(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 734 256**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/02 (2015.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 39/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.09.2013 PCT/DE2013/100324**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014 WO14040590**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2013 E 13789478 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2895177**

(54) Título: **Uso de un preparado de ácido húmico para el tratamiento de animales de sangre caliente**

(30) Prioridad:

11.09.2012 DE 102012108438

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2019

(73) Titular/es:

WH PHARMAWERK WEINBÖHLA GMBH (100.0%)
Poststr. 58
01689 Weinböhla, DE

(72) Inventor/es:

KÜHNERT, MANFRED;
KRÜGER, MONIKA;
HAUFE, SVENT y
SHEATA, AWAD

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Nuria

ES 2 734 256 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

Uso de un preparado de ácido húmico para el tratamiento de animales de sangre caliente

La invención se refiere al uso de un preparado de ácido húmico aislado de celu-ligno-carbono para la aplicación en el tratamiento de enfermedades causadas por glifosato en animales de sangre caliente, en particular cuando el herbicida está presente en piensos.

El herbicida total glifosato, comúnmente conocido por el nombre de marca Roundup®, es un desarrollo de la década de 1970. El glifosato es el número uno en el mundo en términos de frecuencia de uso y en número de ventas. Desde 1996, las habas de soja RR (Roundup Ready) importadas han sido aprobadas en Europa como pienso y producto alimenticio sin obligación de etiquetado. No fue hasta 2004 que la obligación de etiquetado se convirtió en "OMG" (organismo modificado genéticamente). El ingrediente activo es universalmente utilizable. El mismo inactiva la enzima 5-enolpiruvil-ácido shikímico-3-fosfato sintasa (EP-SPS) y, por tanto, evita la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano) en plantas y algunos microorganismos, que luego mueren.

Una parte de estos microorganismos también pertenece a la microflora autóctona y a la fauna o microbiota del tracto gastrointestinal de humanos y animales. La reducción o ausencia completa de las denominadas bacterias promotoras de la salud (por ejemplo, lactobacilos, bifidobacterias, bacilos, enterococos) o sus productos metabólicos conducen a desequilibrios microbianos en este sistema orgánico, lo que puede tener graves consecuencias para la salud, ya que algunos microorganismos como Clostridium (C.) perfringens, C. tetani, C. botulinum, Salmonella Typhimurium son tolerantes a resistentes al glifosato y, cuando la flora autóctona antagónica desaparece, pueden surgir enfermedades con estos patógenos.

Aunque se han establecido los valores límite de la UE para muchos piensos y alimentos, no proporcionan ninguna información sobre el efecto de absorciones crónicas, a menudo durante toda la vida, del ingrediente activo en los sistemas de órganos de humanos y animales. Aunque la absorción diaria de glifosato compatible postulada por la UE es de 0,3 mg/kg de masa corporal, faltan declaraciones sobre sus consecuencias en el sistema nervioso, hormonal, metabólico e inmunológico en animales de sangre caliente.

Hasta ahora, se describen los siguientes efectos a largo plazo de glifosato de distintos grupos de trabajo: genotoxicidad, carcinogenicidad, citotoxicidad y teratogenicidad, así como procesos de degradación hormonal. Otros efectos del glifosato en los mamíferos se refieren al citocromo p450, a la aromatasa, a los receptores de estrógeno/testosterona, así como al sistema respiratorio, hepático y reproductor.

La descripción química del herbicida y sus derivados es conocida. Se utiliza para tratar plantas útiles para la protección contra plagas y malezas. A este respecto se efectúa una aplicación generalizada sin medidas de protección especiales y, al mismo tiempo, la influencia involuntaria de la calidad de los productos crudos cosechados y, con ello, de los piensos y alimentos producidos a partir de ellos por la contaminación con el herbicida. Se describen los daños a la salud en humanos y animales, la reducción de las calidades de los alimentos, piensos y productos crudos, así como daños consecuentes en la cadena alimentaria.

En particular, las concentraciones absorbidas en el cuerpo de animales de sangre caliente se excretan a través de productos de excreción del metabolismo y contaminan el ciclo de nutrientes adicionalmente, por lo que se producen daños duraderos en microorganismos en el suelo y en mamíferos. La inclusión en el ciclo de los nutrientes conduce a una intervención destructiva en el equilibrio de la salud de las plantas y a una contaminación del ciclo natural de las sustancias en la naturaleza viva.

En la literatura no se conocen hasta ahora informes de investigación que describan un procedimiento o similar para la inactivación del grupo de sustancias al que pertenece el glifosato. Un agente o un procedimiento que inhibe o previene los efectos mencionados anteriormente, en particular en animales de sangre caliente o su microflora autóctona y su fauna o microbiota, es actualmente desconocido según el estado de la técnica.

Los ácidos húmicos son conocidos según el estado de la técnica. El documento DE 196 50 317 C2 describe un aislado de celu-ligno-carbono CLK-GA, también llamado Leonardide, cuya fracción principal son ácidos húmicos naturales. Son cada porción amorfa de sustancias de color marrón oscuro a marrón en los suelos, lignitos, turbas y carbones marrones, que surgen en el curso de la denominada humificación de material orgánico en descomposición. Son solubles en bases diluidas, pero insolubles en ácidos minerales. Los ácidos húmicos naturales (nativos) no pueden clasificarse como sustancias claramente definidas en el sentido de la química estructural clásica. Esto se refleja en el hecho de que hasta hoy solo existen modelos de aproximación para la estructura química. A los bloques de construcción pertenecen además de estructuras de celulosa y lignina también estructuras poliiónicas con por ejemplo grupos de éster de ácido carboxílico, grupos hidroxilo, carbonilo y carboxilo fenólicos. Están presentes también estructuras de quinoides y flavonoides. Por el estado de la técnica se conocen, además, numerosas consideraciones sobre el ácido húmico, su aparición y sus efectos.

El documento US 2009/204187 A1 se refiere generalmente al uso de un tipo de arcilla curativa, que además de otros

componentes también generalmente contiene ácidos húmicos para la eliminación de toxinas del cuerpo de un mamífero. En la medida en que los ácidos húmicos aislados forman parte de la preparación, el aislamiento se efectúa desde un suelo (véase el párrafo 0015 y siguientes), posiblemente también a partir de turba (véase la sección 0023), pero no como aislado de celu-ligno-carbono.

Además, el amplio espectro de toxinas representado en el documento US 2009/204187 A1, que deben eliminarse, simplemente no comprenden glifosato, ya que este no apareció explícitamente en el momento de la publicación como toxina en relación con criaturas animales. Más bien, se considera que se degrada rápidamente y sin residuos, de modo que no se tuvieron en cuenta los efectos secundarios en alimentos o piensos, y no hubo razón alguna para tomar medidas contra esto.

En las publicaciones PIERLUIGI MAZZEI ET AL 2012 (PIERLUIGI MAZZEI ET AL: "Quantitative Evaluation of Noncovalent Interactions between Glyphosate and Dissolved Humic Substances by NMR Spectroscopy", ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY, tomo 46, N.º 11, 5 de junio de 2012 (05/06/2012), pp. 5939-5946, XP055099825, ISSN: 0013-936X, DOI: 10.1021/es300265a) y MADHUN Y A ET AL 1986 (MADHUN Y A ET AL: "BINDING OF IONIC AND NEUTRAL HERBICIDES BY SOIL HUMIC-ACID", SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. JOURNAL, SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMERICA, EE. UU., tomo 50, n.º 2, 1 de enero de 1986 (01-01-1986), páginas 319-322, XP009175942, ISSN: 0361-5995) se informa sobre estudios para la interacción entre glifosato y los ácidos fúlvicos solubles y ácidos húmicos o un efecto de unión. Como resultado, se encontró que el glifosato es capaz de unirse de manera espontánea y significativa a sustancias húmicas solubles (véase resumen PIERLUIGI MAZZEI ET AL 2012). Esto se traduce en la realización de que un peligro de agua resulta de estas sustancias húmicas cuando migran a través del perfil del suelo hacia una masa de agua.

Al mismo tiempo, sin embargo, se establece de acuerdo con la evaluación generalmente aceptada que el glifosato era un herbicida comparativamente menos tóxico y que solo la entrada constante en la masa de agua es problemática (compárese con PIERLUIGI MAZZEI ET AL 2012, p. 5939, columna 1 abajo). Esto no afecta a los problemas debidos a residuos en pequeñas dosis, que están lejos de tener un efecto tóxico directo, en sus efectos indirectos adversos por la influencia sobre la microbiología.

Las investigaciones descritas en la publicación ALBERS C N ET AL 2009 (ALBERS C N ET AL: "The influence of organic matter on Sorption and fate of glyphosate in soil - Comparing different soils and humic substances", ENVIRONMENTAL POLLUTION, BARKING, Gran Bretaña, tomo 157, N.º 10, jueves, 1 de octubre de 2009 (01/10/2009), páginas 2865-2870, XP026423000, ISSN: 0269-7491 [encontrado el 17-05-2009]) se dirigen a la absorción de glifosato en suelos y sustancias húmedas, que también contienen ácidos húmicos. Los ácidos húmicos aislados también se han investigado y se ha encontrado que tienen un mecanismo de unión. Dado que en la publicación no se incluyen indicaciones de los efectos de los ácidos húmicos aislados en general, y mucho menos del aislado de celu-ligno-carbono, se aplica correspondientemente lo explicado anteriormente en PIERLUIGI MAZZEI ET AL 2012.

La publicación A. PICCOLO ET AL 1992 (A. PICCOLO ET AL: "Adsorption of the herbicide glyphosate onametal-humicacidcomplex", SCIENCE OFTHETOTAL ENVIRONMENT, tomo 123-124, 1 de agosto de 1992 (01-08-1992), páginas 77-82, XP055099787, ISSN: 0048-9697, DOI: 10.1016/0048-9697(92)90134-E) se refiere especialmente a compuestos metálicos de ácido húmico, en particular hierro, en relación con la adsorción de glifosato. En particular, no se considera, sin embargo, el uso de ácidos húmicos especiales, tal como aislado de celu-ligno-carbono.

W WU ET AL 1997 (W WU ET AL: "Effect of Natural Dissolved Humic Material on Bioavailability and Acute Toxicity of Fenpropathrin to the Grass Carp, Ctenopharyngodon idellus", ECOTOXICOLOGY ANO ENVIRONMENTAL SAFETY, tomo 42, N.º 3, jueves, 6 de marzo de 1997 (06/03/1997), pp. 203-206, XP055099875, ISSN: 0147-6513, DOI: 10.1006/ee-sa.1998.1743) y DOBRANSKYTE A ET AL 2006 (DOBRANSKYTE A ET AL: "Effect of humic acid on water chemistry, bioavailability and toxicity of aluminium in the freshwater snail, Lymnaea stagnalis, at neutral pH", ENVIRONMENTAL POLLUTION, BARKING, Reino Unido, tomo 140, N.º 2, 1 de marzo de 2006 (01/03/2006), páginas 340-347, XP028011988, ISSN: 0269-7491, DOI: 10.1016/J.ENVPOL.2005.06.030 [encontrado el 2006-03-01]) no se ocupan en relación con el efecto de ácido húmico con una reducción de una actividad antimicrobiana. Porque a diferencia de fenpropatrina, el glifosato no se considera antibacteriano. Además, se están investigando los ácidos húmicos acuosos, pero sin especificar y en el sentido de una simulación de masas de agua naturales que presentan un contenido de sustancias húmicas disueltas. A este respecto se demostró que cuanto más alto es el contenido de sustancias húmicas disueltas y más fenpropatrina se une, menos fenpropatrina es absorbida por los peces que viven en el agua.

Por RITI SHARAN ET AL 2010 (RITI SHARAN ET AL: "Inactivation and sub-lethal injury of Escherichia coli in a copper water storage vessel: effect of inorganic and organic constituents", ANTONIE VAN LEEUWENHOEK, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, tomo 98, N.º 1, jueves, 1 de abril de 2010 (01/04/2010), páginas 103-115, XP019786541, ISSN: 1572-9699), los derivados del cobre y su actividad antimicrobiana se consideran con mayor detalle. Sin embargo, a diferencia de los derivados de Cu, el glifosato no se considera antibacteriano. Por lo demás, las investigaciones se dirigen a un espectro muy amplio de sustancias orgánicas (véase página 1, columna derecha, líneas 6 y 7), que pueden tener efectos muy diferentes en la bacteria investigada E. coli. Además, no se puede sugerir

un efecto complejo considerando una sola bacteria.

En la publicación NTL TORSTENSEN ET AL 1977 (N. T. L. TORSTENSSON ET AL: "Detoxification of glyphosate in soil", WEED RESEARCH, tomo 17, N.º 3, 1 de junio de 1977 (01-06-1977), páginas 209-212, XP055100018, ISSN: 0043-1737, DOI: 10.1111/j. 1365-3180.1977.tb00468.x) la evaluación representada de los estudios en el resumen sugiere que la degradación del glifosato en el suelo se debe esencialmente a una degradación bacteriana y que la adsorción es responsable de la rápida inactivación inicial.

Especialmente, los ácidos húmicos producidos a partir de productos vegetales, a los que pertenecen también los ácidos húmicos de carbón marrón, presentan además de su estructura básica aromático-fenólica estructuras de flavona (fisetina, quercetina, flavonas, xantinas).

Como material de partida para obtener los aislamientos de CLK de acuerdo con la invención se utilizan preferentemente mezclas de álcali-huminato-ácido húmico, según estén disponibles, por ejemplo, de acuerdo con las indicaciones del documento DD 44 155 a partir de las sustancias naturales que contienen sustancias húmicas en cantidades suficientes. Además, las sustancias naturales que contienen sustancias húmicas deberían presentar un contenido lo más bajo posible, preferentemente cercano a cero, de constituyentes nocivos para humanos y animales. Tales constituyentes pueden ser, por ejemplo, tóxicos agudos o crónicos, así como genotóxicos, teratogénicos, mutagénicos o carcinogénicos. Los ácidos húmicos del tipo descrito anteriormente son ácidos húmicos naturales procesados fisicoquímicamente, que se obtienen a partir de un depósito de carbón marrón especialmente seleccionado, preferentemente carbón marrón de ubicaciones que presentan poco o ningún contenido de los constituyentes nocivos mencionados anteriormente. Además, también se pueden utilizar sedimentos de turba, pantanos y lagos.

Otra publicación A. Piccolo ET AL: "Adsorption of Glyphostae by Humic Substances +", Journal of Agricultural and Food Chemistry, tomo 44, n.º 8, 1 de enero de 1996 (01-01-1996), pp. 2442-2446, XP055323294, EE. UU., ISSN: 0021-8561, DOI: 10.1021 / jf950620x se refiere a ácidos húmicos aislados a partir de lignito que pueden unirse al glifosato. Sin embargo, no se describen los efectos que en este sentido se pueden lograr.

Una contribución adicional al estado de la técnica que subyace en la presente invención se proporciona por la publicación Monika Krüger ET AL: "Glyphosate suppresses the antagonistic effect of Enterococcus spp. on Clostridium botulinum", ANAEROBE, tomo 20, 6 de febrero de 2013 (06-02-2013), páginas 74-78, XP055323223, GB, ISSN: 1075-9964, DOI: 10.1016 / j.anaerobe.2013.01.005. En él se aclaran los efectos microbianos, que conducen a enfermedades en particular del tracto gastrointestinal después de la absorción de glifosato.

El objetivo de la presente invención es reducir o neutralizar el efecto del glifosato que se encuentre en el pienso y sus derivados en el cuerpo, en productos de desecho metabólicos y en el suelo, pero sobre todo en la microbiosis gastrointestinal así como en otros sistemas corporales, para obtener la actividad microbiológica en el cuerpo, en el suelo y en el tratamiento de productos de desecho metabólicos de todo tipo.

El objetivo se soluciona mediante la aplicación de un preparado de ácido húmico aislado de celu-ligno-carbono para el tratamiento de enfermedades en animales de sangre caliente, que fueron causadas por el agente fitoprotector glifosato, en donde el agente fitoprotector glifosato se une al preparado de ácido húmico y el efecto inhibidor del crecimiento del agente fitoprotector glifosato se reduce a gérmenes fisiológicos en el tracto gastrointestinal, en donde el agente fitoprotector glifosato está presente en productos alimenticios y piensos. El preparado de ácido húmico está previsto de esta manera para la absorción oral, de modo que conduce a una mejora o para el mantenimiento del estado de salud del tracto gastrointestinal.

Para demostrar el efecto neutralizante del glifosato de CLK-GA se usaron los gérmenes indicadores *Enterococcus faecalis* y *Bacillus badius.* El patógeno *Enterococcus faecalis* se aisló de la microalga Chlorella vulgaris en agar citrato-azida-tween-carbonato (CATC). Se inocularon colonias sospechosas (cocos gram positivos, catalasa negativos) en placas de agar sangre (oxoide) y se diferenciaron mediante pruebas bioquímicas. La diferenciación de especies se confirmó por medio de MALDI-TOF-MS. El aislamiento del patógeno *Bacillus badius* se efectuó *Chlorella vulgaris* en agar sangre (oxoide).

La diferenciación de especies se llevó a cabo basándose en parámetros bioquímicos. La confirmación se efectuó mediante MALDI-TOF-MS. Para la investigación se utilizó el preparado comercial de glifosato Roundup UltraMax® (450 g/l de glifosato como sal de isopropilamina en la formulación de SL). La concentración mínima de inhibidor de glifosato para los gérmenes indicadores (MHK) se determinó por medio de procedimientos de microdilución (MIO) de acuerdo con las directrices actuales del Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS). Se llevó a cabo en *E. faecalis* y *B. badius* en caldo RCM (SIFIN). La determinación del efecto neutralizante del producto de ácido húmico CLK-GA para el glifosato se efectuó por el glifosato MHK. Las determinaciones de MHK para glifosato y glifosato CLK-GA se efectuaron en caldo RCM como se describió anteriormente. CLK-GA se usó en concentraciones de 1,0; 0,5 y 0,25 mg/ml. La neutralización de glifosato se mezcló en las concentraciones de 300 µg/ml, 600 µg/ml, 1200 µg/ml y 2400 µg/ml con 1 mg/ml, 0,5 µg/ml y 0,25 µg/ml CLK-GA en caldo RCM y se llevó a cabo durante la noche a 37 C. Después de la centrifugación (3000 rpm) y filtración de las preparaciones individuales a través de un

filtro centrífugo (3 Kda, VWR, México), se añadieron *E. faecalis* y *B. badius* a estos 104/ml de KbE. Después del crecimiento durante la noche a 37°C, el contenido de cada tubo se esparció en agar CATC o agar sangre y se evaluó después de 48 horas.

Las investigaciones arrojaron los siguientes resultados. El MHK de *E. faecalis* es de 200 µg/ml, el valor de MHK es *B. badius* es de 150 µg/ml de glifosato. Los valores MHK de glifosato y las mezclas de glifosato CLK-GA para *E. faecalis* y *B. badius* se representan en la Tabla 1. Estos valores se incrementaron por el producto de ácido húmico CLK-GA en la concentración de 1 mg/ml a 2400 µg/ml para ambas especies bacterianas. Con 0,5 mg/ml y 0,25 mg/ml de CLK-GA, las concentraciones de glifosato de 600 µg/ml todavía eran neutralizables. La adición de una mezcla de glifosato-CLK-GA con una concentración final de 300 µg/ml de glifosato y 1 mg/ml de CLK-GA a una suspensión de enterococos o bacilos de 10^4 KbE/ml no condujo en ambas suspensiones de patógenos a una eliminación de los gérmenes. En los controles de glifosato, el crecimiento no se materializó y los controles de crecimiento CLK-GA sin glifosato contenían recuentos de gérmenes similares a los de las mezclas de glifosato-CLK-GA.

Los efectos y ventajas de la invención se muestran en la aplicación de preparados de ácido húmico en general, pero de manera especialmente clara cuando como preparado de ácido húmico se usa un aislado de celu-ligno-carbono (CLK-GA), obtenido de acuerdo con la descripción anterior (véase también DE 196 50 317 C2).

La Tabla 1 muestra los valores de MHK de glifosato y la mezcla de glifosato CLK-GA para *Enterococcusfeacalis* y *Bacillus badius.*

gérmenes indicadores	valores de MHK	
	glifosato	mezcla de glifosato CLK-GA
E.fecalis	200 µg/ml	2400 µg/ml
Bacillus badius	150 µg/ml	2400 µg/ml

Los valores de MHK para *E. faecalis* aumentan en mezclas de glifosato-CLK-GA de 200 µg/ml hasta 2400 µg/ml (12 veces) y para B. *badius* de 150 µg/ml hasta 2400 µg/ml (16 veces). La unión del glifosato al producto de ácido húmico CLK-GA depende de la concentración.

Los efectos son especialmente claros cuando el agente fitoprotector es un herbicida total del grupo de los fosfanatos y sus derivados, en particular glifosato. Esto se demostró con las investigaciones descritas anteriormente. El glifosato se usa de manera especialmente amplia.

Es especialmente ventajoso que se use como preparado de ácido húmico un aislado de celu-ligno-carbono, cuya preparación ya se ha establecido y está por tanto disponible a bajo coste.

Se ha demostrado que es especialmente eficaz que el preparado de ácido húmico esté previsto de esta manera para la ingestión oral, de modo que conduzca a la mejora o al mantenimiento del estado de salud del tracto gastrointestinal (mucosa). Este efecto ocurre, por ejemplo, en rumiantes, cerdos, aves de corral y otros animales de sangre caliente. Después de varias semanas de agregar el preparado de ácido húmico al pienso, un estado general en conjunto malo de los animales adultos y jóvenes del ganado así como una mala calidad de la leche se mejoran en la medida en que pueden registrarse un estado de salud normal y una calidad normal de la leche. En particular, mediante el tratamiento también se mejora la calidad de alimentos que se derivan de mamíferos contaminados, en este caso por ejemplo la leche.

Lo correspondiente se aplica al uso en enfermedades humanas, que se deben al consumo de alimentos contaminados. Sin embargo, una aplicación también está prevista para la profilaxis, la metafilaxis, la terapia y la regeneración en medicina humana y veterinaria. En este sentido se asegura el mantenimiento de la actividad microbiana en el cuerpo, que se ve afectada por los efectos del agente fitoprotector glifosato.

Ha demostrado ser especialmente ventajoso que el preparado de ácido húmico ya se use en la producción de alimentos o piensos para mejorar los productos crudos y el agente fitoprotector se una al preparado de ácido húmico. Con ello pueden suministrarse lotes contaminados con agentes fitoprotectores, no obstante, al uso como pienso o alimento sin tener que temer consecuencias adversas. Se incrementa la calidad de los alimentos, piensos o productos crudos. Es especialmente favorable un uso ya en este punto de la cadena alimentaria, porque se evitan daños consecuentes en la cadena alimentaria.

Un uso ventajoso adicional consiste en que el preparado de ácido húmico se suministra a los productos de desecho metabólico o sus productos secundarios o etapas de procesamiento y el agente fitoprotector se une al preparado de ácido húmico. Dado que los productos de excreción del metabolismo de los animales de granja se aplican por regla general como fertilizantes de nuevo al suelo, este se contamina adicionalmente con los agentes fitoprotectores que llegan a través de la alimentación al ciclo. Esta contaminación con agentes fitoprotectores perjudican la vida del suelo, porque se alteran los microorganismos responsables de los procesos en el suelo, por ejemplo la formación de humus como un factor importante de la fertilidad del suelo. Sin embargo, cuando el agente fitoprotector indeseado se

"neutraliza" en su acción al unirse por el ácido húmico en los productos de excreción, este efecto adverso se elimina con la consecuencia de un desarrollo natural y saludable de la vida del suelo.

El efecto de los productos de excreción, por ejemplo estiércol crudo, en la vida del suelo después de la aplicación se corresponde con el de los productos secundarios, tal como estiércoles tratados en una instalación de biogás (estiércoles de biogás), en relación con el contenido de agentes fitoprotectores que han llegado al ciclo. Por tanto, en el interés de un producto fertilizante de alta calidad, también la suspensión de biogás debe someterse a un tratamiento por el preparado de ácido húmico.

De manera ventajosa se efectúa, sin embargo, el tratamiento antes de que los productos de excreción lleguen a la instalación de biogás. Porque incluso allí, la población sensible de microorganismos puede verse afectada por la influencia del agente fitoprotector y de este modo la función, pero al menos la productividad y la estabilidad del proceso de biogás se perjudican. Esto se evita mediante un tratamiento de acuerdo con la invención de los productos de excreción de antemano con el preparado de ácido húmico. Como alternativa, el preparado de ácido húmico se aplica directamente a suelos contaminados y el agente fitoprotector se une al preparado de ácido húmico. El efecto en la vida del suelo se corresponde con el anterior, pudiendo esperarse una mejora incluso en la vida del suelo ya dañada. Otros detalles, características y ventajas de la invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción de ejemplos de realización con referencia a los dibujos correspondientes. Muestran:

la Figura 1: neutralización dependiente de la concentración de glifosato por el producto de ácido húmico CLK-GA en el sistema indicador *E. faecalis;*
la Figura 2: neutralización dependiente de la concentración de glifosato por el producto de ácido húmico CLK-GA en el sistema indicador *B. badius* y
la Figura 3: resultado del cultivo de suspensiones enterocócicas (104/ml) después de cultivar con filtrados de una mezcla de 600 µg/ml de glifosato -1 mg/ml de CLK-GA en la concentración final de 300 µg de glifosato/ml.

La Figura 1 muestra la neutralización dependiente de la concentración de glifosato por el producto de ácido húmico CLK-GA (en las figuras de manera correspondiente al material de la serie de ensayos documentada denominado "RB4") en el sistema de indicadores *E. faecalis* y la Figura 2 muestra la neutralización dependiente de la concentración de glifosato por el producto de ácido húmico CLK-GA en el sistema indicador *B. badius.* La indicación CLK-GA0,12 mg/ml en el grupo "Concentración de glifosatos 0" de la Figura 1 se refiere a la penúltima barra, la indicación CLK-GA 0 mg/ml en la última barra. En la Figura 2, la indicación CLK-GA 0,12 mg/ml se refiere a la penúltima barra, la indicación CLK-GA 0 mg/ml a la última barra del grupo "Concentración de glifosatos 0".

El valor para la concentración mínima de inhibidor (MHK) de *E. faecalis* es de 200 µg/ml, el valor de MHK para *B. badius* es de 150 µg/ml de glifosato. Estos valores se incrementaron por el producto de ácido húmico CLK-GA en la concentración de 1 mg/ml a 2400 µg/ml para ambas especies bacterianas. Con 0,5 mg/ml y 0,25 mg/ml de CLK-GA, las concentraciones de glifosato de 600 µg/ml todavía eran neutralizables.

La Figura 3 muestra el resultado del cultivo de suspensiones enterocócicas (104/ml) después de cultivar con filtrados de una mezcla de 600 µg/ml de glifosato-1 mg/ml de CLK-GA en la concentración final de 300 µg de glifosato/ml. La adición de una mezcla de glifosato-CLK-GA con una concentración final de 300 µg/ml de glifosato y 1 mg/ml de CLK-GA WH67® a una suspensión de enterococos o bacilos de 104 KbE/ml no condujo en ambas suspensiones de patógenos a una eliminación de los gérmenes.

En los controles de glifosato, el crecimiento no se materializó y los controles de crecimiento CLK-GA sin glifosato contenían recuentos de gérmenes similares a los de las mezclas de glifosato-CLK-GA.

Los ensayos de laboratorio muestran que el efecto neutralizante de CLK-GA para la acción antimicrobiana del glifosato en E. *faecalis* en mezclas de glifosato-CLK-GA WH67® (1 mg/ml de CLK-GA) y distintas concentraciones de glifosato son detectables.

En una aplicación *in vivo* con el uso de CLK-GA en una granja de ganado lechero gravemente dañada en la salud debido a pienso contaminado con glifosato se mostró el siguiente estado inicial:

- mal estado general de los animales adultos y jóvenes,
- mal estado a pesar del cuidado regular de las pezuñas,
- mala fertilidad,
- calidad de la leche muy limitada (número de salmonela >70),
- estado exterior de los animales sucio, peludo,
- animales jóvenes propensos a diarreas,
- falta de apetito y diarreas,
- muertes y
- deficiencias neurológicas neuronales.

El tratamiento se efectuó mezclando CLK-GA en el pienso durante 4-6 semanas.

A continuación se mostraron los siguientes resultados clínicos:

- los animales comían normalmente otra vez,
- la condición externa se mejoró (piel lisa y brillante),
- la salud de las pezuñas se mejoró y se aumentaron los intervalos de atención,
- animales jóvenes y viejos ya no tenían diarrea,
- no hay muertes,
- comportamiento social normalizado,
- no se observan deficiencias neurológicas neuronales y
- número de salmonela <5.

En pruebas de laboratorio también se mostraron valores hepáticos normalizados.

Lista de referencias

1 Crecimiento en mezcla de glifosato CLK-GA
2 Crecimiento en control de CLK-GA
3 Crecimiento en control de glifosato

REIVINDICACIONES

1. Preparado de ácido húmico aislado de celu-ligno-carbono para la aplicación en el tratamiento de enfermedades causadas por un agente fitoprotector glifosato en animales de sangre caliente, caracterizado por que el agente fitoprotector glifosato se une al preparado de ácido húmico y se reduce el efecto inhibidor del crecimiento del agente fitoprotector glifosato en gérmenes fisiológicos en el tracto gastrointestinal, en donde el agente fitoprotector glifosato está presente en productos alimenticios y piensos y el preparado de ácido húmico está previsto de esta manera para la ingestión oral, de modo que conduce a la mejora o al mantenimiento del estado de salud del tracto gastrointestinal.

2. Preparado de ácido húmico para la aplicación según la reivindicación 1, en donde el agente fitoprotector glifosato está presente en productos alimentarios y piensos y el preparado de ácido húmico se usa ya en la producción de productos alimenticios o piensos para mejorar la calidad de los productos crudos y el agente fitoprotector obtenido glifosato se une al preparado de ácido húmico.

3. Preparado de ácido húmico para la aplicación según la reivindicación 1, en donde el preparado de ácido húmico se suministra a los productos de desecho metabólicos o sus productos derivados y el agente fitoprotector glifosato se une al preparado de ácido húmico.

4. Preparado de ácido húmico para la aplicación según la reivindicación 1, en donde el preparado de ácido húmico se aplica a un suelo contaminado y el agente fitoprotector glifosato se une al preparado de ácido húmico.

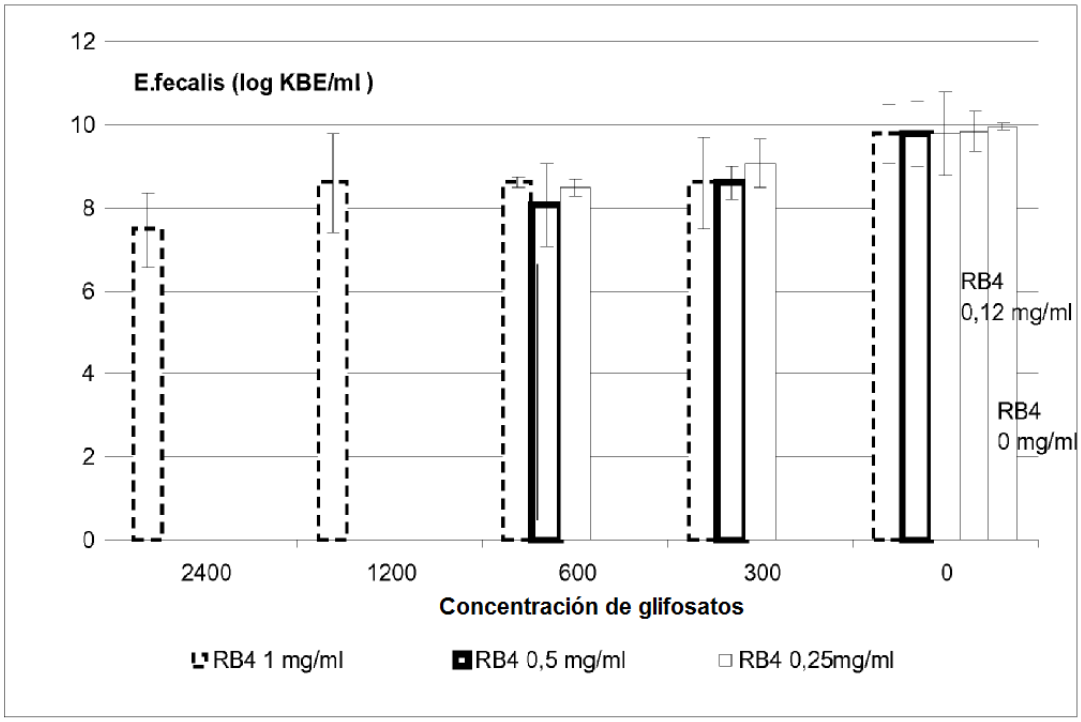
E.fecalis (log KBE/ml)
12
10
8
6
4
2
0
2400
1200
600
300
0
Concentración de glifosatos
RB4 0,12 mg/ml
RB4 0 mg/ml
RB4 1 mg/ml
RB4 0,5 mg/ml
RB4 0,25mg/ml

Fig. 1

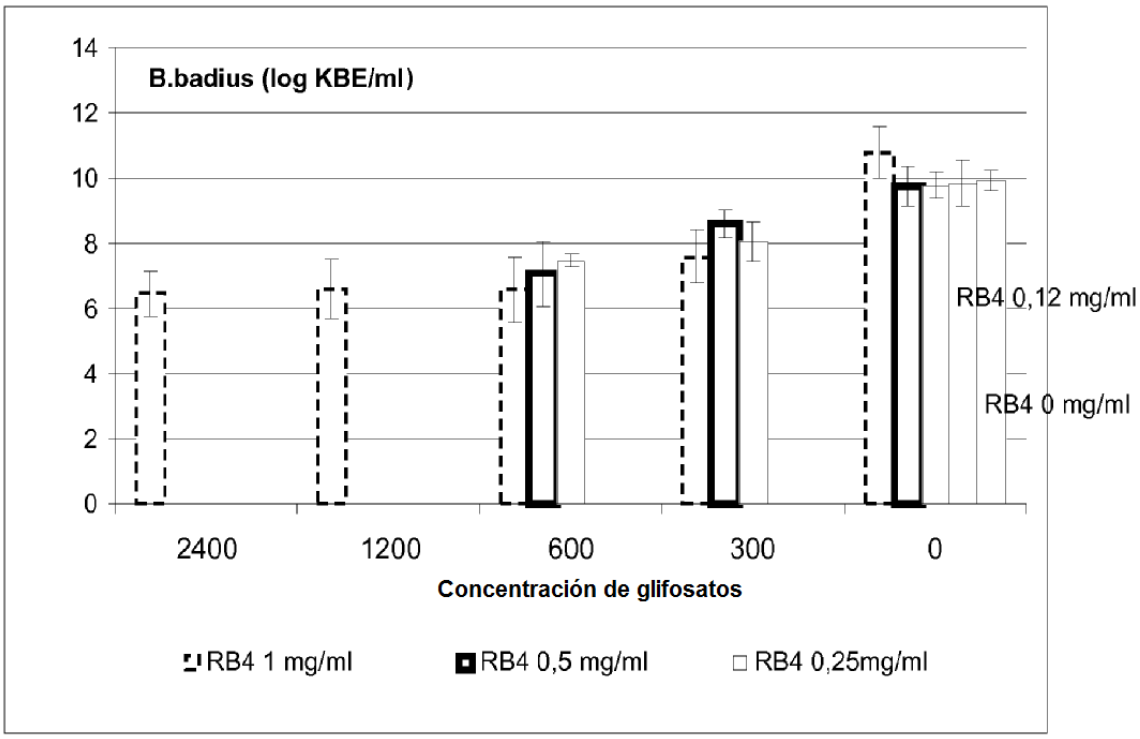
B.badius (log KBE/ml)
14
12
10
8
6
4
2
0
2400
1200
600
300
0
Concentración de glifosatos
RB4 0,12 mg/ml
RB4 0 mg/ml
RB4 1 mg/ml
RB4 0,5 mg/ml
RB4 0,25mg/ml

Fig. 2

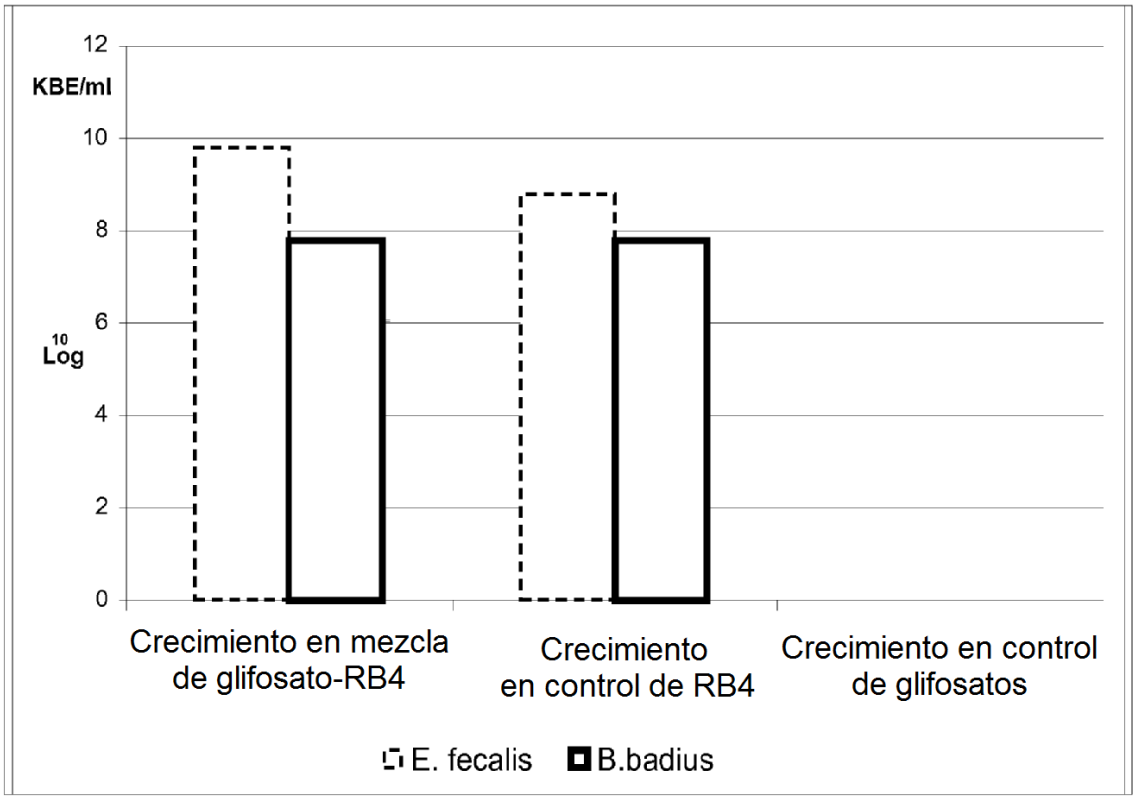
12
KBE/ml
10
8
6
Log10
4
2
0
Crecimiento en mezcla de glifosato-RB4
Crecimiento en control de RB4
Crecimiento en control de glifosatos
E. fecalis
B.badius

Fig. 3