

	3,92 ppm en el gotero
--	-----------------------

Tabla 3: Lecturas ozono

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

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

1.5.3. Evaluación de la población microbiana tras la Aplicación 2

A. Hongos patógenos

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

- 5 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.

10 **1.6. Fitotoxicidad en plantas de tomate**

Tras la primera aplicación del tratamiento con ozono, se trasplantaron 2 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
15 zona (ver figuras 5a y 5b).

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
20 segunda aplicación, las plantas control murieron causa de la infección (ver figuras 6a y 6b).

1.7. Conclusiones

Los resultados obtenidos demostraron que el nivel de desinfección del ozono fue de un
25 100% 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
30 cm, donde la reducción alcanzó el 60%.

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
35 crecimiento bajo-medio y acabaron muriendo debido a la infección de patógenos.

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.

Ejemplo 2: Desinfección de nematodos en pimiento var. padrón

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.

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.

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.

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

Tabla 1 Muestreos

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.

5

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
10 tratamientos se realizaron al final de un cultivo de hortalizas, previamente a realizar la nueva plantación de hortalizas tipo pepinos, tomates, pimientos.

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

15

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
20 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
25 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 Saprofitos en 20
30 unidades/100 cc tierra.

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 (mín. 2 ppm) en agua de riego, seguido de la inoculación
35 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 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 7,5;
- dejar transcurrir un periodo mínimo de 30 min 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 se deja transcurrir un periodo entre 30 min y 48 horas entre el tratamiento del suelo o sustrato con el agua
15 ozonizada y la inoculación con al menos una especie de microorganismo beneficioso.

3.- El método para desinfectar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el contenido de ozono disuelto en el agua ozonizada es entre 5 y 6 ppm.

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

25 5.- El método para desinfectar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el contenido de ozono disuelto en el agua ozonizada es entre 6 y 8 ppm, y el tratamiento del suelo o sustrato con este agua ozonizada se realiza por un periodo de tiempo inferior a 90 min.

30 6.- El método para desinfectar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el agua ozonizada preparada in situ contiene nano-burbujas de ozono obtenidas en un tanque de mezclado presurizado a una presión entre 2,5 y 3,0 atm.

35 7.- El método para desinfectar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el microorganismo beneficioso se selecciona del grupo que consiste en *Trichodermas*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* y una combinación cualquiera de los anteriores.

8.- El método para desinfectar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el suelo o sustrato agrícola desinfectado se trata con 11 cepas de microorganismos diferentes.

5

9.- El método para desinfectar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el agua se aplica por riego localizado.

10.- El método para desinfectar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, 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;
- 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 7,5;
- dejar transcurrir un periodo mínimo de 30 min 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.

11.- El método para desinfectar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el suelo o sustrato con cultivo en producción, y el método 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 7,5;
- dejar transcurrir un periodo mínimo de 30 min desde el tratamiento con ozono; e
- inocular el suelo o sustrato agrícola desinfectado con al menos una especie de microorganismo beneficioso.

1/9

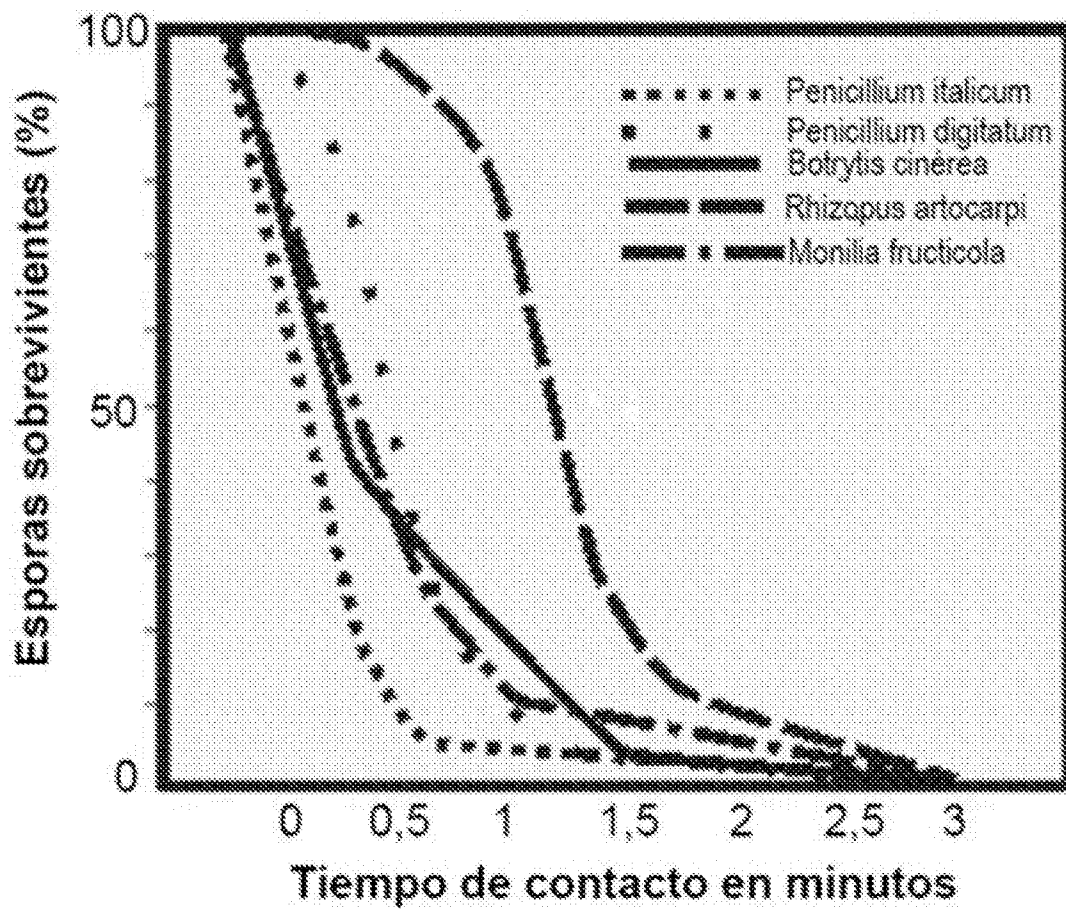


Fig. 1

2/9

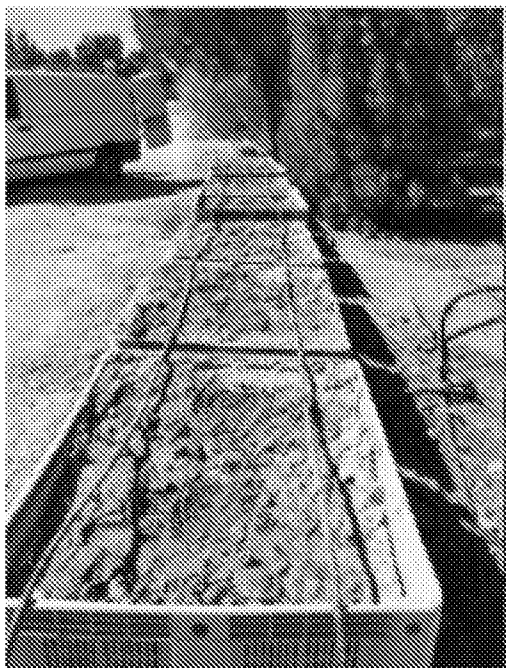


Fig. 2a

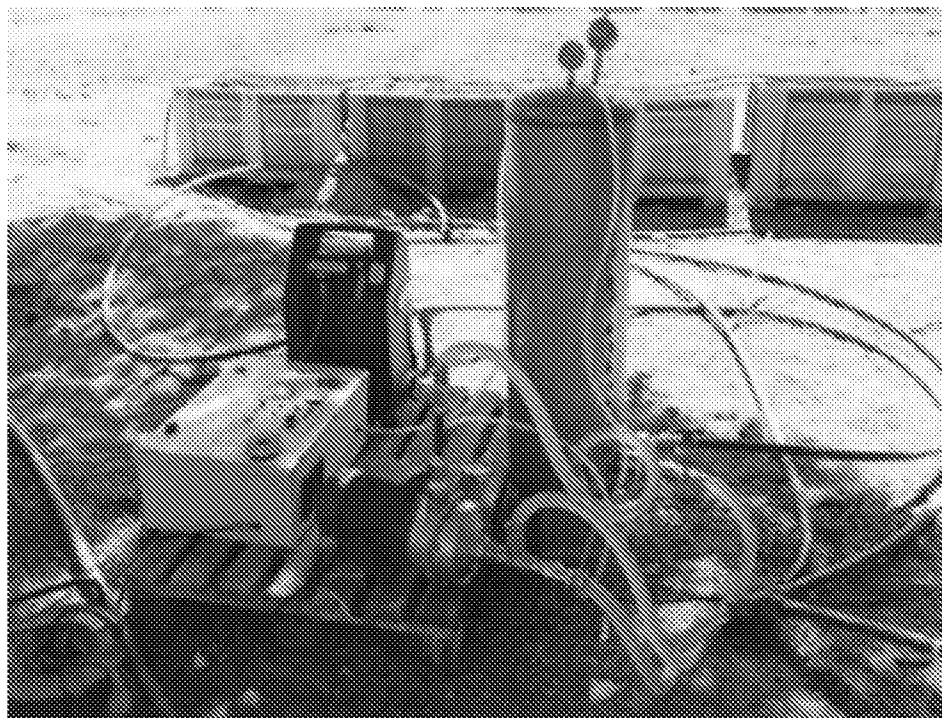


Fig. 2b

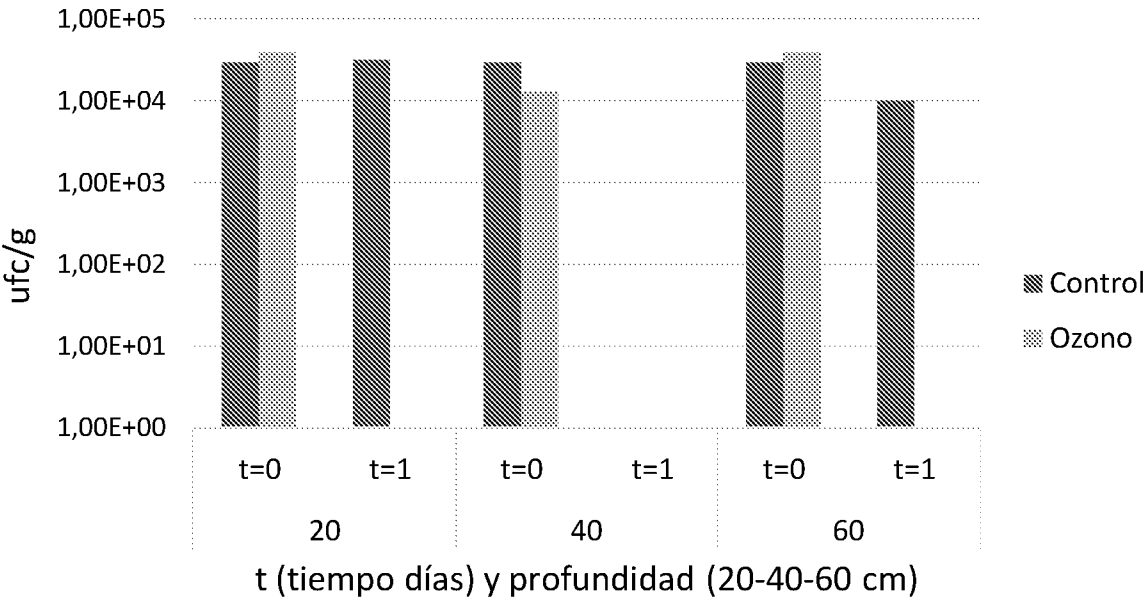


Fig. 3a

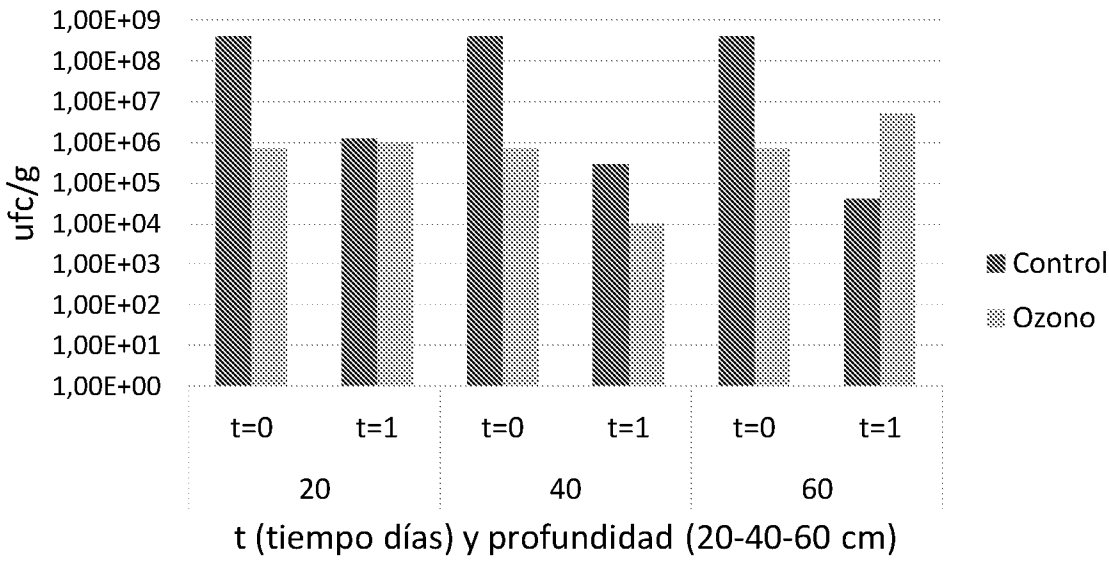


Fig. 3b

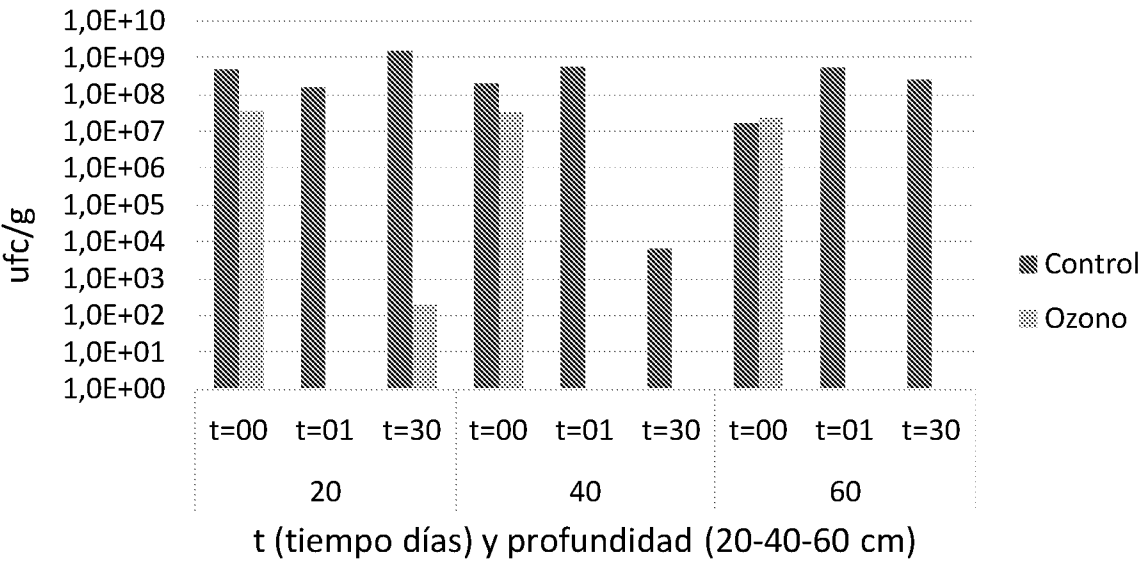


Fig. 4a

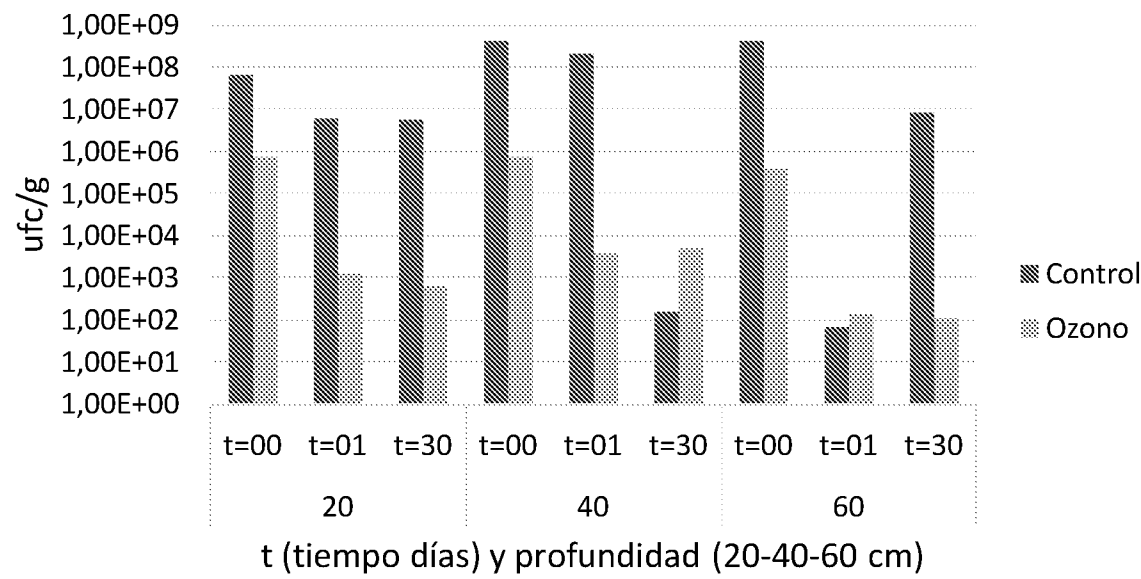


Fig. 4b

5/9



Fig. 5a



Fig. 5b

6/9



Fig. 6a



Fig. 6b

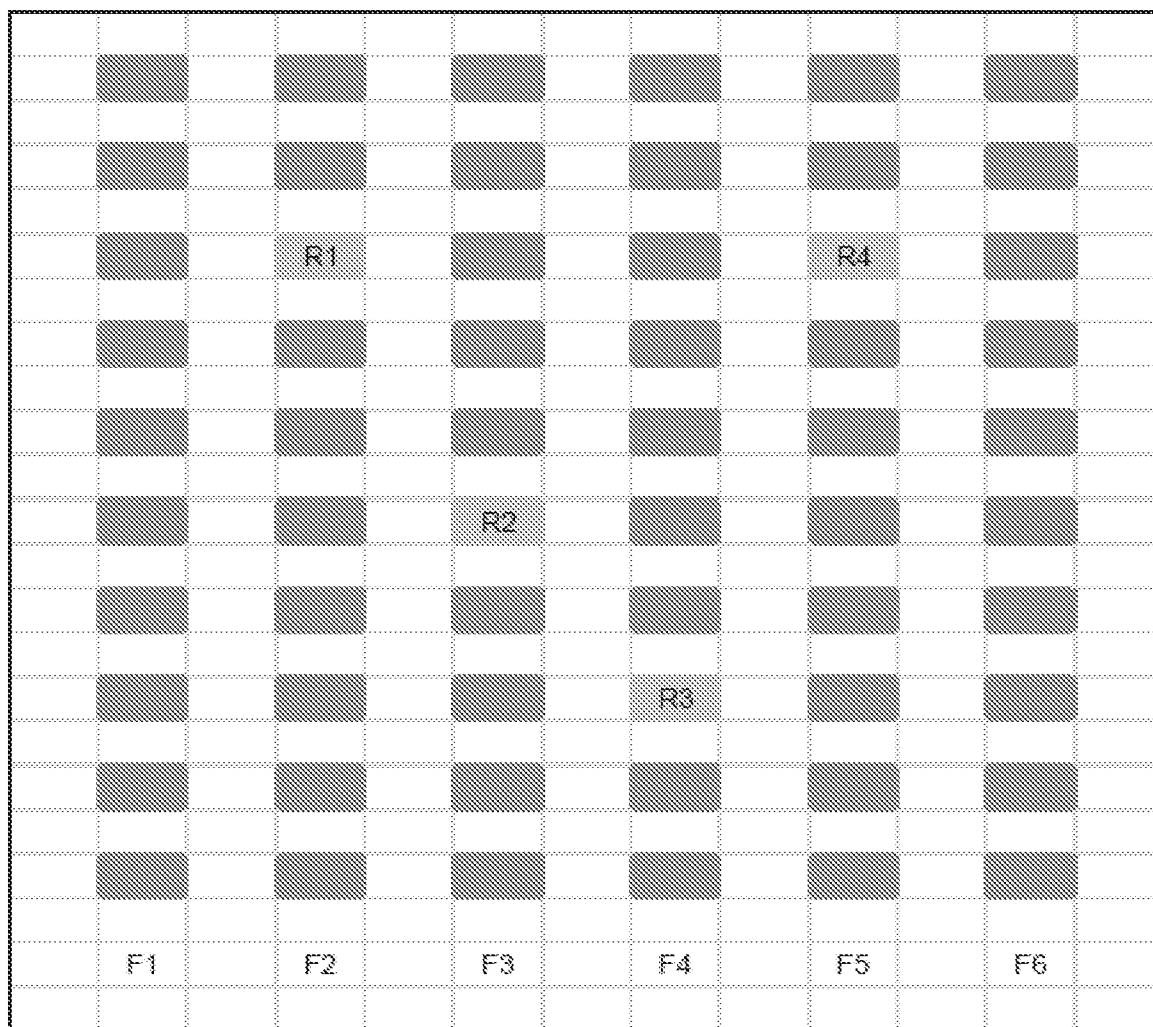


Fig. 7

8/9

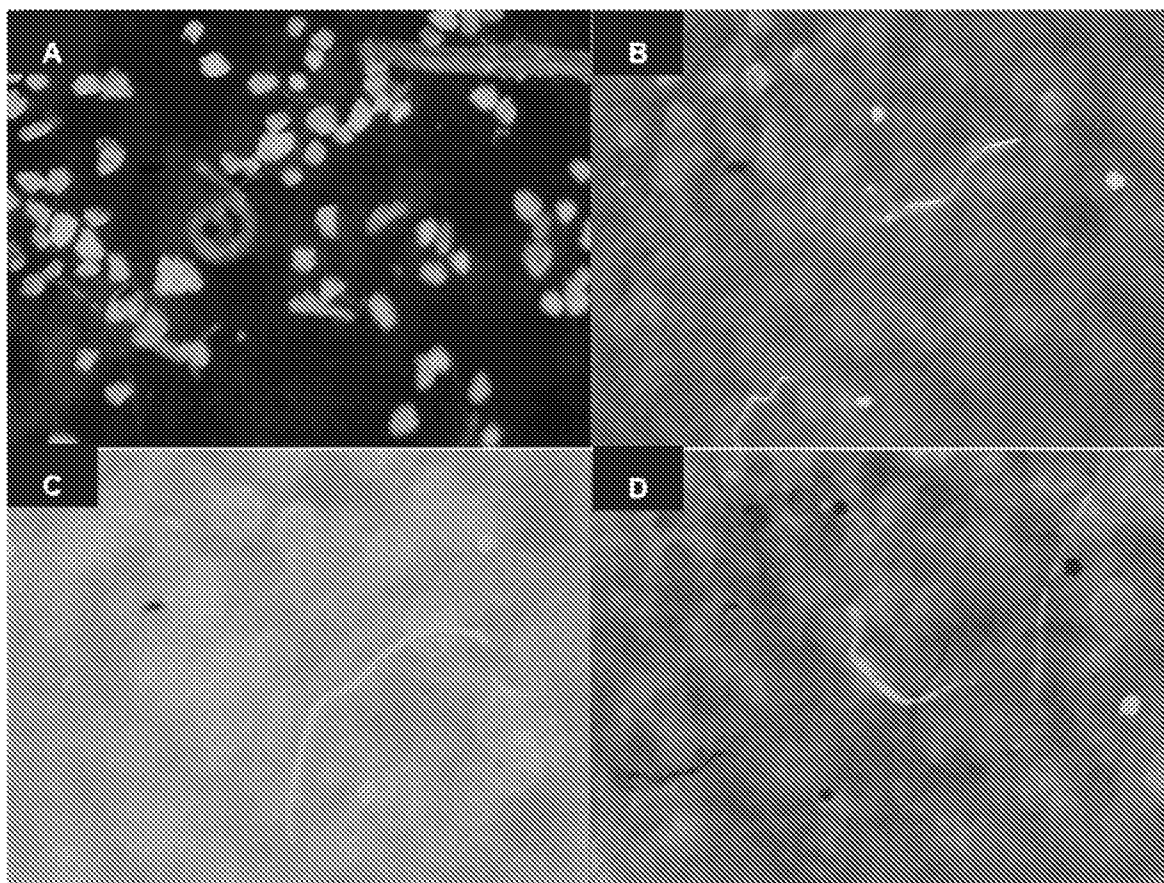


Fig. 8

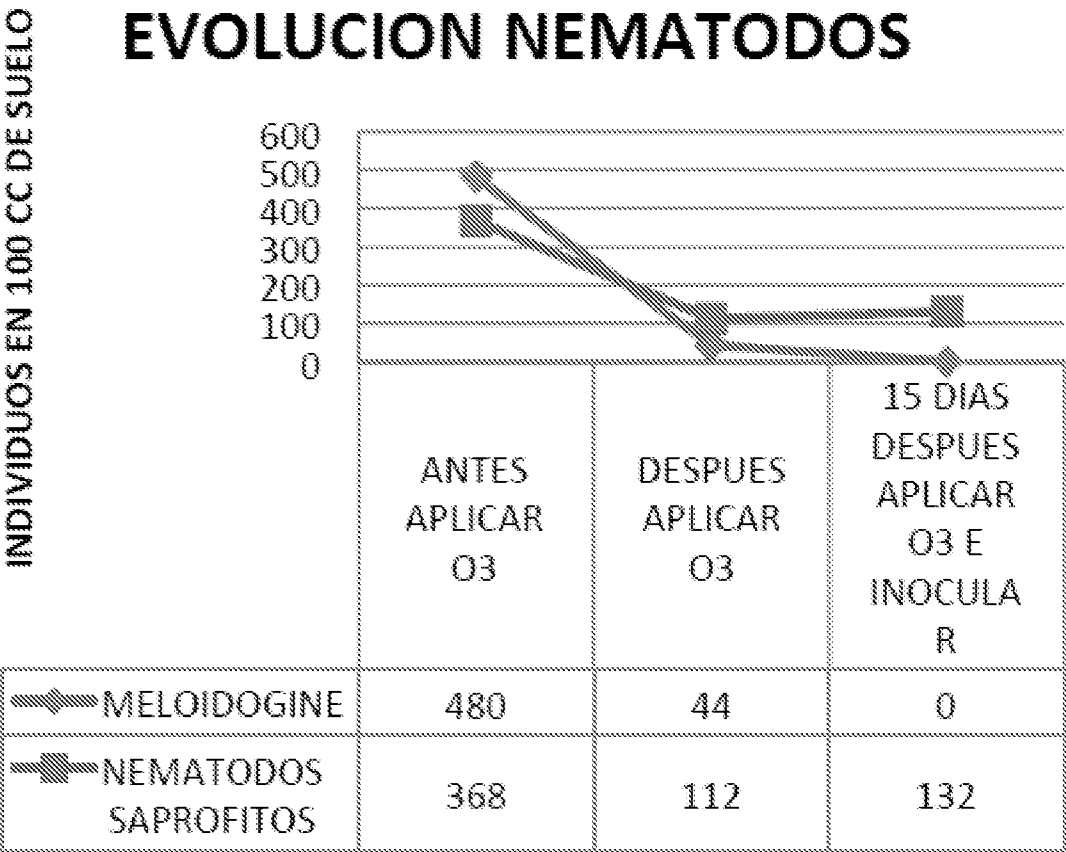


Fig. 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2017/070488

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

B09C, A01N, C02F, C09K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, NPL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AGROZONO 14/10/2016	1-5,7-9-11
Y	(https://web.archive.org/web/20161014180145/https://agroazono.net/procedimiento-de-aplicacion/)	8
A		6
Y	JP H1030091 A (MATSUMOTO BISEIBUTSU KENKYUSHO) 03/02/1998, paragraphs [14 - 15]; Abstract from DataBase WPI. Retrieved from EPOQUE	8
A	KAZUHIRO FUJIWARA et al.. Effects of Ozonated Water Application on the Population Density of Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici in Soil Columns. OZONE: SCIENCE AND ENGINEERING, 20060501 LEWIS PUBLISHERS, CHELSEA, MI, US. 01/05/2006, Vol. 28, N° 2, Pages 125 - 127, ISSN 0191-9512, <DOI: doi:10.1080/01919510600559435> page 126 Abstract. Retrieved from EPOQUE	1-5,10,11
A	JP 2002020211 A (SHINKO PLANT KENSETSU KK) 23/01/2002, Abstract from DataBase EPODOC. Retrieved from EPOQUE	1-5, 10-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01/02/2018

Date of mailing of the international search report
(02/02/2018)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
M. López de Rego Lage

Telephone No. 91 3498405

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2017/070488

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102640668 A (UNIV CHINA AGRICULTURAL) 22/08/2012, Abstract from DataBase WPI. Retrieved of EPOQUE	1-6,10-11
E	ES 2625034 A1 (VILLANUEVA DECODES EMILIO JESUS) 18/07/2017, the whole document	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2017/070488

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JPH1030091 A	03.02.1998	NONE	
-----	-----	-----	-----
JP2002020211 A	23.01.2002	JP3560902B B2	02.09.2004
-----	-----	-----	-----
CN102640668 A	22.08.2012	NONE	
-----	-----	-----	-----
ES2625034 A1	18.07.2017	CA2954649 A1	18.07.2017
-----	-----	EP3192371 A1	19.07.2017
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2017/070488

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

B09C1/00 (2006.01)

A01N59/00 (2006.01)

C02F1/78 (2006.01)

C09K17/40 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2017/070488

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

B09C, A01N, C02F, C09K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, NPL

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	AGROZONO 14/10/2016	1-5,7,9-11
Y	(https://web.archive.org/web/20161014180145/https://agrozono.net/procedimiento-de-aplicacion/)	8
A		6
Y	JP H1030091 A (MATSUMOTO BISEIBUTSU KENKYUSHO) 03/02/1998, párrafos [14 - 15]; Resumen de la base de datos WPI. Recuperado de EPOQUE	8
A	KAZUHIRO FUJIWARA et al. <i>Effects of Ozonated Water Application on the Population Density of Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici in Soil Columns</i> . OZONE: SCIENCE AND ENGINEERING, 20060501 LEWIS PUBLISHERS, CHELSEA, MI, US. 01/05/2006, Vol. 28, Nº 2, Páginas 125 - 127, ISSN 0191-9512, <DOI: doi:10.1080/01919510600559435> página 126 Resumen. Recuperado de EPOQUE	1-5,10,11
A	JP 2002020211 A (SHINKO PLANT KENSETSU KK) 23/01/2002, Resumen de la base de datos EPODOC. Recuperado de EPOQUE	1-5, 10-11

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

01/02/2018

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.

02 de febrero de 2018 (02/02/2018)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. López de Rego Lage

Nº de teléfono 91 3498405