

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
10 de enero de 2019 (10.01.2019)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2019/008195 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

B09C 1/00 (2006.01) *C02F 1/78* (2006.01)
A01N 59/00 (2006.01) *C09K 17/40* (2006.01)

(72) Inventor: **VILLANUEVA DECODES, Emilio Jesús**;
Autovía de Ademuz, Salida 12, 46184 San Antonio de Benageber (Valencia) (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2017/070488

(74) Mandatario: **UNGRÍA LÓPEZ, Javier**; Avda. Ramón y Cajal, 78, 28043 MADRID (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:

06 de julio de 2017 (06.07.2017)

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH,

(25) Idioma de presentación:

español

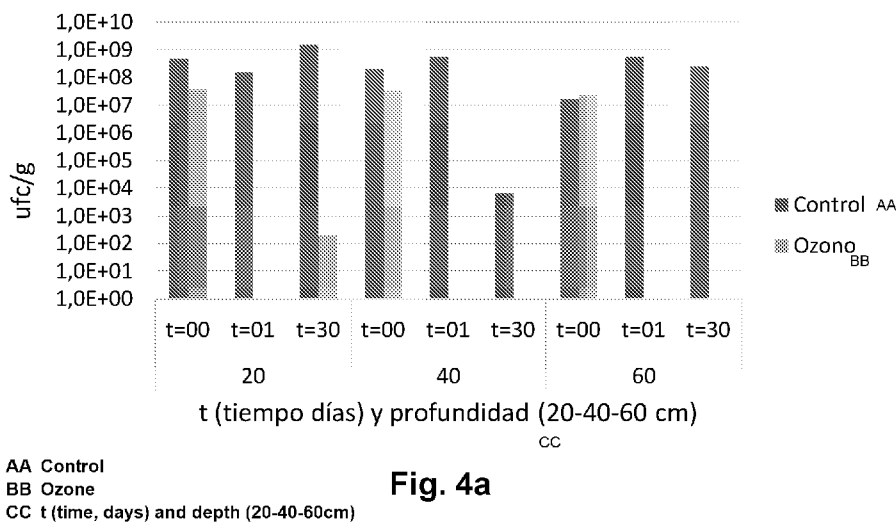
(26) Idioma de publicación:

español

(71) Solicitante: **AGROZONO, S.L.** [—/ES]; Autovía de Ademuz, salida No 12, 46184 San Antonio de Benageber (Valencia) (ES).

(54) Title: METHOD FOR DISINFECTING SOILS OR OTHER AGRICULTURAL GROWING MEDIA

(54) Título: MÉTODO PARA LA DESINFECCIÓN DE SUELOS U OTROS SUSTRATOS DE CULTIVO AGRÍCOLA



(57) Abstract: The invention relates to a method for disinfecting soils or other agricultural growing media, characterised by comprising the following steps: obtaining a soil or other agricultural growing medium at their field capacity; treating the soil or medium at the field capacity of the previous step with ozonated water, wherein the ozonated water is prepared in situ using ozone-production equipment connected to the water supply; allowing a period of time to pass after the treatment with ozone; and inoculating the disinfected soil or agricultural medium with at least one species of beneficial microorganism.

(57) Resumen: 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, donde el agua ozonizada se prepara in situ con un equipo de producción de ozono conectado al suministro de agua; dejar transcurrir un tiempo desde el tratamiento con ozono; e inocular el suelo o sustrato agrícola desinfectado con al menos una especie de microorganismo beneficioso.

[Continúa en la página siguiente]

TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA LA DESINFECCIÓN DE SUELOS U OTROS SUSTRATOS DE CULTIVO AGRÍCOLA

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, en particular agua ozonizada generada en el lugar y momento de 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 Cloropicrina, 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 RD 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

30

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

35

desinfectar suelos o sustratos de uso agrícola y, por lo tanto, no es necesario establecer un plazo de espera hasta la puesta en cultivo.

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.

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.

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.

Desde finales del siglo XIX, 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 enérgicas toxinas difterianas y tetánicas.

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.

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.

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 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. En condiciones de pH bajo por oxidación molecular y 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 0,1mg/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. Así mismo, 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 7,5, preferentemente el agua tiene un pH entre 5,0 y 7,0;
- dejar transcurrir un periodo mínimo de 30 min, preferentemente entre 30 min y 48 horas,

desde el tratamiento con ozono; e

- inocular el suelo o sustrato agrícola desinfectado con al menos una especie de microorganismo beneficioso.

- 5 Preferentemente, el tratamiento con ozono se aplica durante entre 1 h 30 min y 2 horas, pero pueden obtenerse los mismos resultados de eficacia con tratamientos menores a 90 minutos y una concentración de ozono superior, preferiblemente entre 6 y 8 ppm. Para conseguir una mayor concentración de ozono, el agua ozonizada obtenida en un primer reactor del equipo de producción de ozono se puede hacer pasar por un segundo reactor
- 10 generador de ozono, de esta forma se puede llegar a doblar la cantidad de ozono presente en el agua ozonizada utilizada en el tratamiento del suelo o sustrato a capacidad de campo.

La utilización de ozono en la desinfección de suelos implica una serie de problemas

15 técnicos que no se habían solucionado hasta el momento. En particular, 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

20 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

25 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 nano-burbujas. Así, en el método de la presente invención se obtiene una movilidad del ozono mucho mayor, aumentando así la

30 homogeneización en el agua. Como resultado, el método de la presente invención proporciona una efectividad del tratamiento mucho mayor que si se inyectara ozono gas directamente, a la vez que su puesta en práctica es mucho menos complicada y costosa.

En la presente invención se entiende por “otros sustratos de cultivo agrícola” aquellos

35 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 método que se describe en este documento puede utilizarse preferentemente para desinfectar suelos en cultivo leñosos tales como frutales, cítricos o viña. En estas realizaciones particulares de la invención, el método de desinfección proporciona las siguientes ventajas:

- Aumento de la cantidad de oxígeno en el suelo, favoreciendo el desarrollo del sistema radicular, en particular, de los cultivos envejecidos por las malas prácticas de trabajo.
- Limpieza de los residuos químicos.
- Adicionalmente, la inoculación de formulados a base de 11 cepas de microorganismos diferentes permite equilibrar la flora microbiana con diversidad de seres vivos beneficiosos para los cultivos;
- Aumento de la calidad del cultivo, en particular el calibre de los frutos, y aumento de la producción.

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 utilización de más de un reactor generador de ozono, en particular 2 de forma secuencial, para aumentar así el contenido de ozono en el agua ozonizada,
- 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,
- los equipos permiten la regulación del pH del agua directamente desde el equipo de tratamiento (por ejemplo, mediante un dispositivo venturi regular de pH).

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. Preferentemente, el tanque de mezclado está presurizado con una presión entre 2,5 y 3,0 atm. De esta forma se consigue una mezcla
5 del ozono en el agua más homogénea.

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
10 trabajo entre 10.000-80.000 L/h y capaz de tratar superficies de cultivo de 5 Has.

Adicionalmente, en el método para desinfectar suelos o sustratos de cultivo agrícola que se describe en este documento se pueden utilizar generadores de luz de 40 kabeas. Esto supone una reducción del consumo eléctrico y, en consecuencia, una reducción en la
15 contaminación medioambiental producida por el consumo de combustible (gasoil).

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
20 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, preferentemente
25 presurizado con una presión entre 2,5 y 3,0 atm, donde se disminuye el tamaño de las burbujas generadas al inyectar el gas en el agua de riego hasta conseguir las denominadas nano-burbujas. 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
30 y una disminución en el tamaño del equipo necesario para aplicar el tratamiento, permitiendo la movilidad del mencionado equipo.

Para la obtención de las nano-burbujas de ozono se debe conseguir una recirculación del agua mezclada con ozono a través de unos tamices cerámicos, preferentemente con una
35 presión de 2,5-3,0 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 sólo 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; del cultivo existente o a implantar; 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 inferior a 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 *Trichodermas*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* y una combinación cualquiera de los anteriores.

En realizaciones preferidas, el método para desinfectar un suelo o sustrato de cultivo agrícola comprende inocular 11 cepas de microorganismos diferentes. Los formulados de

diferentes cepas reconolizan la flora microbiana en menor tiempo y con mayor garantía que los formulados con una única cepa que se utilizan habitualmente. De forma especialmente preferida, el método para desinfectar un suelo o sustrato de cultivo agrícola que se describe en este documento comprende inocular los siguientes microorganismos: *Bacillus* *pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus popilliae*, *Azobacter vinelandii*, *Pseudomona fluorescens*, *Saccharomyces*, *Glomus intradices*, *Trichoderma harzianum*, *Rhizobium spp* y *Paelomyces lilacinus*.

La inoculación con microorganismos beneficiosos tiene lugar como mínimo 30 min 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, se prefiere que la inoculación tenga lugar en un plazo no superior a 48 horas, más preferentemente, no superior a 24 horas, desde la aplicación del tratamiento con ozono. De esta forma se puede 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 en el bulbo desinfectado donde se encuentra el sistema radicular del cultivo. La mezcla de microorganismos se adhiere al sistema radicular, protegiendo y colonizando el espacio desinfectado, es decir, libre. Adicionalmente, activan las defensas naturales de las plantas, y degradan la materia orgánica existente en el suelo, convirtiéndola en ácidos húmicos y fulvicos más asimilable para el cultivo. Por este motivo resulta particularmente ventajosa la utilización de la mezcla de 11 cepas diferentes de microorganismos beneficiosos que se describe en este documento.

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 (entre 5,0 y 7,5; más preferiblemente 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 ozono 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 es 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 microbidas 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.

- 5 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;
 - 10 - 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, preferentemente un pH entre 5,0 y 7,0;
 - dejar transcurrir un periodo mínimo de 30 min desde el tratamiento con ozono,
 - 15 preferentemente entre 30 min y 48 horas;
 - inocular el suelo o sustrato agrícola desinfectado con al menos una especie de microorganismo beneficioso, preferentemente con una mezcla de 11 cepas de microorganismos diferentes; y
 - plantar el vegetal a cultivar.

20

De forma especialmente preferida, el método para desinfectar un suelo o sustrato de cultivo agrícola que se describe en este documento comprende inocular los siguientes microorganismos: *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus popilliae*, *Azobacter vinelandii*, *Pseudomona fluorescens*, *Saccharomyces*,

25 *Glomus intradices*, *Trichoderma harzianum*, *Rhizobium spp* y *Paelomyces lilacinus*.

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.

30

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

35 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.

- 5 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*. En particular, en ensayos realizados se obtuvo una desinfección del 100 % frente a los hongos fitopatógenos mencionados anteriormente
- 10 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 %.
- 15 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.
- 20 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
- 25 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

30 aplicarse a suelos u otros sustratos con cultivo en producción, tanto de hortalizas como cultivos leñosos (frutales, cítricos, viña, etc). 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
- 35 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, preferentemente un pH entre 5,0 y 7,0;

- dejar transcurrir un periodo mínimo de 30 min desde el tratamiento con ozono, preferentemente entre 30 min y 48 horas;

- 5 - inocular el suelo o sustrato agrícola desinfectado con al menos una especie de microorganismo beneficioso, preferentemente con una mezcla de 11 cepas de microorganismos diferentes.

10 De forma especialmente preferida, el método para desinfectar un suelo o sustrato de cultivo agrícola que se describe en este documento comprende inocular los siguientes microorganismos: *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus popilliae*, *Azobacter vinelandii*, *Pseudomona fluorescens*, *Saccharomyces*, *Glomus intradices*, *Trichoderma harzianum*, *Rhizobium spp* y *Paelomyces lilacinus*.

15 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.

20 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
25 de ozono al suelo o sustrato infestado de patógenos y con el cultivo en producción, sin dejar ningún tipo de residuo tóxico o que se pueda registrar en análisis del producto recolectado. La inoculación, preferentemente entre 30 minutos y 48 h después del tratamiento con ozono, de microorganismos beneficiosos será la encargada de regenerar el sistema radicular afectado.

30 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
35 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: Diagrama mostrando el efecto del agua con ozono sobre varios hongos.

Figura 2a: Imagen mostrando los contenedores con sustrato utilizados en el ejemplo 1.

Figura 2b: 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: Grafica mostrando la supervivencia de hongos fitopatógenos tras la aplicación 1 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: Grafica mostrando la supervivencia de bacterias fitopatógenos tras la aplicación 1 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: Grafica mostrando la supervivencia de hongos fitopatógenos tras la aplicación 2 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: Grafica mostrando la supervivencia de bacterias fitopatógenos tras la aplicación 2 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: 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: Imagen mostrando el estado de las plantas de tomate tras la segunda aplicación del ejemplo 1. Fig. 6a: control; Fig. 6b: tratamiento con ozono.

5 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) detalle nematodos.

10 Figura 9: 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

15 **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
20 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
25 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.

30

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).
35 UFC).

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

5 1.1 Protocolo de ensayo

Se instalaron contenedores de un volumen conocido de 1000 l (1x1x1 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.

10

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*

15

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.

20

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.

25

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 mín 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 mín se inoculó el formulado de microorganismo (1).

30

35

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.

5

Tras 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.

10 1.2 Tratamientos

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

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

Tabla 1: Tratamientos

15

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.

20 1.3 Tamaño experimental y diseño

El tratamiento control corresponde con el contenedor nº 1. Dado que solo hay una repetición, durante los muestreos se tomaron 3 submuestras.

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

25

Tabla 2: Croquis del diseño experimental

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).
- 5 - 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.

- 10 - 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 ($P > 0.05$).

- 15 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

20

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:

Tiempo (minutos)	Equipos implicados	Descripción / Observaciones
0-120	Riego	Saturación de agua
15-20	Equipo de ozono	Comprobación en 4 ocasiones del análisis para determinar los gramos de ozono por litro de agua.
	Riego por goteo	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