



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 134 174**

⑫ Número de solicitud: 9800174

⑬ Int. Cl.<sup>6</sup>: C12N 1/14

A01N 63/04

/(C12N 1/14

C12R 1:645)

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **30.01.98**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.99**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**16.09.99**

⑱ Solicitante/s: **UNIVERSIDAD DE ALICANTE**  
**Ctra. San Vicente del Raspeig, s/n**  
**03690 San Vicente del Raspeig, Alicante, ES**

⑲ Inventor/es:  
**Carbonell Carbonell, M<sup>a</sup> Antonia y**  
**López Llorca, Luis Vicente**

⑳ Agente: **Campo Castel, Domingo del**

㉑ Título: **Procedimiento para la producción de hongos entomopatógenos a partir de la utilización del mesocarpo de la almendra.**

㉒ Resumen:

Procedimiento para la producción de hongos entomopatógenos a partir de la utilización del mesocarpo de la almendra, que consiste en la utilización de un hongo denominado *Verticillium lecanii* inoculado sobre agar extracto de maíz, dispuesto sobre una placa Petri estéril de 9 centímetros de diámetro, utilizándose colonias del hongo de aproximadamente siete días de crecimiento, estando el mesocarpo de la almendra secado al aire y cortado en fragmentos de 5x5 milímetros, el cual se sumerge a temperatura ambiente durante una hora en el agua destilada hasta alcanzar la saturación, para posteriormente ser esterilizado por calor húmedo, mediante un autoclave de vapor durante 15 minutos a 120°C de temperatura, inoculándose 100 conidios diluidos en 5 mililitros de agua destilada estéril, produciéndose la germinación de los conidios a partir de los seis días, realizándose la operación de inoculado sobre una placa Petri.

ES 2 134 174 A1

## DESCRIPCION

Procedimiento para la producción de hongos entomopatógenos a partir de la utilización del mesocarpo de la almendra.

### Objeto de la invención

La presente memoria descriptiva se refiere a una solicitud de Patente de Invención, relativa a un procedimiento para la producción de hongos entomopatógenos a partir de la utilización del mesocarpo de la almendra, cuya finalidad es la de resolver una pluralidad de problemas, fundamentalmente económicos, puesto que al tratarse de un residuo agrícola, se podría disponer de él sin coste añadido alguno, siendo técnicamente sencillo el hecho de poner contar con biofactorías de hongos entomopatógenos en las proximidades de las empresas, en las cuales se realiza el pelado y procesado de las almendras, consiguiéndose consecuentemente que la producción de conidios en masa sea simple, barata y eficiente, es decir permitiendo en síntesis que los hongos entomopatógenos obtenidos puedan ser utilizados como insecticidas biológicos en el campo, a partir de un coste de producción sensiblemente económico.

### Campo de la invención

Esta invención tiene su aplicación dentro de la industria química, aplicada en la agricultura.

### Antecedentes de la invención

En la práctica, los substratos más corrientes para la producción de entomopatógenos, son productos primarios de la agricultura, como los que se han utilizado para la especie *Metarhizium anisopliae*.

En Sudamérica y en el este de Asia, el hongo se produce sobre arroz o cereales autoclavados, y este proceso permite la producción de cientos de kilos de material, producción que suele aplicarse sobre el suelo con objeto de controlar las plagas de insectos existentes sobre la superficie.

Se han desarrollado medios de cultivo, siendo de especial interés aquellos que tengan características naturaleza y puedan ser obtenidos fácilmente a bajo costo.

Mycotech Corporation ha desarrollado un cultivo en un medio sólido, con un substrato de partículas de almidón, donde se desarrollan los hongos entomopatógenos.

En Canadá se ha desarrollado el cultivo de hongos entomopatógenos sobre salvado húmedo, y también se ha utilizado como substrato para la producción de los hongos entomopatógenos, arroz prehumedecido antes de su esterilización, obteniéndose 3 kilos de conidios por cada 100 kilos de substrato inoculado.

También, se han hecho estudios en medio líquido que decantan claramente que éstos son económicamente viables, necesitando consecuentemente estudios de viabilidad de los conidios, virulencia y efectividad.

Los conidios del hongo *Metarhizium anisopliae* se han obtenido en superficies de agarnutrientes o en materiales orgánicos, tal y como pueden ser cereales, arroz, guisantes y maíz. En cultivo líquido se desarrollan pellets de hifas y blastosporas.

Se han desarrollado otros medios basados en productos agrícolas diversos, tal y como pueden

ser salvado húmedo, maíz, harina de habichuelas y agua, teniéndose conocimiento por parte del solicitante de la utilización de un medio compuesto por una cubierta de semilla de algodón en polvo, salvado húmedo, harina de maíz y agua.

El hongo entomopatógeno *Hirsutella thompsonii* se cultivo por medios líquidos obtenidos a partir de salvado de trigo, patatas, zanahoria, harina de maíz e infusión de maíz, realizándose la conservación en paja, salvado de trigo, agua destilada, así como en una solución salina fisiológica, aceite mineral y gel de sílice anhidro a temperatura ambiente y en refrigeración, siendo esta última la más adecuada.

Como se sabe, los insectos son responsables directos de muchos daños de gran importancia económica en cultivos y bosques, habiéndose constatado que los insecticidas químicos que se utilizan en la actualidad para su control, al margen del sustancial coste económico que suponen causan daños directos al cultivo donde se aplican.

Hay ejemplos de insecticidas (DDT entre ellos) con impacto ambiental "histórico", cuyo uso causó alteración del balance biológico de los ecosistemas.

Debido a lo anteriormente citado, sería interesante desarrollar otros medios de control de los insectos como alternativa al uso exclusivo de los insecticidas químicos, sabiendo el solicitante que muchos cultivos de invernadero reciben, al menos, dos aplicaciones de distintos insecticidas por semana, con objeto de reducir las poblaciones de insectos, tal y como puede ser la mosca blanca.

Además, la resistencia a los insecticidas en las poblaciones de insectos disminuye su eficacia y obliga a la utilización de dosis de insecticidas sustancialmente elevadas.

Lo anteriormente citado suele originar en un ambiente restringido, como por ejemplo los invernaderos, un problema importante de acumulo de residuos, lo que obliga a buscar alternativas para, al menos, reducir la frecuencia de aplicaciones de fitosanitarios, con independencia de su procedencia.

De todos los patógenos de insectos, los hongos entomopatógenos son los más comúnmente aislados.

Por ejemplo, se han aislado procedentes de moscas blancas infectadas, más de 20 especies de hongos, incluyendo *Verticillium lecanii*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces farinosus* entre otros.

El uso de agentes microbiológicos para el control de plagas de insectos se está convirtiendo en una práctica común en muchos países.

Ello se debe a que su uso evita los problemas relacionados con los productos químicos, sobre todo desde el punto de vista de residuos y desequilibrio biológico.

Para que estos agentes microbiológicos puedan ser utilizados a escala, es necesario el desarrollo de métodos de cultivo de éstos hongos en medios de crecimiento de bajo coste, a la vez de fácil preparación y eficacia en la producción de inóculo.

A su vez, los hongos una vez producidos deben funcionar como insecticidas biológicos en el campo.

Actualmente, por parte del solicitante, no se tiene conocimiento de la existencia de un procedi-

miento, método o sistema que facilite la obtención de la invención decantada como idónea.

### Descripción de la invención

El procedimiento para la producción de hongos entomopatógenos a partir de la utilización del mesocarpo de la almendra que la invención propone, constituye en sí mismo una evidente novedad dentro de su específico campo de aplicación, ya que el uso del mesocarpo de almendra como sustrato para la producción de hongos entomopatógenos se configura como una solución muy adecuada, especialmente en los países o zonas de clima mediterráneo, ya que en efecto, el almendro es un cultivo de secano, que no precisa de prácticas agrícolas sofisticadas, produciendo cantidades importantes de mesocarpo que al pelar las almendras se descartan y dejan secar al aire.

De forma más concreta, el procedimiento para la producción de hongos entomopatógenos a partir de la utilización del mesocarpo de la almendra, está constituido a partir del material descartado en las operaciones de pelado de las almendras propiamente dicho, es decir, del propio mesocarpo, el cual con pocas modificaciones se emplea como sustrato de crecimiento para hongos entomopatógenos.

En resumen, se trata en primer lugar de esterilizar de forma económica, tal y como puede ser por tratamiento breve con calor húmedo o hipoclorito, el mesocarpo seco de la almendra, previa saturación en agua.

Posteriormente, se utiliza el inóculo (esporas), producido en medios de cultivo en laboratorio para inocular el mesocarpo, y el sustrato inoculado se incuba en condiciones de asepsia y se utiliza directamente o se puede aprovechar en aplicaciones varias, tal y como se describirá a continuación.

En síntesis, se trata de un subproducto de la agricultura de un cultivo típicamente mediterráneo, el cual ha sido elegido como sustrato por considerarse que como tal, cumple los requisitos básicos para la producción en masa de hongos entomopatógenos, ya que es un residuo de cultivo que generalmente se descarta, pero sin embarco, a diferencia de otros sustratos, contiene nutrientes y aporta gran superficie para la esporulación de los hongos inoculados.

Por lo tanto, se han explotado sus posibilidades para que por sí solo o conjuntamente con otros métodos, tal y como puede ser la fermentación líquida con agitación pueda utilizarse de forma práctica en la producción de inóculo de hongos entomopatógenos.

Además de lo anteriormente citado, la biomasa de hongos entomopatógeno sobre el mesocarpo, podría utilizarse como inóculo para ser aplicado directamente o con pocas modificaciones contra plagas de insectos del suelo.

Alternativamente, se podría formular dicho inóculo en un preparado para pulverizar zonas aéreas de plantas afectadas por plagas.

En síntesis, la invención contempla en primer lugar el estudio de la flora microbiana que aparece en el mesocarpo de la almendra, utilizándose como cepas para comprobar la eficacia del mesocarpo de la almendra como sustrato de crecimiento de los HONGOS ENTOMOPATO-

GENOS, utilizándose la colección de hongos del Grupo de Fitopatología del Departamento de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales de la Universidad de Alicante.

Debe indicarse que todas las cepas utilizadas pertenecen a la especie *Verticillium lecanii*, un deuteromiceto del grupo de los hifomicetos, manteniéndose los hongos a una temperatura de 4°C en CMA.

Con objeto de que la flora microbiana del mesocarpo de la almendra no inhibiera la multiplicación del inóculo de los hongos entomopatógenos sobre el mesocarpo de la almendra, se realiza su esterilización, la cual se lleva a cabo por medios físicos, es decir por calor húmedo, o bien por medios químicos, es decir por desinfectante, utilizando una fuente de luz ultravioleta.

Como método físico de esterilización del mesocarpo de la almendra, se uso el autoclave de vapor, que utiliza el calor húmedo como agente esterilizante.

El agente químico esterilizante puede ser una disolución de hipoclorito sódico al 1 % en agua.

El método seguido para la esterilización del mesocarpo de la almendra mediante luz ultravioleta, puede ser opcionalmente mediante la preparación de cinco placas Petri con el mesocarpo completo de tres almendras cada una, y cinco placas Petri conteniendo 1 gramo de mesocarpo de almendra molida y tamizado (teniendo el tamiz una luz de 1 milímetro).

Posteriormente, se comprobó el efecto del mesocarpo de la almendra sobre el crecimiento de *Verticillium lecanii*, y por último se realizó la inoculación y multiplicación de *Verticillium lecanii* sobre el mesocarpo de la almendra, recogiendo los conidios de una cepa.

Resumiendo la invención, ésta consiste en la obtención de un agente microbiológico, es decir hongos entomopatógenos para el control de plagas de insectos a partir de un método o procedimiento de cultivo en medios de crecimiento de bajo costo, fácil preparación, y eficacia en la producción del inóculo, y a su vez, los hongos una vez producidos actuar como insecticidas biológicos en el campo.

### Realización preferente de la invención

El procedimiento para la producción de hongos entomopatógenos a partir de la utilización del mesocarpo de la almendra que se preconiza, está constituido a partir de la utilización de *Verticillium lecanii* porque se trata de un organismo que infecta a grupos de insectos tan importantes como los pulgones (homópteros), moscas blancas (tisanópteros) o las cochinillas (homópteros).

Se inocula el hongo (fragmento de 5x5 mm.) sobre agar extracto de maíz (CMA, OXOID), dispuesto en una placa Petri estéril de 9 centímetros de diámetro.

Para inocular el mesocarpo se utilizan colonias del hongo de aproximadamente siete días de crecimiento, y el mesocarpo seco al aire de la almendra, se corta en fragmentos de 5x5 milímetros, y se sumerge a temperatura ambiente durante una hora en agua destilada, tiempo considerado como suficiente para alcanzar la saturación.

Transcurrido este tiempo, se esterilizan por calor húmedo mediante autoclave de vapor durante 15 minutos a 120°C.

Una vez estériles, se disponen los fragmentos en placas de Petri estériles de modo que cubran la superficie de las mismas y se recogen los conidios de una placa Petri con CMA de siete días y se cuentan mediante una cámara de Neubauer, para ajustar mediante diluciones el número de conidios a 100.

En cada placa Petri, se inoculan 100 conidios diluidos en 5 mililitros de agua destilada estéril.

Al cabo de seis días se produce la germinación de los conidios y aparecen las primeras colonias sobre el mesocarpo de la almendra.

Trece días después de la inoculación, debido a la esporulación del hongo, las colonias son muy abundantes y no se puede estimar con facilidad la multiplicación del hongo.

Para estimar la multiplicación de hongo entomopatógeno sobre el mesocarpo de la almendra, se determina la producción global de conidios a partir del inóculo sembrado.

Para ello, se sumergen los fragmentos mesocárpicos en 50 mililitros de agua destilada estéril y se agitan a 200 r.p.m durante 25 minutos.

Tras la agitación, la suspensión de conidios se filtra a través de muselina estéril y posteriormente por lana de vidrio (para obtener una suspensión

“limpia” de conidios), llevándose a cabo la determinación final del número de conidios mediante una cámara de Neubauer y después de dos semanas de incubación, el número de conidios asciende a 591,6 multiplicado por  $10^6$ , a partir de los 100 conidios que se sembraron como inóculo (dos veces más que sobre CMA).

La viabilidad de estos conidios puede determinarse bien por siembra de los mismos en CMA, o por tinción con diacetato de fluoresceína (colorante que tiñe las estructuras vivas) y observación en un microscopio óptico dotado de equipo de epifluorescencia con los filtros adecuados, obteniéndose en ambos casos un 64% de conidios vivos teñidos o germinados sobre el medio.

No se considera necesario hacer más extensa esta descripción para que cualquier experto en la materia comprenda el alcance de la invención y las ventajas que de la misma se derivan.

Los materiales, forma, tamaño y disposición de los elementos serán susceptibles de variación, siempre y cuando ello no suponga una alteración a la esencialidad del invento.

Los términos en que se ha descrito esta memoria deberán ser tomados siempre con carácter amplio y no limitativo.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de hongos entomopatógenos a partir de la utilización del mesocarpo de la almendra, estando destinados los hongos entomopatógenos para ser utilizados una vez producidos como insecticidas biológicos en el campo, **caracterizado** por estar constituido a partir de la inoculación de hongos entomopatógenos de la cepa de *Verticillium lecanii* en un fragmento de 5x5 mm. sobre agar extracto de maíz dispuesto sobre una placa Petri estéril de 9 centímetros de diámetro, realizándose la inoculación del hongo sobre el mesocarpo de la almendra con colonias del hongo entomopatógeno que tendrán aproximadamente siete días de crecimiento, previo secado al aire y cortado en fragmentos de 5x5 milímetros del mesocarpo de la almendra, el cual posteriormente será sumergido en agua con temperatura ambiente durante una hora, debiendo el agua destilada y manteniéndose el mesocarpo de la almendra en el agua destilada hasta que alcance la saturación, realizándose posteriormente la esterilización del mesocarpo de la almendra saturado en agua destilada, utilizando calor húmedo, y con un autoclave de vapor durante un tiempo aproximado de 15 minutos, con una temperatura de 120°C.

2. Procedimiento para la producción de hongos entomopatógenos a partir de la utilización del mesocarpo de la almendra, según la primera reivindicación, **caracterizado** porque una vez que los fragmentos del mesocarpo de la almendra están esterilizados, estos fragmentos se sitúan en placas de Petri estériles, cubriendo la superficie de las placas Petri y retirándose los conidios de una placa Petri utilizada con CMA de siete días de crecimiento, contándose los conidios existentes sobre la placa Petri determinada mediante la utilización de una cámara de Neubauer, y ajustándose el número de conidios a 100.

3. Procedimiento para la producción de hongos entomopatógenos a partir de la utilización del mesocarpo de la almendra, según las anteriores reivindicaciones, **caracterizado** porque en cada una de las placa de Petri, se inoculan 100 conidios diluidos en 5 mililitros de agua destilada estéril.

4. Procedimiento para la producción de hongos entomopatógenos a partir de la utilización del mesocarpo de la almendra, según la tercera reivindicación, **caracterizado** porque al cabo de seis días se produce la germinación de los conidios y apareciendo las colonias de hongos entomopatógenos sobre el mesocarpo de la almendra.

5. Procedimiento para la producción de hongos entomopatógenos a partir de la utilización del mesocarpo de la almendra, según las anteriores reivindicaciones, **caracterizado** porque para estimar la multiplicación de los hongos entomopatógenos sobre el mesocarpo de la almendra, se determina la producción global de conidios a partir del inóculo sembrado, sumergiendo los fragmentos mesocárpicos en 50 mililitros de agua destilada estéril y agitándose durante 25 minutos a 200 r.p.m.

6. Procedimiento para la producción de hongos entomopatógenos a partir de la utilización del mesocarpo de la almendra, según la quinta reivindicación, **caracterizado** porque una vez terminada la agitación de los fragmentos mesocárpicos en 50 mililitros de agua destilada estéril, la suspensión de conidios se filtra a través de muselina estéril y posteriormente se realiza un segundo filtrado, utilizando lana de vidrio, obteniéndose una suspensión "limpia" de conidios.

7. Procedimiento para la producción de hongos entomopatógenos a partir de la utilización del mesocarpo de la almendra, según las anteriores reivindicaciones, **caracterizado** porque para la determinación final del número de conidios, se utiliza una cámara de Neubauer, obteniéndose tras dos semanas de incubación, un aumento en el número de conidios estimado en 591,6 por 10<sup>6</sup>, a partir de los 100 conidios que se sembraron como inóculo.

8. Procedimiento para la producción de hongos entomopatógenos a partir de la utilización del mesocarpo de la almendra, según las anteriores reivindicaciones, **caracterizado** porque la viabilidad de estos conidios se determina por siembra de los mismos en CMA, o por tinción con diacetato de fluoresceína y observación en un microscopio óptico dotado de equipo de epifluorescencia con los filtros adecuados, obteniéndose en ambos casos un 64% de conidios vivos teñidos o germinados sobre el medio.



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 134 174  
⑫ N.º solicitud: 9800174  
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 30.01.98  
⑭ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.<sup>6</sup>: C12N 1/14, A01N 63/04 // (C12N 1/14, C12R 1:645)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados                                                                                                           | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| A         | WO 9510598 A1 (MYCOTECH CORP.) 20.04.1995                                                                                    |                            |
| A         | BASE DE DATOS WPI, semana 8149, Londres: Derwent Publications Ltd., AN 81-90575, SU 810180 A (FOREST FOOD RESOURC), resumen. |                            |
| A         | BASE DE DATOS WPI, semana 9442, Londres: Derwent Publications Ltd., AN 94-337403, JP 06-261742 A (SHIZOUKA KEN), resumen.    |                            |

#### 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  
15.07.99

Examinador  
J. López Nieto

Página  
1/1