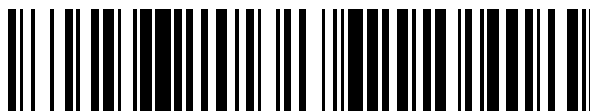


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 756**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
C02F 3/34 (2006.01)
A01C 3/00 (2006.01)
C05F 3/00 (2006.01)
C05F 11/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2013 PCT/NL2013/050949**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14104883**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2013 E 13818519 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2938720**

54 Título: **Consortio para la reducción de la emisión de amoníaco y/o de metano en el estiércol o el suelo**

30 Prioridad:

31.12.2012 NL 2010074

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

14.05.2018

73 Titular/es:

**RINAGRO B.V. (100.0%)
 Buren 4
 8756 JP Piaam, NL**

72 Inventor/es:

JOUSTRA, RINZE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 667 756 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Consorcio para la reducción de la emisión de amoníaco y/o de metano en el estiércol o el suelo

Esta invención se relaciona con un consorcio y con el uso del consorcio para la reducción de la emisión de amoníaco y/o metano en el estiércol.

- 5 El estiércol es materia orgánica y puede usarse como fertilizante orgánico en la agricultura. El estiércol contribuye a la fertilidad del suelo añadiendo materia orgánica y nutrientes tales como el nitrógeno, que quedan atrapados por las bacterias en el suelo. El estiércol contiene nitrógeno (N) en las formas inorgánica y orgánica. El N orgánico no está disponible para el crecimiento del cultivo hasta que se mineraliza dando amonio (NH_4^+). El N del amonio se forma equitativamente y está disponible para la absorción por la planta, pero una parte está inmovilizada por biomasa microbiana y las bacterias nitrificantes convierten el NH_4^+ en nitrato (NO_3^-) que está sometido a pérdidas por lixiviación o desnitrificación y la subsiguiente pérdida a la atmósfera. El amoníaco volátil (NH_3) en el estiércol es transformado a partir de NH_4^+ y puede perderse en la atmósfera después de la aplicación al campo. El nitrógeno perdido en la atmósfera no está disponible para la producción de cultivo. Además, la emisión de amoníaco (NH_3) procedente de la producción ganadera causa efectos ambientales indeseables. Además del efecto indeseable del NH_3 , el estiércol también comprende metano (CH_4). El metano es un gas de efecto invernadero y es universalmente sabido que se debe reducir la emisión de CH_4 en la atmósfera.

Los documentos US6025187 y WO2007072935 describen métodos para reducir compuestos nitrogenados orgánicos en los desechos animales, tales como el estiércol, que implican el uso de un consorcio bacteriano.

- 20 Por tanto existe la necesidad de un producto que pueda ser añadido al estiércol, que puede mejorar la calidad del estiércol al proporcionar una mayor cantidad de nutrientes, como el nitrógeno, disponible para los cultivos.

Existe la necesidad de un producto que pueda añadirse al estiércol y pueda proporcionar una mejor calidad de fertilización a las plantas de cultivo.

- 25 Además, existe la necesidad de un producto que pueda añadirse al estiércol, que ayude a reducir la emisión de amoníaco y/o metano en el estiércol o en el suelo. Es un objeto de esta invención, entre otros objetos, proporcionar un consorcio de microorganismos que se puedan añadir al estiércol para mejorar la calidad del mismo.

También, es otro objeto de esta invención proporcionar un consorcio de microorganismos que pueda procesar el estiércol de modo que se reduzca la emisión de amoníaco y/o metano.

También, es otro objeto de esta invención proporcionar un consorcio de microorganismos que puedan usarse para mejorar el estiércol de forma que aumente la disponibilidad de nitrógeno para las plantas.

- 30 También, es un objeto de esta invención proporcionar un consorcio de microorganismos que se puedan añadir al suelo, para mejorar la fertilidad del mismo.

Entre otros objetos, este objeto es satisfecho, al menos en parte si no es completamente, por la bacteria o el consorcio que se indica en el anexo.

- 35 El inventor encontró sorprendentemente una nueva bacteria que reside en un consorcio. Este consorcio comprende una secuencia de ácido nucleico rDNA 16S parcial que tiene más del 85% de identidad de secuencia con las secuencias presentadas como SEQ ID NO: 1, o el complemento de las mismas. La bacteria del consorcio y el consorcio proporcionan al estiércol una calidad mejorada, de manera que se libera menos amoníaco y/o metano del estiércol, en comparación con el estiércol en el que no se añade este consorcio.

- 40 El ADNr 16S parcial puede encontrarse usando el método de secuenciación de rDNA 16S como se describe en Hall, L., Doerr, K. A., Wohlfiel, S. L., Roberts, G. D., 2003. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory, J. Clin. Microbiol. 4, 1447 - 1453, cuya referencia se incorpora en su totalidad. La PCR se realizó en suspensión bacteriana con los siguientes cebadores (secuencias en dirección 5' a 3') 16S500F (tggagagttgatcctggctcag) y 16S500R (taccgcggtgctggcac).

- 45 La identidad de secuencia, como se usa en el presente documento, se define como el número de nucleótidos alineados consecutivos idénticos, o aminoácidos, a lo largo de la longitud completa de las presentes secuencias dividido por el número de nucleótidos, o aminoácidos, de la longitud completa de las secuencias presentes y multiplicado por 100. Por ejemplo, una secuencia con un 80% de identidad con la SEC ID N° 1 comprende, a lo largo de la longitud total de 550 aminoácidos de la SEC ID N°: 1, 440 aminoácidos consecutivos alineados idénticos, es decir, $440/550 * 100\% = 80\%$.

Se describe en el presente texto una bacteria recién descubierta. Se ha medido un árbol filogenético usando el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means) proporcionado por el programa de Bionumerics (de Applied Maths), que mide los tamaños de banda del ribotipo PCT. Se encontró que la bacteria que tiene una secuencia de ADNr 16S que comprende la SEQ ID NO: 1 pertenece al género Bacteroidetes y es en

particular un bacteriodetes sp.

Esta bacteria está depositada en el CBS bajo el depósito nº CBS 134116, depositado en CBS (Centraal Bureau voor Schimmelcultures el 27 de diciembre de 2012 bajo el Tratado de Budapest), en donde CBS 134116 es *bacteriodetes*.

5 La bacteria tiene una identidad de secuencia que es al menos 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% idéntica a la secuencia que se presenta como SEQ ID NO: 1. En una realización preferida, la bacteria tiene una identidad de secuencia que es al menos 99,7, 99,8, 99,9, 100% idéntica a la secuencia que se presenta como SEQ ID NO: 1.

10 En el presente texto se describe también un consorcio que comprende una bacteria como se describió anteriormente. El consorcio puede comprender además levaduras del género *Candida*, preferiblemente *Candida boidinii* C. Ramirez y/o *Candida etanolica* Rybárová, Stros y Kockova-Kratochvílová, y/o puede comprender además las bacterias *Lactobacillus rhamnosus /casei*, *Acetobacter pasteurianus/lovaiensis* y/o *Rhodococcus facians/yunnanensis*.

15 El consorcio puede comprender además otras bacterias lácticas y otras bacterias acéticas tales como una o más bacterias elegidas entre el grupo que consiste en *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus ghanensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Bacillus subtilis sensu stricto*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus vallismorits*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus siamensis* y *Bacillus methylotrophicus*. En una realización preferida el consorcio comprende todas estas bacterias.

20 El consorcio mejora el estiércol y reduce la emisión de amoníaco y/o metano en comparación con el estiércol al que no se agrega ningún consorcio de acuerdo con esta invención. Por “estiércol” se entiende excrementos de animales, y puede estar en un estado semilíquido tal como un lodo.

25 El consorcio mejora el suelo y reduce la emisión de amoníaco y/o metano en comparación con el suelo al que no se añade consorcio de acuerdo con esta invención. Por “suelo” se entiende la cubierta suelta de partículas minerales que se superponen finamente en la superficie de la tierra, como el suelo que cubre las tierras donde se cultivan las cosechas.

La invención está relacionada con un consorcio como el depositado en el CBS, y tiene el número de depósito CBS134115, como se ha depositado en el Centraal Bureau for Schimmelcultures.

30 El consorcio de acuerdo con la invención comprende además un sacárido, preferiblemente un monosacárido y/o un disacárido. Se cree que el sacárido proporciona un entorno para las bacterias y las levaduras del consorcio, lo que produce una composición de bacterias y levaduras con una proporción tal que disminuye la producción de amoníaco y/o metano en el estiércol. Se cree que el consorcio proporciona un entorno en el estiércol, que no es favorable para las bacterias productoras de amoníaco.

El sacárido puede derivarse de la fuente de caña o de la fuente de remolacha y es preferiblemente una melaza de caña.

35 También se describe en el presente texto el uso de la SEQ ID NO: 1 para detectar o identificar una bacteria que tiene la secuencia de ácidos nucleicos, o al menos el 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1.

También se describe en el presente texto un consorcio de microorganismos que comprende microorganismos que proporcionan la reducción de la emisión de amoníaco y/o metano (NH₃) en el estiércol, como puede encontrarse en un consorcio como el depositado en CBS bajo el nº de depósito CBS 134115.

40 En otro aspecto, la invención está relacionada con el uso de un consorcio de acuerdo con la invención, para la reducción de nitrógeno en el estiércol. El uso puede llevarse a cabo, por ejemplo, pulverizando en el estiércol una solución que comprende el consorcio según la invención. Esto puede realizarse, por ejemplo, usando un método y un producto como se describe en el documento EP2674412.

El estiércol es preferiblemente estiércol animal procedente, por ejemplo, de cerdos, vacas, aves de corral o caballos.

45 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un consorcio de acuerdo con la invención, para la reducción del nitrógeno en el suelo. El uso puede realizarse, por ejemplo, pulverizando en el suelo una solución que comprende el consorcio según la invención.

50 En otro aspecto, la invención está relacionada con un método para reducir la emisión de amoníaco y/o metano en el estiércol, que comprende añadir al estiércol el consorcio según la invención e incubar dicho consorcio durante un tiempo suficiente que permita reducir la formación de amoníaco y/o metano en el estiércol.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para reducir la emisión de amoníaco y/o metano en el suelo, que comprende añadir al suelo el consorcio de acuerdo con la invención para incubar dicho consorcio durante un tiempo suficiente que permita reducir la formación de amoníaco y/o metano en el suelo.

Otro aspecto de acuerdo con la invención es el uso del estiércol según la invención como fertilizante orgánico.

El consorcio de acuerdo con la invención contribuye a una reducción de la emisión de amoníaco. Se cree que hay más nitrógeno en una fase que el que puede ser utilizado por las plantas, como las plantas de cultivo. Sorprendentemente, se encuentra que el consorcio de acuerdo con la invención se puede usar para mejorar el estiércol o el suelo y que además de obtenerse la reducción de amoníaco también se mejoran las propiedades fertilizantes del estiércol o del suelo según la invención.

Las ventajas y las realizaciones como se describen para varios aspectos en la invención pueden ser válidas para los otros aspectos de acuerdo con la invención.

La presente invención se describirá con más detalle en el siguiente ejemplo de realizaciones preferidas de la invención.

Figura 1.

Dendrogramas de análisis de conglomerados basados en similitudes por pares de la nueva bacteria encontrada *Bacteroidetes phylum* (figura 1A) (CBS 134116). Los números anteriores muestran la cuantía de la similitud medida utilizando el agrupamiento basado en similitud usando el método de agrupación por pares no ponderada (UPGMA).

Ejemplo 1.

Prueba de emisión de amoníaco en el estiércol de una granja de cerdos.

En dos corrales para cerdos se han realizado medidas de emisión de amoníaco. En un corral se ha usado el dispositivo como se describe en el documento EP2674412 para tratar el lodo procedente de los cerdos. El consorcio depositado en CBS bajo el nº CBS 134115, ha sido pulverizado sobre el lodo excretado por los cerdos en el corral 1. El corral 2 comprendía un lodo que no fue tratado con el consorcio.

En cada corral se guardaron 80 cerdos y la medida se realizó durante un período de 12 semanas. Cada día, una composición que comprende el consorcio fue pulverizada en el corral 1 durante 12 semanas. La emisión de NH₃ se ha medido durante 24 horas utilizando la norma NEN 2826 (NEN 2826, 1999: Luchtkwaliteit. Uitworp door stationaire puntbronnen. Monsterneming am bepaling van het gehalte aan gasvormig ammoniak) tomando muestras utilizando una botella de lavado de gas que comprende un líquido de absorción. Las medidas de amoníaco se realizaron llevando a cabo un método de absorción y análisis químico húmedo. Las muestras se tomaron durante varios ciclos de semanas de los cerdos y durante varios meses del año.

La Tabla 1 muestra los resultados de la emisión de amoníaco. El estiércol que fue tratado con el consorcio como el depositado en CBS bajo el nº CBS 134115 mostró un promedio de disminución del 35% de emisión de amoníaco en el estiércol en comparación con el estiércol del corral 2. Las medidas se tomaron en varias temporadas (verano, invierno y otoño) y también en diferentes etapas de crecimiento de los cerdos (12 semanas en total, y cada período de dos semanas cuenta para 1 etapa). En el ajuste de la medida, la cantidad de animales, la edad y el peso de los animales fueron similares en ambos corrales.

Tabla 1.

Emisión de amoníaco por año en kg / animal			
Etapa	Pocilga 1	Pocilga 2 (control)	% de reducción
4	6,2	11,3	45
2	3,5	5,5	35
5	4,3	7,2	39
1	4,2	5,8	26
5	4,7	6,2	25
3	2,9	4,8	38
Promedio	6,8	4,3	35

Ejemplo 2.

Prueba de emisión de metano en el estiércol para una granja de cerdos.

Se realizó un ajuste similar al del ejemplo 1. El metano se midió tomando una muestra y usando el método del pulmón según la norma NEN-EN, durante 24 h.

5 Hubo un promedio de reducción de metano del 19% encontrado en dos granjas diferentes.

La tabla 2 muestra los resultados en una granja de la medida del metano en la pocilga 1, en la que la mezcla del consorcio se añadió al estiércol, en comparación con la pocilga 2 (control), en la que no se añadió mezcla de consorcio.

Tabla 2.

	Pocilga 1	Pocilga 2	Etapa
Metano ppm	14,8	17,8	1 (verano)
Emisión de metano/animal/año (kg/animal/año)	1,0	1,6	1 (verano)
Metano ppm	37,0	52,6	3 (primavera)
Emisión de metano/animal/año (kg/animal/año)	1,9	3,9	2 (invierno)
Metano ppm	32	60,6	3 (primavera)
Emisión de metano/animal/año (kg/animal/año)	2,1	4,3	3 (primavera)

10

Ejemplo 3.

Identificación del consorcio.

Una muestra del consorcio como el depositado en CBS bajo el nº de depósito NR CBS 134115 se analizó para identificar sus componentes. El análisis se llevó a cabo por el servicio de identificación BCCM™/LMG en Gent, Bélgica.

15

Se tomó de forma aséptica una parte alícuota de la muestra (unas pocas gotas) y se extendió uniformemente sobre:

- medio LMG nº 66 (MRS) y se incubó anaeróticamente a 37 °C durante 1 día,
- medio LMG nº 37 (RCM) y se incubó anaeróticamente a °C durante 1 día,
- medio LMG nº 13 y se incubó aeróticamente a 28 °C durante 1 día,
- 20 - medio LMG nº 185 (TSA) y se incubó aeróticamente a 28 °C durante 2 días.

En los diferentes medios se observaron diferentes tipos de colonias que fueron purificadas para posteriores análisis.

Cuatro de las colonias purificadas (t1, t2, t6 y t7) se sometieron a análisis de la huella de ADN usando AFLP™. El AFLP™ es una técnica basada en PCR para identificación de la huella del genoma completo a través de la amplificación selectiva de fragmentos de restricción (Vos et al., Nucleic Acids Research 23: 4407 - 4414 (1995)). Se usó la combinación de cebadores E01/T11 (Keygene).

25

El análisis de grupos de la huella de ADN de AFLP™ con las huellas de ADN de AFLP™ de referencia de los taxa (grupos taxonómicos) de bacterias del ácido láctico (incluyendo las bifidobacterias), identificó los cultivos como *Lactobacillus rhamnosus* (t1), *Lactobacillus casei* (t2), *Lactobacillus ghanensis* (t6) y *Lactobacillus paracasei* (t7). Se ha de observar que los datos de la bibliografía indican que el tipo de cepa de *Lactobacillus casei* pertenece a la especie *Lactobacillus zeae*. Sin embargo, la comisión judicial del comité internacional sobre sistémica de procariotas decidió que el nombre *Lactobacillus zeae* no debía utilizarse (Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 58: 1764 - 1765, (2008)).

30

Dos de las colonias purificadas (t3 y t4) se sometieron a análisis de secuencia de ADNr 16S parcial. El ADN total se preparó de acuerdo con el protocolo de Niemann et al. (J. Appl. Microbiol. 82: 477 - 484 (1997)). Un fragmento del

5 gen rDNA 16S (correspondiente a las posiciones 8 - 1541 en el sistema de numeración de *Escherichia coli*) se amplificó mediante PCR utilizando cebadores conservados. El producto de la PCR se purificó usando el kit de limpieza de PCR NucleoFast® 96 (Macherey-Nagel, Alemania). Las reacciones de secuenciación se realizaron usando el kit de purificación BigDye® XTerminator® (Applied Biosystems, EE. UU.). El ensamblaje de secuencias se realizó utilizando el paquete de software BioNumerics (Applied Maths, Bélgica).

El análisis filogenético se llevó a cabo utilizando el paquete de software Bionumerics (Applied Maths, Bélgica) después de incluir la secuencia consenso en un alineamiento de secuencias de subunidades ribosómicas pequeñas recopiladas de la biblioteca internacional de secuencias de nucleótidos EMBL.

10 Se creó una matriz de similitud por cálculo de homología con una penalización por hueco de 0%; las bases desconocidas fueron desechadas. De esta forma, se encontró una similitud de $\geq 97\%$, que es significativa para la posible identificación de especies, con varias especies de *Bacillus* descritas válidamente. Sin embargo, las similitudes altas de secuencia (99,1 - 100%, basadas en una secuencia parcial) obtenidas con todas las especies descritas válidamente de complejo *B. subtilis* (un conjunto de especies altamente relacionadas, que actualmente comprende *B. subtilis sensu stricto*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atropheus*, *B. vallismorits*, *B. mojavensis*, *B. tequilensis*, *B. siamensis* y *B. methylotrophicus*), indican que uno de los cultivos (t3) pertenece a una de estas especies. Para el otro cultivo, se encontró una similitud de $\geq 97\%$, que es significativa para la posible identificación de especies, con varias especies de *Lactobacillus* descritas válidamente. Sin embargo, las altas similitudes de secuencia (99,6 - 99,7) basadas en una secuencia parcial) obtenidas con las cepas tipo de *L. casei* (99,7%) y *L. zeae* (99,6%), indican que este cultivo (t4) pertenece a una de estas especies, en particular a *L. casei*.

20 Para un análisis adicional de la muestra, se tomó aseptícamente una parte alícuota y se realizó una dilución en serie (decimal) en agua fisiológica. Se distribuyeron uniformemente partes alícuotas de 0,1 ml en:

- medio LMG nº 185 (TSA) y se incubaron aeróbicamente a 28 °C durante 3 días.

25 Se observó un tipo de colonia adicional (t8) y se purificó para un análisis adicional por análisis de secuencia de ADN r 16S parcial como se describió anteriormente. De esta forma, se encontró una similitud de $\geq 97\%$, que es significativa para la posible identificación de especies, con varias especies de *Lactobacillus* descritas válidamente, si bien las elevadas similitudes de secuencia (99,6 - 99,9%, basadas en una secuencia parcial) obtenidas con las cepas tipo de ambas subespecies de *L. paracasei*, indican que este cultivo (t8) pertenece a esta especie.

Lista de secuencias

30 <110> Rinagro BV

<120> Nuevas bacteria para mejorar el estiércol

<130> 2NJ69

35 <160> 1

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

40 <211> 498

<212> ADN

<213> Bacteroidetes <phylum>

<220>

45 <221> fuente

<222> 1..498

<223> /organismo="Bacteroidetes <phylum>" /mo1_tipo="ADN sin asignar"

<400> 1

ES 2 667 756 T3

cctggctcag gatgaacgct agcggcaggc ttaatacatg caagtcgtgg ggcagcatga	60
atgtagcaat acatttgatg gcgaccggca aacgggtgcg gaacacgtac acaaccttc	120
tataagtggg gaatagccca gagaaatttg gattaatacc ccgtaacata acgatgtggc	180
atcacattgt tattatagct tcggcgctta ttgatgggtg tgcggctgat tagatagttg	240
gcgggtaac ggcccaccaa gtctacgac agtagctgat gtgagagcat gatcagccac	300
acgggcactg agacacgggc ccgactccta cgggaggcag cagtaaggaa tattggtaa	360
tggacgaag tctgaaccag ccatgccgcg tgaaggatta aggtcctctg gattgtaaac	420
ttcttttacc tgggacgaaa aaaggcgatt cttcgtcact tgacggtacc agatgaataa	480
gcaccggcta actccgtg	498

REIVINDICACIONES

1. Consorcio de microorganismos depositado en CBS bajo el nº de depósito CBS 134115.
2. Uso de un consorcio según la reivindicación 1ª para la reducción de la emisión de amoníaco y/o metano en el estiércol o en el suelo, preferiblemente en donde el estiércol es estiércol animal.
- 5 3. Estiércol que comprende un consorcio según la reivindicación 1ª.
4. Método para reducir el amoníaco y/o el metano en el estiércol o en el suelo, que comprende las etapas de añadir un consorcio según la reivindicación 1ª al estiércol o al suelo, e incubar dicho consorcio durante un tiempo suficiente que permite reducir la formación de amoníaco y/o metano en el estiércol.
5. El uso del estiércol según la reivindicación 3ª, como fertilizante orgánico.

10

Figura 1A

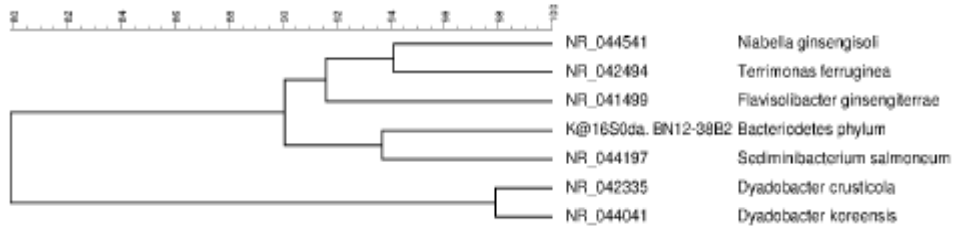


Figura 1B

