita (1:1) de tamaño de partícula inferior a 3 mm, y 70 - 75 ml de agua destilada. Esta operación debe realizarse en condiciones de oscuridad, luz fluorescente muy atenuada, o luz roja.

La mezcla se efectúa manualmente, hasta que no se detecten grumos de fibra de celulosa y la mezcla resulte lo más homogénea posible. Mezclas realizadas con mayores cantidades de ingredientes tendrán que ser preparadas en mezcladores giratorios del tipo "hormigonera" como los empleados en la construcción, así como modificar los tiempos de detoxificación del papel para obtener fibra de celulosa.

La mezcla húmeda se distribuye en placas dobladas de pocillos con forma de cono truncado de 10 mm de alto, y 6 mm de base más amplia, cuyo relleno se asegura mediante leve presión y, pequeños golpes que obligan a que la pasta húmeda ocupe y se adapte a los pocillos. En laboratorio, el prototipo se obtuvo empleando placas de titriación con pocillos de 300 μl. Una vez llenos, el contenido de cada pocillo se comprimió con una presión equivalente a 6 Kg por centímetro cuadrado.

Las placas con los pocillos llenos de la mezcla homogénea se depositan en un túnel de secado en el que una corriente de aire de temperatura inferior a 22°C circula sobre las placas consiguiendo el secado completo del material en menos de 12 h El mantenimiento de condiciones de oscuridad, luz roja, o luz muy atenuada a lo largo de todo el proceso es necesario para no dañar al material propagativo de hongos MA, principal microorganismo de este biofertilizante.

Tras el secado, las píldoras de unos 0.23±0.01 ml de volumen y 0.40±0.02 g de peso se extraen de las placas por medio de golpes débiles. Este procedimiento permite una integridad de las píldoras superior al 95%, dependiendo de la calidad con que haya sido efectuada la homogeneización de la fibra de celulosa con el substrato portador de material propagativo fúngico MA, y su compresión final en los pocillos.

En estas condiciones, y si el material propagativo de partida tiene la infectividad adecuada, cargas de 30 píldoras del biofertilizante por metro cuadrado (120 Kg por ha.), enterradas a 3 cm por debajo de la semilla, permiten el establecimiento de colonización radicular en un cultivo pratense sobre substrato estéril en un plazo de 30 días a 22°C de temperatura media .

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de un biofertilizante **caracterizado** porque consiste en la mezcla homogénea de un substrato portador de material propagativo fúngico de Micorriza Arbuscular junto con papel, previamente detoxificado, y su posterior compactación.

2. Procedimiento según reivindicación 1 **caracterizado** porque consiste en la mezcla de un substrato portador del material propagativo fúngico, como arena-vermiculita, y un 5% en peso de fibras de celulosa, obtenidas del desmenuza-

miento y detoxificación de cualquier clase de papel, que una vez homogeneizada se distribuye en placas dotadas de pequeños pocillos de aproximadamente 0,30 ml, que se llenan y se someten a secado rápido mediante aire forzado a temperatura inferior a 22°C, (temperatura ambiente) durante 12 horas en oscuridad, y finalmente, las píldoras formadas en los pocillos de las placas se extraen y se empaquetan en botes o bolsas opacas que los protejan de la incidencia lumínica y de la humedad, almacenándose a 6°C, antes de su utilización como biofertilizante.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C05F 11/08, C05G 3/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	EP 92991 A2 (NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 02.11.1983, página 3, líneas 1-27; página 4, línea 34 - página 5, línea 13; página 6, líneas 6-10; página 14, líneas 1-18.	1
A		2
Y	EP 885554 A2 (FUKUOKA, M) 23.12.1998, columna 2, líneas 46-57; columna 3, líneas 10-13,36-50.	1
A	US 4551165 A (WARNER) 05.11.1985, todo el documento.	1,2
A	US 4589226 A (STENSAAS) 20.05.1986, columna 9, líneas 9-30; columna 10, línea 64 - columna 11, línea 8.	1,2
A	ES 2067165 T3 (SHELL INTERNATIONAL RESEARCH MAATSCHAPPIJ B.V.) 16.03.1995, todo el documento.	1,2
A	US 5770138 A (YODER) 23.06.1998, todo el documento.	

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
21.08.2001

Examinador
A. Polo Díez

Página
1/1