



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 185 752**

⑤① Int. Cl.⁷: C05F 11/08
A01N 63/00

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **96400037.6**
⑧⑥ Fecha de presentación: **08.01.1996**
⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0 720 974**
⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **10.07.1996**

⑤④ Título: **Complejos bacterianos y sus aplicaciones en el tratamiento de los residuos de origen biológico.**

③⑩ Prioridad: **09.01.1995 FR 95.00162**

⑦③ Titular/es: **COBIOTEX**
Place du Granier
35135 Rennes-Chantepie, FR

④⑤ Fecha de la publicación de la mención BOPI:
01.05.2003

⑦② Inventor/es: **Penaud, Jean**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de patente:
01.05.2003

⑦④ Agente: **Gil Vega, Víctor**

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).

DESCRIPCION

Complejos bacterianos y sus aplicaciones en el tratamiento de los residuos de origen biológico.

La presente invención se refiere a complejos bacterianos, aptos para ser utilizados en la digestión, la descomposición y la transformación de los residuos de origen biológico en forma de biomasa y de compuestos orgánicos estables y no contaminantes y a sus aplicaciones en el tratamiento de los desechos de origen biológico, tales como excrementos (camas de paja de cerdos, rumiantes, equinos o de aves o líquidos de estiércol, heces de humanos) o jugo de estiércol, cadáveres aguas estancadas y su transformación en abono compuesto u otros compuestos nitrogenados estables, biodegradables y no contaminantes.

Los organismos heterótrofos utilizan los compuestos nitrogenados, de los cuales las proteínas vegetales o animales, como fuentes nutritivas, restituyen el nitrógeno a la tierra por sus excretados o por los productos de descomposición post-mortem, principalmente en forma de amoníaco o de urea que se transforman en nitritos y en nitratos por bacterias nitrificantes presentes en el suelo, tales como *Nitrosomonas* o *Nitrobacter*.

Ahora bien, una producción importante de compuestos nitrogenados en forma gaseosa o líquido-sólida, tales como amoníaco, amoníaco nitritos y nitratos, constituye una causa importante de contaminación atmosférica, de los suelos, ríos y de las capas freáticas. Todos estos procesos de destrucción producen la formación de compuestos con olores particularmente nauseabundos (NH_3 , H_2S particularmente...).

Se conoce por la Patente JP-B-59 013175 que se refiere a la fermentación anaerobia de un forraje y describe la preparación de forraje por fermentación de paja seca con un *Bacillus* (*Bacillus subtilis*) y *Lactobacillus* (*Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*).

Se conoce igualmente la Solicitud de Patente JP-A-05078663 que trata de obtener una composición que abone los suelos y sea repulsiva con respecto a los topes, y describe la obtención de una composición que abona los suelos por inoculación de un preparado a base de soja con la ayuda, por una parte, de un cultivo de *Clostridium butyricum*, de *Bacillus cereus*, de *Lactobacillus casei subsp. casei* y de *Lactobacillus fermentum*, y por otra parte, de un cultivo de *Bacillus cereus*, de *Lactobacillus casei subsp. phamnosus*, de *Lactobacillus acidophiles* y de *Acetobacter aceti*.

Se conocen, además, procedimientos de tratamiento de líquidos de estiércol, de las camas de paja o de aguas residuales, que utilizan un cultivo bacteriano y enzimas, o un cultivo bacteriano, enzimas y levaduras, particularmente para disminuir las liberaciones de amoníaco y los olores, particularmente en el momento de las manipulaciones y del esparcido (aguas de estiércol). Tales composiciones contienen en particular como bacteria: *Bacillus subtilis*, como enzimas: batinasa y amilasa y como levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* (Solicitud de Patente francesa 2.658.077). Sin embargo, las composiciones conocidas para tratar los excrementos no permiten la transformación del nitrógeno mineral (NH_4 , NO_2 y NO_3) y de los uratos, en aminoácidos y proteínas (nitrógeno orgánico), sino que solo hacen disminuir las liberaciones de amoníaco, por adsorción o solubilización. Tales transformaciones no producen una reorganización del nitrógeno, para su utilización a nivel del metabolismo nitrogenado de los microorganismos.

Consecuentemente, un tratamiento eficaz de los productos de origen biológico es necesario y crucial para permitir la transformación del nitrógeno mineral (NH_4 , NO_2 y NO_3) y de los uratos en nitrógeno orgánico (aminoácidos y proteínas), para evitar la contaminación y poner de nuevo los desechos en el circuito del anabolismo.

Para resolver este problema, la Firma solicitante ha seleccionado complejos bacterianos, que permiten esencialmente la transformación del nitrógeno mineral en nitrógeno orgánico, en forma de proteínas bacterianas (estabilización del nitrógeno y aumento de la biomasa), es decir que permiten la transformación de los excrementos, en compuestos nitrogenados (abono compuesto y/o compuestos nitrogenados estables) y, particularmente para los desechos que tienen una relación C/N suficiente (en relación con el porcentaje de materia seca), en compuestos ricos en ácidos fúlvicos y húmicos, y no contaminantes, por digestión y transformación de los excrementos, eliminando los gérmenes patógenos asociados, particularmente *Clostridium*, *Bacteroides*, *colibacilles*, *Listeria*, salmonelas y estafilococos. La presente invención tiene por objeto un complejo bacteriano, caracterizado porque comprende al menos un *Bacillus* no patógeno seleccionado entre el grupo constituido por *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* y *B. circulans* y al menos un *Lactobacillus* no patógeno seleccionado entre el grupo constituido por *L. rhamosus*, *L. paracasei*, *L. fermentum* y *L. acidophilus*, porque se utiliza como fuente de nitrógeno, esencialmente nitrógeno mineral, particularmente el amoníaco, los nitratos, los nitritos y moléculas de nitrógeno orgánico tales como la urea, los uratos, los aminoácidos, las bases nitrogenadas o cualquier otro

ES 2 185 752 T3

compuesto nitrogenado de bajo peso molecular y porque es apto para transformar el indicado nitrógeno en nitrógeno orgánico, en forma de proteínas bacterias.

5 Conforme a la invención, el indicado complejo bacteriano presenta al menos las actividades enzimáticas siguientes: actividad celulolítica, actividad proteolítica, actividad amilolítica, actividad lipolítica, actividad pectinolítica.

De forma inesperada, la combinación *Bacillus/Lactobacillus*, presente en el complejo bacteriano según la invención actúa en sinergia por:

- 10 • utilizar a la vez nitrógeno mineral y nitrógeno orgánico,
- resintetizar proteínas bacterianas y
- 15 • eliminar los microorganismos patógenos asociados con los productos a tratar, tales como *Clostridium*, *Bacteroides*, colibacilos, *Listeria*, salmonelas y estafilococos.

Un complejo bacteriano de este tipo permite por consiguiente efectivamente poner de nuevo los desechos en el circuito del anabolismo (organización en cadena trófica).

20 Conforme a la invención, las proporciones *Lactobacillus:Bacillus*, en el indicado complejo, se encuentran comprendidas, según los casos, bien sea entre 100:1 y 1:100, de preferencia entre 10:1 y 1:10, o de 1:1.

25 Conforme a la invención, las concentraciones en bacterias se encuentran comprendidas entre 10^2 y 10^8 ufc/g. El indicado complejo bacteriano comprende ventajosamente al menos un *Bacillus*, a una concentración comprendida entre 10^2 y 10^7 ufc/g y al menos un *Lactobacillus*, a una concentración comprendida entre 10^3 y 10^8 ufc/g. Un complejo bacteriano de este tipo encuentra, de preferencia aplicación en el tratamiento de las camas de paja de rumiantes, de equinos o de cerdos.

30 Según una disposición ventajosa de dicho modo de realización, el indicado complejo bacteriano comprende al menos *B. subtilis* a una concentración comprendida entre 10^2 y 10^7 ufc/g y un *Lactobacillus* seleccionado entre el grupo constituido por *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, y *L. acidophilus*, a una concentración comprendida entre 10^3 y 10^8 ufc/g.

35 Según otra disposición ventajosa de dicho complejo, comprende los 5 *Bacillus* siguientes: *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* y *B. circulans*, cada uno a una concentración comprendida entre 10^2 y 10^7 ufc/g y los 4 *Lactobacillus* siguientes: *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, cada uno a una concentración comprendida entre 10^3 y 10^8 ufc/g.

40 De forma ventajosa, cuando el indicado complejo bacteriano comprende varios *Bacillus* y/o varios *Lactobacillus*, las diferentes cepas de una misma clase (*Bacillus* o *Lactobacillus*) se encuentran en una relación comprendida entre 1:1 y 1:100.

45 En otro modo de realización de dicho complejo bacteriano, comprende, de preferencia, al menos un *Bacillus* que utiliza como fuente de nitrógeno, los uratos, particularmente *B. subtilis* a una concentración mínima de 10^3 ufc/g, eventualmente otro *Bacillus*, seleccionado entre el grupo constituido por *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* y *B. circulans* y al menos un *Lactobacillus* seleccionado entre el grupo constituido por *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, a una concentración comprendida entre 10^2 y 10^8 ufc/g. Un complejo bacteriano de este tipo está particularmente bien adaptado para el tratamiento de las camas de paja de aves o de otros monogástricos (a excepción del cerdo).

50 En otro modo de realización de dicho complejo bacteriano, comprende, de preferencia, al menos un *Lactobacillus* seleccionado entre el grupo constituido por *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. acidophilus* y al menos un *Bacillus* seleccionado entre el grupo constituido por *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* y *B. circulans*, estando la relación de *Lactobacillus:Bacillus* comprendida entre 1:1 y 1:10. Un complejo bacteriano de este tipo está particularmente bien adaptado para el tratamiento de los líquidos de estiércol, de las lagunas o de las fosas sépticas.

60 En otro modo de realización del indicado complejo bacteriano, comprende, de preferencia, los 2 *Bacillus* siguientes: *B. subtilis* y *B. megaterium*, cada uno a una concentración comprendida entre 10^2 y 10^7 ufc/g y al menos un *Lactobacillus* seleccionado entre el grupo constituido por *L. rhamnosus*, *L. paracasei*,

ES 2 185 752 T3

L. fermentum, *L. acidophilus*, a una concentración comprendida entre 10^3 y 10^8 ufc/g. Un complejo bacteriano de este tipo está particularmente bien adaptado para el tratamiento de los cadáveres de animales.

De forma sorprendente, la asociación de al menos un *Bacillus* y de al menos un *Lactobacillus*, tales como se han definido anteriormente, permite efectivamente obtener un complejo bacteriano que:

- transforma residuos fecales, urinarios u otros desechos de origen biológico, en proteínas bacterianas, por vía de síntesis bacteriana, es decir utilizando para ello el nitrógeno mineral procedente de los diferentes desechos, bien sea directamente, o por degradación;

- desodoriza el estiércol;

- puede desnitrificar medios diversos y/o agua;

- acelera de forma significativa el abonado con abonos compuestos, sin destrucción de la materia y a bajas temperaturas (inferiores a los 45°C).

Una selección de cepas de este tipo no produce, además, pérdida de nitrógeno con el transcurso del tiempo (estabilización del porcentaje de nitrógeno).

Además, el complejo bacteriano conforme a la invención es estable con el transcurso del tiempo.

En variante, el indicado complejo bacteriano comprende al menos un *Bacillus* no patógeno, al menos un *Lactobacillus* no patógeno y un *Pediococcus* no patógeno.

Cuando un complejo bacteriano conforme a la invención comprende un *Pediococcus*, este último se encuentra a las mismas concentraciones que los *Lactobacillus*.

De forma sorprendente, un complejo bacteriano de este tipo presenta, además de las propiedades expuestas anteriormente, una actividad inhibidora respecto al *Staphylococcus aureus*.

La presente invención tiene igualmente por objeto un complejo bacteriano que comprende cepas de *Bacillus* de Gram+, que presentan las características siguientes:

- porque son susceptibles de utilizar como fuente de nitrógeno, nitrógeno mineral, particularmente amoníaco, los nitratos, los nitritos y moléculas de nitrógeno orgánico tales como urea, urato, los aminoácidos, las bases nitrogenadas u otros compuestos nitrogenados de bajo peso molecular,

- porque presentan al menos una de las actividades siguientes: actividad amilolítica, actividad celolítica, actividad lignocelulolítica, actividad pectinolítica, actividad lipolítica, actividad proteolítica, actividad queratolítica, actividad de tipo bacteriocina o similar a la bacteriocina,

- porque presentan al menos las características bioquímicas siguientes: gelatinasa +, catalasa +, ureasa-, oxidasa-, indol-, y

- porque son de preferencia aerobias/anaerobias facultativas.

Tales cepas de *Bacillus* son, de preferencia, seleccionadas entre el grupo constituido por *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus circulans*.

Las indicadas cepas de *Bacillus* se depositaron en el Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), con fecha 8 de Junio 1994, por lo que respecta al *Bacillus subtilis*, bajo los números I-1433, I-1438 e I-1440, por lo que respecta al *Bacillus amyloliquefaciens*, bajo los números I-1434 y I-1435, por lo que respecta al *Bacillus megaterium*, bajo el número I-1436, por lo que respecta al *Bacillus licheniformis* bajo el número I-1437 y por lo que respecta al *Bacillus circulans*, bajo el número I-1439. La presente invención tiene igualmente por objeto un complejo bacteriano que comprende cepas de *Lactobacillus* de Gram+, que presentan las características siguientes:

- porque son susceptibles de utilizar como fuente de nitrógeno, nitrógeno mineral, particularmente el amoníaco, los nitratos, los nitritos y moléculas de nitrógeno orgánico tales como la urea, el urato, los aminoácidos, las bases nitrogenadas u otros compuestos nitrogenados de bajo peso molecular,

- porque presentan al menos una actividad de tipo bacteriocina o parecida a la bacteriocina,

- porque presentan ventajosamente al menos las características bioquímicas siguientes: catalasa-, oxidasa- y

ES 2 185 752 T3

- porque son de preferencia aerobias/anaerobias facultativas.

Tales cepas de *Lactobacillus* son, de preferencia, seleccionadas entre el grupo constituido por *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus fermentum*.

5 Las indicadas cepas de *Lactobacillus* se depositaron en el Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), con fecha 28 de Julio 1994, por lo que respecta al *Lactobacillus rhamnosus* bajo los números I-1450, I-1452, I-1453, I-1454, I-1455, I-1456, I-1459, por lo que respecta al *Lactobacillus paracasei*, bajo los números I-1451, I-1457 e I-1458, por lo que respecta al *Lactobacillus acidophilus*, bajo el número I-1460, y por lo que respecta al *Lactobacillus fermentum*, bajo el número I-1461.

La presente invención tiene igualmente por objeto un complejo bacteriano que comprende cepas de *Pediococcus* de Gram positivo, que presentan las características siguientes:

- 15 - porque presentan una actividad de tipo bacteriocina o parecida a la bacteriocina al menos con respecto al *Staphylococcus aureus*,
- porque presentan ventajosamente al menos las características bioquímicas siguientes: catalasa-, oxidada- y
- 20 - porque son de preferencia aerobias/anaerobias facultativas.

Se puede particularmente citar como cepa de *Pediococcus* que responde a esta definición, la cepa *Pediococcus pentosaceus*, depositada en el Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNMC), con fecha 22 de Diciembre 1995, bajo el número I-1654.

25 De forma inesperada, complejos bacterianos que comprenden en combinación al menos un *Bacillus* y al menos un *Lactobacillus* y eventualmente un *Pediococcus*, que presentan las características especificadas anteriormente, actúan en sinergia para hacer los productos tratados en su presencia, bajo una forma útil y reducen así los inconvenientes, molestias, incluso contaminación de los indicados productos, a niveles sanitariamente aceptables para los suelos, los cultivos y el conjunto de la cadena alimentaria y participan por consiguiente favorablemente en el tratamiento de los desechos.

De forma ventajosa, el complejo bacteriano según la invención se obtiene a partir de las indicadas cepas, como sigue:

- 35 - cultivo y producción de cada cepa por separado,
- obtención de diferentes cultivos teniendo cada uno concentraciones en microorganismos del orden de 10^{10} - 10^{11} ufc/g,
- 40 - liofilización de cada cultivo,
- dilución, entre 10^{-2} / 10^{-6} , de cada una de las indicadas cepas liofilizadas, en presencia de un diluyente neutro (vegetal o mineral tal como la arcilla, litotamnio-“grit de maíz”...), y
- 45 - mezcla de las diferentes cepas así diluidas para obtener el complejo bacteriano buscado.

Puede, además, comprender aditivos tales como un trazador químico o microbiológico.

50 La presente invención tiene igualmente por objeto una composición de tratamiento de residuos biológicos (producto diluido listo para el empleo), caracterizado porque comprende en asociación un complejo bacteriano conforme a la invención, al menos un diluyente neutro y al menos un fijador de micropartículas.

55 En efecto, los complejos bacterianos, tales como se han definido anteriormente, constituyen un concentrado bacteriano que puede ser, de preferencia, fijado sobre un soporte para ser utilizado para el tratamiento de los estiércoles, líquidos de estiércol, abonos compuestos, cadáveres...

60 Tales composiciones comprenden por consiguiente ventajosamente un diluyente neutro, idéntico o diferente del utilizado para preparar el complejo bacteriano, y un fijador de micropartículas, tal como la melaza, que juega a la vez el papel de elemento energético y aporta un efecto de adhesión de las partículas, de los derivados del almidón o de otros azúcares (azúcares complejos de degradación lenta), un aceite o una grasa de recubrimiento.

ES 2 185 752 T3

De forma preferida, la indicada composición comprende esencialmente de un 5-15 % de complejo bacteriano, de un 80-89 % de diluyente neutro y de un 3-5 % de fijador de micropartículas, de preferencia un 10 % de complejo bacteriano, un 87 % de diluyente neutro y un 3 % de fijador de partículas. La indicada composición de tratamiento presenta las mismas aplicaciones que el complejo bacteriano conforme a la invención a unas concentraciones inferiores pero eficaces.

La misma puede particularmente ser utilizada, por incorporación directa en camas de paja, líquidos de estiércol o cualquier otro producto orgánico a tratar [estiércoles, desechos vegetales, desechos orgánicos (cadáveres y desechos de los mataderos)], en unas proporciones de 0,2 a 50 kg por tonelada de producto orgánico. Conforme a la invención, las proporciones de la indicada incorporación varían según la aplicación, en particular:

- en lo que respecta a las camas de paja: un complejo bacteriano o una composición de tratamiento conforme a la invención, se incorpora a la cama de paja, a razón de 10 kg/t de paja; un mantenimiento hebdomadario se preconiza a razón de 3 kg/t de paja;
- por lo que respecta a los líquidos de estiércol: un complejo bacteriano o una composición de tratamiento conforme a la invención, se incorpora a los líquidos de estiércol, a razón de 100 g a 1 kg/t; un mantenimiento hebdomadario se preconiza a razón de 100 g a 3 kg/t;
- por lo que respecta a los estiércoles para hacer abonos compuestos: un complejo bacteriano o una composición de tratamiento conforme a la invención, se incorpora al estiércol para preparar abonos compuestos, a razón de 1 a 5 kg/t, en 1 vez;
- por lo que respecta a los cadáveres para hacer abonos compuestos: un complejo bacteriano o una composición de tratamiento conforme a la invención, se incorpora a los cadáveres para preparar abonos compuestos, a razón de 1 a 10 kg/t, en 1 vez;
- por lo que respecta a las lagunas: un complejo bacteriano o una composición de tratamiento conforme a la invención, se incorpora a las lagunas, a razón de 500 g/m², 1 vez cada 3 meses,
- en lo que respecta a las fosas sépticas: un complejo bacteriano o una composición de tratamiento conforme a la invención, se incorpora a las fosas sépticas, a razón de 100 g a 1 kg/t; un mantenimiento hebdomadario se preconiza a razón de 100 g a 3 kg/t,
- en lo que respecta a la desinfección de los locales y particularmente a la desinfección de los lugares de excusado: un complejo bacteriano o una composición de tratamiento, conforme a la invención se aplica en forma de una capa (biopelícula artificial) sobre las paredes y los suelos de los indicados locales, a razón de 10 g/l de agua; la solución obtenida se pulveriza preferentemente sobre las indicadas paredes.

La presente invención tiene igualmente por objeto un procedimiento de tratamiento de residuos biológicos, tales como los excrementos, el estiércol, los cadáveres u otros, caracterizado porque comprende la puesta en contacto de un complejo bacteriano conforme a la invención o de una composición tal como la definida anteriormente, con un residuo biológico a tratar.

Además de las disposiciones que anteceden, la invención comprende ejemplos de realización del procedimiento objeto de la presente invención, dados únicamente a título de ilustración del objeto de la invención.

Ejemplo 1

Características de los Bacillus conformes a la invención

las indicadas cepas presentan las características morfológicas y bioquímicas ilustradas en las Tablas siguientes:

ES 2 185 752 T3

Características	<i>B. subtilis</i>			<i>B. amyloliquefaciens</i>	
	ISB02	ISB09	ISB12	ISB04	ISB05
5 Bacilos:	finos, largos extremos redon- deados	pequeños robustos	largos, finos, a menudo agrupados en empali- zadas	tamaño medio, extremos redondos	finos y largos
10 Gram+ con espora subterminal					
15 Medio de cultivo preconizado	BNG			BNG	
Movilidad	+			+	
Temp. de incubación	30°C			30°C	
20 Crecimiento: a 55°C	+	-	-	+	
a 10°C				-	
Crecimiento del 2% NaCl	+++		+++	+++	
5% NaCl	+++		+++	+++	
7% NaCl	++		+++	++	+++
25 10% NaCl	-		+	-	+
30 Citrate		+		-	
Gelatinasa		+		+	
Nitrato		+		+	-
N ₂	+	-	-	-	
Fermentación de glucosa		-		-	
Catalasa		+		+	
35 Oxidasa		-		-	
Ureasa		-		-	
ONPG		+		+	
Indol		-		-	
40 Caseína	+		+	+	
45 Acetoína		+		+	
ADH	+	-	+	-	
50					
55					
60					

ES 2 185 752 T3

Características	<i>B. megaterium</i> ISB 06	<i>B. licheniformis</i> ISB 07	<i>B. circulans</i> ISB 11
5 Bacilos:	Medios, de extremos redondos	Medios	Medios, extremos redondos, bastante robustos
Gram+ de espora subterminal	+	+	+
10 Medio de cultivo preconizado	BNG	BNG	BNG
Movilidad	+	+	+
Temp. de incubación	30°C	30°C	30°C
15 Crecimiento: a 55°C	+	-	-
a 10°C	-	-	+
Crecimiento al 2 % NaCl	+++	+++	++
5 % NaCl	+++	+++	+
7 % NaCl	+++	++	-
20 10 % NaCl	+	-	-
Citrato	+	-	-
Gelatinasa	+	+	+
Nitrato	+	+	-
25 N ₂	-	-	-
Fermentación de glucosa	-	+	-
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	-	-	-
30 Ureasa	-	-	-
ONPG	+	+	-
Indol	-	-	-
Caseína	+	+	-
35 Acetoína	-	+	-
ADH	-	+	-

40 Los resultados de las galerías API 50 CH que proporcionan el perfil de fermentación de los azúcares (caracteres positivos después de 48 h máximo de incubación) (inoculación según API) (punto 2 en la escala de MacFarland) se ilustran en las figuras 1 a 8.

Ejemplo 2

45 *Características de los Lactobacillus conformes a la invención*

Las indicadas cepas presentan las características morfológicas y bioquímicas ilustradas en las Tablas siguientes:

50

55

60

ES 2 185 752 T3

<i>Lactobacillus rhamnosus</i>				
Características	ISL01	ISL05	ISL10	
Bastoncillos	bastante largos, no esporulados, a veces en cadenas	no esporulados, tamaño medio, a veces en cadenas	no esporulados, tamaño medio largo, algunos en cadenas	
Gram+	+	+	+	
Medio de cultivo preconizado	MRS o Rogosa	MRS o Rogosa	MRS o Rogosa	
Movilidad	-	-	-	
Temp. de incubación	30°C	37°C	37°C	
Crecimiento: a 15°C	+	+	+	
a 45°C	+	+	+	
Fermentación de glucosa	homofermentaria	homofermentaria	homofermentaria	
Catalasa	-	-	-	
Oxidasa	-	-	-	

<i>Lactobacillus rhamnosus</i>				
Características	ISL20	ISL21	ISL25	ISL35
Bastoncillos	no esporulados, tamaño medio, a veces en cadenas	no esporulados, tamaño medio	no esporulados, a veces en cadenas	no esporulados, tamaño medio
Gram+	+	+	+	+
Medio de cultivo preconizado	MRS o Rogosa	MRS o Rogosa	MRS o Rogosa	MRS o Rogosa
Movilidad	-	-	-	-
Temp. de incubación	37°C	37°C	37°C	37°C
Crecimiento: a 15°C	+	+	+	+
a 45°C	+	+	+	+
Fermentación de glucosa	homofermentaria	homofermentaria	homofermentaria	homofermentaria
Catalasa	-	-	-	-
Oxidasa	-	-	-	-

ES 2 185 752 T3

		<i>Lactobacillus paracasei</i>		
Características		ISL03	ISL27	ISL32
5	Bastoncillos	regulares, no esporulados, de tamaño medio,	largos, no esporulados,	no esporulados, de tamaño medio
10	Gram+	+	+	+
15	Medio de cultivo preconizado	MRS	MRS o Rogosa	MRS o Rogosa
	Movilidad	-	-	-
	Temp. de incubación	30°C	30°C	30°C
	Crecimiento: a 15°C	+	+	+
	a 45°C	+	+	+
20	Fermentación de glucosa	Homofermentaria	Homofermentaria	Homofermentaria
	Catalasa	-	-	-
	Oxidasa	-	-	-

Características		<i>Lactobacillus acidophilus</i> ISL44	<i>Lactobacillus fermentum</i> ISL102
30	Bastoncillos	no esporulados, bastante largos, a veces en cadenas	medios, no esporulados, a veces en parejas
35	Gram+	+	+
40	Medio de cultivo preconizado	MRS o Rogosa	MRS o Rogosa
	Movilidad	-	-
	Temp. de incubación	30°C	37°C
	Crecimiento: a 15°C	-	-
	a 45°C	-	+
45	Fermentación de glucosa	Homofermentaria	Heterofermentaria
	Catalasa	-	-
	Oxidasa	-	-

50 Los resultados de las galerías API 50 CH que proporcionan el perfil de fermentación de los azúcares (caracteres positivos después de 48 h máximo de incubación) (inoculación según API) se ilustran en las figuras 9 a 20.

Ejemplo 3

55 *Características de los Pediococcus conformes a la invención*

La cepa *Pediococcus pentosaceus* tiene las características morfológicas y bioquímicas de la Tabla siguiente:

60

ES 2 185 752 T3

Características	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ICP01
5 Cocci Gram+	en parejas o más raramente en tétradas; nunca en cadenas +
10 Medio de cultivo preconizado Temp. de incubación Crecimiento: a 15°C a 45°C a pH 8 a 4 % NaCl 15 a 6,5 % NaCl a 15 % NaCl	MRS 37°C - + + + + -
20 Fermentación de glucosa Catalasa Oxidasa Arginina Nitrato 25 ONPG Indol Acetoína	homofermentaria - - + - - - -

30 Los resultados de las galerías API 50 CH que proporcionan el perfil de fermentación de los azúcares (caracteres positivos después de 48 horas máximo de incubación) (inoculación según API) se ilustran en la figura 29.

Ejemplo 4

35 *Actividades de los Bacillus y Lactobacillus*

La selección de cepas que presentan una actividad enzimática permite en particular una digestión controlada de los excrementos.

40 1) *Actividades enzimáticas*

* *Actividad proteolítica*

45 Para la mayoría de los ensayos, las actividades enzimáticas se evidenciaron sobre el medio mínimo de base (MMB), a base de agar, para las cepas de *Bacillus* y sobre el medio Rogosa, para las cepas de *Lactobacillus*.

50 Las cepas se sembraron en estrías en el medio MMB o el medio Rogosa, los dos adicionados con un 1% (peso/volumen) de leche descremada en polvo, rica en caseína susceptible de hidrolizarse.

Después de una incubación de 24 horas en estufa a 30°C para los *Bacillus* y 5 días en estufa anaerobia, a 37°C para la flora láctica, la presencia de una actividad proteolítica se traduce por una clarificación del medio, debida a la hidrólisis de la caseína.

55 * *Actividad amilolítica*

60 Como anteriormente, las cepas bacterianas se siembran en forma de estrías en los dos medios adicionados con un 1% (peso/volumen) de almidón de trigo insoluble. Después de incubación en las mismas condiciones que anteriormente, la actividad amilolítica se tradujo por una clarificación del medio alrededor de las colonias dispuestas en forma de estrías, debido a la hidrólisis del almidón.

ES 2 185 752 T3

* Actividad celulolítica

El protocolo es el mismo que para la búsqueda de la actividad amilolítica. El sustrato carbonado utilizado es la carboxi-metil-celulosa.

5

* Hidrólisis del ácido úrico

El principio es el mismo que para la degradación del almidón, adicionándose el ácido úrico a una concentración de un 1% (peso/volumen), la hidrólisis del ácido úrico se traduce por una clarificación del medio.

10

La Tabla dada a continuación ilustra los resultados y los productos de reacción obtenidos:

15

	Presencia de urea	Ureasa	Presencia de amoniaco
<i>B. subtilis</i> (ISB02)	+/-	+/-	+/-
20 <i>B. amyloliquefaciens</i> (ISB04)	-	-	++
<i>B. amyloliquefaciens</i> (ISB05)	+/-	+/-	++
25 <i>B. megaterium</i> (ISB06)	-	-	++
<i>B. licheniformis</i> (ISB07)	-	+/-	++
30 <i>B. subtilis</i> (ISB09)	-	+	+
<i>B. circulans</i> (ISB11)	-	-	-
35 <i>B. subtilis</i> (ISB12)	-	-	+/-

Estos resultados muestran que a excepción de la cepa ISB11, el conjunto de los *Bacillus* son capaces de degradar el ácido úrico hasta el amoniaco.

40

* Hidrólisis de la urea

La hidrólisis de la urea se visualiza utilizando el medio de Stuart. Este medio contiene un indicador coloreado: el rojo de fenol que vira del amarillo al rosa oscuro en todo el tubo, cuando se hidroliza la urea.

45

* Actividad lipolítica

Las diferentes cepas se siembran en un medio tributirina agar. Antes de la utilización, los medios, repartidos en tubos, se agitan con el fin de poner en emulsión la tributirina, luego se vierten en caja de Pétri. Después de la incubación en las condiciones anteriormente precisadas, la hidrólisis de la tributirina se visualiza mediante un aclaración del medio alrededor de la colonia.

50

La Tabla dada a continuación ilustra las diferentes actividades precisadas con anterioridad.

55

60

ES 2 185 752 T3

<i>Bacillus</i>									
Código	NO ₃	NO ₂	Urea	Act. amilolítica	Act. proteolítica	Act. lipolítica	55°C	60°C	Anaerobia /aerobia facultativa
5	ISB02	+	-	+	+	+	+	+	+
10	ISB04	+	-	-	+	+	-	-	+
	ISB05	+	-	-	+	+	-	-	+
15	ISB06	+	-	-	+	+	-	-	+
	ISB07	+	-	-	+	+	-	-	+
20	ISB09	+	-	-	+	+	-	-	+
	ISB11			-	+	+/-			-
25	ISB12			-	+	+			-

Los diferentes bacilos presentan además otras actividades enzimáticas repertoriadas en la Tabla dada a continuación:

Actividades enzimáticas	Xilanasa	CMCasa	Celulasa	Queratinasa	Pectinasa	
30	<i>B. subtilis</i> (ISB02)	+	+	-	++	+
35	<i>B. amylolique-faciens</i> (ISB04)	+	+	-	+	+
	<i>B. amylolique-faciens</i> (ISB05)	+	+	-	-	++
40	<i>B. megaterium</i> (ISB06)	+	+	+/-	-	+
	<i>B. licheniformis</i> (ISB07)	+	+	-	-	+/-
45	<i>B. subtilis</i> (ISB09)	+	+	+/-	-	+
	<i>B. circulans</i> (ISB11)	+	+	++	-	-
50	<i>B. subtilis</i> (ISB12)	+	+	+/-	-	-

Los *Lactobacillus* seleccionados no presentan actividad amilolítica, proteolítica o lipolítica.

2) Actividad del tipo bacteriocina y similar a la bacteriocina

La búsqueda de sustancias inhibitoras se realiza para todas las cepas seleccionadas.

Las bacteriocinas son proteínas de origen plasmídico, cuya particularidad es tener una actividad bactericida, dirigida contra las bacterias de la misma especie o de especies homólogas. Las cepas productoras de bacteriocinas tienen un gen de inmunidad contra su propia bacteriocina. Se habla de actividad similar a la bacteriocina para las actividades bactericidas dirigidas contra las bacterias heterólogas.

ES 2 185 752 T3

La selección de cepas capaces de producir sustancias de tipo bacteriocina, inhibidoras se realiza por la observación en caja de Pétri, de un aclaración alrededor de una colonia bacteriana. Este aclaración corresponde a la inhibición de las bacterias patógenas presentes en la gelosa, por las cepas seleccionadas.

5 Las bacterias patógenas utilizadas para esta investigación son:

- *Escherichia coli* (serotipo O78K82)

- *Salmonella enteritidis*

10 - *Salmonella typhimurima*

- *Staphylococcus aureus*

- *Clostridium perfringens*

15 - *Clostridium septicum*

- *Listeria monocytogenes*.

20 Se trata de los principales patógenos encontrados en las camas de paja contaminadas.

Los medios utilizados para el cultivo de las bacterias patógenas se indican en la Tabla dada a continuación.

25

Medios de cultivo de las bacterias patógenas		
Cepas	Medio líquido	Medio gelosado
<i>Escherichia coli</i>	BNL	BNG
<i>Staphylococcus aureus</i>	BNL	BNG
<i>Salmonella</i>	BNL	BNG
<i>Clostridium</i>	Caldo RCM	Gelosa RCM
<i>Listeria</i>	Triptosa	Triptosa gelosada

30

35

40

Los *Lactobacillus* son productores de ácido láctico, que es la principal fuente de inhibición *in vitro* de las bacterias patógenas. Para neutralizar este factor, del medio Rogosa tamponado a un pH de 6,1, con un tampón fosfato se utiliza para el cultivo de los *Lactobacillus*.

45 Después de la siembra de las diferentes cepas de *Lactobacillus* e incubación, 8 h a 37°C, en anaerobiosis, cada colonia se cubrió con una gota de medio específico de la bacteria patógena a ensayar.

50 Se vertieron en la caja 20 ml de medio gelosado de las cepas patógenas específicas adicionadas con 5 ml de cultivo bacteriano patógeno.

La lectura de las cajas de Pétri se realiza después de 24h de incubación a 37°C.

55 El tamaño de las zonas de inhibición producida fue medido; el diámetro de inhibición calculado corresponde a la diferencia entre el diámetro de la zona de inhibición y el diámetro de la colonia de *Lactobacillus*. Los resultados se ilustran en la Tabla dada a continuación.

60

ES 2 185 752 T3

<i>Lactobacillus</i>						
Código	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i> K82	<i>Listeria</i> 1/2a	<i>Listeria</i> 1/2b	<i>Listeria</i> 1/2c
5 ISL01	9	6	8	9	11	8
ISL03	15	8	9	-	-	-
10 ISL05	6	4	2	-	15	15
ISL10	7	8	8	-	13	11
15 ISL20	-	-	2	8	23	15
ISL21	-	-	18	-	9	-
20 ISL25	7	8	-	-	16	-
ISL27	10	12	12	-	-	-
25 ISL32	8	-	8	-	18	15
ISL35	10	5	5	-	12	22
30 ISL44	12	5	6	7	6	8
ISL102	8	0	0	8	0	10

35 Para el estudio de la acción bacteriocina de los *Bacillus*, las condiciones son las siguientes:

10 ml de medio de PCA se vertieron en cajas de Pétri; cultivos de 24 horas de las cepas de *Bacillus* seleccionadas se replantaron en puntos; después de 24 h de incubación a 30°C, la gelosa se despegó con una espátula estéril y se devolvió a una caja de Pétri de 9 cm de diámetro; 20 ml de medio geloso específico de las cepas patógenas adicionadas con 5 ml de un pre-cultivo de estas mismas bacterias se vertieron en la caja de Pétri.

La lectura de las cajas de Pétri se realiza después de 24 h de incubación, como se ha precisado anteriormente para los *Lactobacillus*.

45 La Tabla dada a continuación ilustra los resultados obtenidos.

50

55

60

ES 2 185 752 T3

<i>Bacillus</i>						
Código	<i>Clostridium Perfringens</i> ø mm	<i>Clostridium septicum</i> ø mm	<i>E. coli</i> 078K82 ø mm	<i>Salmonella enteritidis</i> ø mm	<i>Salmonella typhimurium</i> ø mm	<i>Listeria</i>
ISB2	13	0	0	0	0	0
ISB4	19	9	2	2	7	0
ISB5	20	22	8	5	4	0
ISB6	12	8	5	7	5	0
ISB7	9	12	4	8	6	0
ISB9	18	11	0	0	0	0
ISB11	0	0	0	0	0	0
ISB12	10	0	0	0	0	14

Ninguna de las cepas seleccionadas, manifiesta una actividad inhibidora respecto al *Spahylococcus aureus*. Por el contrario estas diferentes cepas seleccionadas presentan espectros de inhibición particularmente interesantes así como todas las actividades enzimáticas investigadas.

3) CMI de diferentes factores de crecimiento

a) *Bacillus*

Factor de crecimiento ($\mu\text{g/ml}$) código	flavo- micina	tylan	stafac	sacox	monensin	avotan	espira- micina
<i>B.subtilis</i> (ISB02)	>10	2,5	5	2,5	>10	<0,625	>10
<i>B. amylolique-Faciens</i> (ISB04)	>10	5	>10	1,25	>10	<0,625	10
<i>B. amylolique-Faciens</i> (ISB05)	>10	<0,625	5	2,5	>10	<0,625	10
<i>B. megaterium</i> (ISB06)	10	2,5	10-5	2,5	>10	<0,625	10
<i>B. licheni Formis</i> (ISB07)	>10	2,5	>10	2,5	>10	<0,625	2,5
<i>B. subtilis</i> (ISB09)	10	2,5	5-2,5	2,5	10	<0,625	10
<i>B. circulans</i> (ISB11)	<0,625	1,25	1,25	<0,625	>10	<0,625	5
<i>B. subtilis</i> (ISB12)	>10	10-5	10	1,25	>10	<0,625	10

ES 2 185 752 T3

b) *Lactobacillus*

5	Factor de crecimiento ($\mu\text{g/ml}$) código	flavo- micina	tylan	stafac	sacox	monensin	avotan	espira- micina
10	<i>L. rhamnosus</i> (ISL01)	5-2,5	<2,5	<2,5	2-1	<2,5	40-20	<5
	<i>L. paracasei</i> (ISL03)	10-5	<2,5	<2,5	4-2	20-10	R	<5
15	<i>L. rhamnosus</i> (ISL05)	40-20	<2,5	5-2,5	2-1	5-2,5	R	<5
20	<i>L. rhamnosus</i> (ISL10)	10-5	<2,5	5-2,5	2-1	5-2,5	R	<5
	<i>L. rhamnosus</i> (ISL20)	20-10	<2,5	<2,5	<1	20-10	R	R
25	<i>L. rhamnosus</i> (ISL21)	10-5	<2,5	<2,5	<1	20-10	R	<5
30	<i>L. rhamnosus</i> (ISL25)	20-10	<2,5	<2,5	4-2	5-2,5	R	<5
	<i>L. paracasei</i> (ISL27)	10-5	<2,5	<2,5	4-2	5-2,5	R	<5
35	<i>L. paracasei</i> (ISL32)	R	<2,5	20-10	R	R	R	<5
40	<i>L. rhamnosus</i> (ISL35)	R	<2,5	10-5	16-8	40-20	R	<5
	<i>L. acidophilus</i> (ISL44)	40-20	20-10	40-10	R	R	R	20-10
45	<i>L. fermentum</i> (ISL102)	R	<2,5	10-5	8-4	40-20	R	<5

50 Estos resultados muestran que las cepas de *Lactobacillus* sometidas a ensayo son más resistentes que las cepas de *Bacillus*; se aprecia una fuerte inhibición de las cepas de *Bacillus* por el avotan y el sacox, siendo los CMI respectivos de <0,625 y de 1,25.

55 La cepa de ISL44 es resistente a la mayoría de los factores de crecimiento.

Ejemplo 5

Actividad del tipo bacteriocina y similar a la bacteriocina de Pediococcus pentosaceus

60 Después del cultivo de *Pediococcus* en medio MRS (de Man, Rogosa y Shape) al 4 % de NaCl, se realiza una gama de diluciones-suspensiones hasta 10^{-7} ; las diluciones 10^{-1} a 10^{-5} se siembran en superficie en cajas de Pétri conteniendo el medio MRS, a razón de 0,1 ml por dilución, luego extendidas con rastrillo.

ES 2 185 752 T3

Las siembras se realizan por duplicado para cada dilución. Las cajas se incuban a 37°C durante 48 h, en estufa anaerobia (10 % de CO₂ y 90 % de N₂).

5 Antes de recuperar el sobrenadante de cultivo, se comprueba la pureza de la cepa sembrando para
ello las cepas en cajas de MRS gelosado, según la técnica de los cuadrantes (cultivo 48 h a 37°C en estufa
anaerobia). Una colonia bien aislada permite inocular un tubo de 10 ml de caldo MRS, que se pone
seguidamente en estufa 24 h a 37°C, en anaerobiosis. 1 ml de cada precultivo se siembra en 50 ml de
caldo MRS y la incubación se realiza durante 16 h en las mismas condiciones; 20 ml de sobrenadante
10 de cultivo se extraen al término de la incubación de 16 h y se centrifugan a 10 000 g. El sobrenadante
desprovisto de las células y conteniendo los productos excretados fue recuperado.

* Preparación de los diferentes testigos

15 Se realizaron varios tratamientos sobre el sobrenadante obtenido, con el fin de asegurar que la inhi-
bición se debe a la presencia de una bacteriocina; en efecto, el sobrenadante presenta un pH ácido
(aproximadamente 4,5), contiene ácidos orgánicos producidos por la indicada cepa (ácido acético y ácido
láctico), peróxido de hidrógeno (ausencia de catalasa):

- inhibición de la acción del pH: neutralización a un pH de 6,5-7,5 (ensayo del pH);
- 20 • evaluación de la acción de los ácidos orgánicos: testigo que contiene únicamente estos ácidos (ensayo
de los ácidos);
- inhibición de la acción del peróxido de hidrógeno: testigos con catalasa (incubación de 0,5 ml de
25 catalasa con 0,5 ml de sobrenadante de cultivo de *Pediococcus pentosaceus* durante 1 hora a 37°C,
luego enfriamiento una hora a temperatura ambiente, antes de realizar el ensayo de inhibición)
(ensayo de la catalasa);
- evaluación de la acción de la temperatura (calor o frío) (ensayos del frío y del calor);
- 30 • evaluación de la acción de las enzimas proteolíticas (tripsina, α -quimotripsina, pronasa E), según
un protocolo idéntico al utilizado para la catalasa (ensayos de la tripsina, de la pronasa y de la
 α -quimotripsina),
- evaluación del peso molecular de la bacteriocina producida (ensayo de diálisis).

35 * Ensayo de inhibición de *S. aureus*

Todas las muestras preparadas (sobrenadante de cultivo y diferentes testigos) se esterilizan con la
ayuda de filtros de 0,2 μ m; el ensayo se realiza como sigue:

40 Se vierten en dos cajas de Pétri 100 ml de BNG, mantenido a 45°C y al cual se han añadido 0,5 ml
de un cultivo de 16 h de *S. Aureus*. El conjunto se deja solidificar; con la ayuda de un sacabocados, se
perforan 9 pocillos en cada caja. Las cajas se dejan de nuevo solidificar durante aproximadamente 1 h a
4°C. Cada pocillo se llenó entonces con 100 μ l de muestra (sobrenadante de cultivo o testigo), como se
45 ilustra en la tabla dada a continuación.

50

55

60

ES 2 185 752 T3

N° de pocillos	Caja de Pétri I	Caja de Pétri II
1	Sobrenadante testigo	Sobrenadante testigo
2	Ensayo catalasa	Ensayo del frío
3	Ensayo catalasa testigo*	Ensayo del calor
4	Ensayo tripsina	Ensayo de pH
5	Ensayo pronasa E	Ensayo de los ácidos
6	Ensayo pronasa E testigo*	Ensayo diálisis
7	Ensayo tripsina testigo*	Ensayo tampón solo
8	Ensayo α -quimotripsina	Nada
9	Ensayo α -quimotripsina testigo*	Nada

* sin sobrenadante de cultivo

Las cajas se colocan a 4°C durante aproximadamente 2 horas, con el fin de que la bacteriocina se difunda en la gelosa, luego todo se pone en estufa a 37°C durante 24 h.

* Resultados

La Tabla dada a continuación ilustra los resultados obtenidos.

N° de pocillos	Diámetro de inhibición Caja I	Diámetro de inhibición Caja II
1	13	12
2	11	11
3	0	6
4	12	11
5	10	0
6	0	11
7	0	0
8	12	0
9	0	0

Estos resultados muestran que *Pediococcus pentosaceus* produce una bacteriocina efectivamente activa en *S. Aureus*

ES 2 185 752 T3

Ejemplo 6

Evidenciación de la sinergia de acción entre los Bacillus y los Lactobacillus en un complejo bacteriano según la invención

5

1) comparación de los tiempos de generación (Tg), del número de ufc/ml y del porcentaje de supervivencia para algunas cepas de *Lactobacillus* en monocultivo/en su asociación en un complejo bacteriano según la invención (en un medio constituido por excrementos, estéril y sembrado con las bacterias citadas):

10

Cepas de <i>Lactobacillus</i>	Tg (h)	ufc/ml (final)	Porcentaje de supervivencia (%)
<i>L. rhamnosus</i> (ISL01)	13	$3,30 \cdot 10^7$	22,4
<i>L. rhamnosus</i> (ISL01) + <i>B. subtilis</i> (ISB02)	6	$6,40 \cdot 10^7$	52,4
<i>L. rhamnosus</i> (ISL01) + <i>B. megaterium</i> (ISB06)	8	$1,20 \cdot 10^7$	50,0
<i>L. rhamnosus</i> (ISL01) + <i>B. subtilis</i> (ISB09)	8	$5,40 \cdot 10^8$	23,7
<i>L. rhamnosus</i> (ISL21)	9,8	$1,00 \cdot 10^8$	100
<i>L. rhamnosus</i> (ISL21) + <i>B. circulans</i> (ISB11)	4	$2,01 \cdot 10^7$	79,7

15

20

25

30

2) comparación del tiempo de generación y del número de ufc/ml de las cepas de *Bacillus* en monocultivo y en cocultivo:

35

Cepas de <i>Bacillus</i>	Tg (h)	ufc/ml máx. avt esporulación
<i>B. megaterium</i> (ISB06)	2,9	$7,3 \cdot 10^8$
<i>B. megaterium</i> (ISB06) + <i>L. paracasei</i> (ISL27)	0,8	$1,20 \cdot 10^8$
<i>B. circulans</i> (ISB11)	3,2	
<i>B. circulans</i> (ISB11) + <i>L. rhamnosus</i>	0,28	$2,40 \cdot 10^8$

40

45

50

55

60

ES 2 185 752 T3

3) degradación del ácido úrico

		24 h (%)	48 h (%)
5	Testigo	0	0
	<i>L. paracasei</i> (ISL27)	60	71
10	<i>B. megaterium</i> (ISB06) + <i>L. paracasei</i> (ISL27) (con glucosa)	75	91
	<i>L. rhamnosus</i> (ISL21)	48	63
15	<i>B. circulans</i> (ISB11) + <i>L. rhamnosus</i> (ISL21) (con glucosa)	72	85

Ejemplo 7

20 Complejo bacteriano para cama de paja de rumiantes y cerdos

	Complejo 1 (ufc/g)		Complejo 2 (ufc/g)		Complejo 3 (ufc/g)		Complejo 4 (ufc/g)	
25	<i>B. subtilis</i>	ISB02 10 ²	ISB02 10 ⁴	ISB02 10 ⁴	ISB02 10 ⁴	ISB02 10 ⁵	ISB02 10 ⁵	
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	ISB05 10 ²	ISB05 10 ⁴	ISB05 10 ⁴	ISB05 10 ⁴	ISB05 10 ⁵	ISB05 10 ⁵	
	<i>B. megaterium</i>	ISB06 10 ²	ISB06 10 ⁴	ISB06 10 ⁴	ISB06 10 ⁴	ISB06 10 ⁵	ISB06 10 ⁵	
30	<i>B. licheniformis</i>	ISB07 10 ²	ISB07 10 ⁴	ISB07 10 ⁴	ISB07 10 ⁴	ISB07 10 ⁵	ISB07 10 ⁵	
	<i>B. circulans</i>	ISB11 10 ²	ISB11 10 ⁴	ISB11 10 ⁴	ISB11 10 ⁴	ISB11 10 ⁵	ISB11 10 ⁵	
	<i>L. rhamnosus</i>	ISB20 10 ³	ISB20 10 ⁴	ISB20 10 ⁵	ISB20 10 ⁵	ISB20 10 ⁶	ISB20 10 ⁶	
	<i>L. paracasei</i>	ISB32 10 ³	ISB32 10 ⁴	ISB32 10 ⁵	ISB32 10 ⁵	ISB32 10 ⁶	ISB32 10 ⁶	
	<i>L. fermentum</i>	SB102 10 ³	ISB102 10 ⁴	ISB102 10 ⁵	ISB102 10 ⁵	ISB102 10 ⁶	ISB102 10 ⁶	
35	<i>L. acidophilus</i>	ISB44 10 ³	ISB44 10 ⁴	ISB44 10 ⁵	ISB44 10 ⁵	ISB44 10 ⁶	ISB44 10 ⁶	

Ejemplo 8

40 Complejo bacteriano para camas de paja de aves

	Complejo 5 (ufc/g)		Complejo 6 (ufc/g)		Complejo 7 (ufc/g)	
45	<i>B. subtilis</i>	ISB02 10 ³	ISB02 10 ⁵	ISB02 10 ⁵	ISB02 10 ⁶	ISB02 10 ⁶
	<i>B. circulans</i>	ISB11 10 ³	ISB11 10 ⁵	ISB11 10 ⁵	ISB11 10 ⁶	ISB11 10 ⁶
	<i>L. rhamnosus</i>	ISL20 10 ²	ISL20 10 ⁴	ISL20 10 ⁴	ISL20 10 ⁵	ISL20 10 ⁵
	<i>L. paracasei</i>	ISL32 10 ²	ISL32 10 ⁴	ISL32 10 ⁴	ISL32 10 ⁵	ISL32 10 ⁵
50	<i>L. fermentum</i>	ISL102 10 ²	ISL102 10 ⁴	ISL102 10 ⁴	ISL102 10 ⁵	ISL102 10 ⁵
	<i>L. acidophilus</i>	ISL44 10 ²	ISL44 10 ⁴	ISL44 10 ⁴	ISL44 10 ⁵	ISL44 10 ⁵

55

60

ES 2 185 752 T3

Ejemplo 9

Complejo bacteriano para líquidos de estiércol y para fosas sépticas

5		Complejo 8 (ufc/g)		Complejo 9 (ufc/g)		Complejo 10 (ufc/g)	
	<i>B. subtilis</i>	ISB02	10 ³	ISB02	10 ⁶	ISB02	10 ²
10	<i>B. amyloquefaciens</i>	ISB04	10 ³	ISB04	10 ⁶	-	
	<i>B. megaterium</i>	ISB06	10 ³	ISB06	10 ⁶	-	
	<i>B. licheniformis</i>	ISB07	10 ³	ISB07	10 ⁶	-	
	<i>B. circulans</i>	ISB11	10 ³	ISB11	10 ⁶	ISB11	10 ²
15	<i>L. rhamnosus</i>	ISL20	10 ²	ISL20	10 ⁵	-	
	<i>L. paracasei</i>	ISL32	10 ²	ISL32	10 ⁵	-	
	<i>L. fermentum</i>	ISL102	10 ²	ISL102	10 ⁵	-	
	<i>L. acidophilus</i>	ISL44	10 ²	ISL44	10 ⁵	ISL44	10 ²

20 Ejemplo 10

Complejo bacteriano para abono (abono compuesto)

25		Complejo 11 (ufc/g)		Complejo 12 (ufc/g)		Complejo 13 (ufc/g)	
	<i>B. subtilis</i>	ISB02	10 ³	ISB02	10 ²	ISB02	10 ⁴
30	<i>B. amyloquefaciens</i>	ISB12	10 ³	ISB04	10 ²	ISB04	10 ⁴
	<i>B. megaterium</i>	ISB05	10 ³	ISB06	10 ²	ISB06	10 ⁴
	<i>B. licheniformis</i>	ISB06	10 ³	ISB07	10 ²	ISB07	10 ⁴
	<i>B. circulans</i>	ISB11	10 ³	ISB11	10 ²	ISB11	10 ⁴
35	<i>L. rhamnosus</i>	ISL35	10 ⁴	ISL20	10 ⁴	ISL20	10 ⁶
	<i>L. paracasei</i>	ISL32	10 ⁴	ISL20	10 ⁴	ISL20	10 ⁶
	<i>L. fermentum</i>	ISL102	10 ⁴	ISL102	10 ⁴	ISL102	10 ⁶
	<i>L. acidophilus</i>	ISL44	10 ⁴	ISL44	10 ⁴	ISL44	10 ⁶

40 Ejemplo 11

Complejo bacteriano para limpieza de laguna

45		Complejo 14 (ufc/g)		Complejo 15 (ufc/g)	
	<i>B. subtilis</i>	ISB02	10 ³	ISB02	10 ⁶
50	<i>B. amyloquefaciens</i>	ISB04	10 ³	ISB04	10 ⁶
	<i>B. licheniformis</i>	ISB07	10 ³	ISB07	10 ⁶
	<i>B. circulans</i>	ISB11	10 ³	ISB11	10 ⁶
	<i>L. rhamnosus</i>	ISL01	10 ²	ISL01	10 ⁵
55	<i>L. paracasei</i>	ISL03	10 ²	ISL03	10 ⁵
	<i>L. fermentum</i>	ISL102	10 ²	ISL102	10 ⁵
	<i>L. acidophilus</i>	ISL44	10 ²	ISL44	10 ⁵

60

ES 2 185 752 T3

Ejemplo 12

Complejo bacteriano para el tratamiento de cadáveres de animales

5

10

15

20

	Complejo 16 (ufc/g)		Complejo 17 (ufc/g)		Complejo 18 (ufc/g)	
<i>B. subtilis</i>	ISB02	10 ²	ISB02	10 ⁵	ISB02	10 ⁵
<i>B. amyloquefaciens</i>			ISB05	10 ⁵	ISB05	10 ⁵
<i>B. megaterium</i>	ISB05	10 ²	ISB06	10 ⁵	ISB06	10 ⁵
<i>B. licheniformis</i>			ISB07	10 ⁵	ISB07	10 ⁵
<i>B. circulans</i>			ISB11	10 ⁵	ISB11	10 ⁵
<i>L. rhamnosus</i>	ISL35	10 ³ ó	ISL35	10 ⁵	ISL35	10 ⁶
<i>L. paracasei</i>	ISL32	10 ³ ó	ISL32	10 ⁵	ISL32	10 ⁶
<i>L. fermentum</i>	ISL102	10 ³ ó	ISL102	10 ⁵	ISL102	10 ⁶
<i>L. acidophilus</i>	ISL44	10 ³	ISL44	10 ⁵	ISL44	10 ⁶

Ejemplo 13

Comparación de camas de paja tratadas/camas de paja sin tratar

25

a) Siembra de las camas de paja

30

Las camas de paja se sembraron de tal forma que la concentración en *Bacillus* fuese de 100 ufc/g de paja (2.10³ ufc de *Bacillus* por 20 g de producto para tratamiento de camas de paja (complejo o composición de tratamiento conforme a la invención)).

35

Dos métodos diferentes de siembra experimentales de las camas fueron utilizados. Un primer método consiste en la siembra de 400 g de cama de paja colocados en una caja herméticamente cerrada, con un complejo bacteriano conforme a la invención. La incubación se realizó a 30°C. Después de 3 y 7 días de incubación, se extrajeron 20 g de cama de paja. Las muestras se prepararon seguidamente como sigue:

40

20 g de producto a analizar se mezclaron con 180 ml de diluyente triptona sal luego se homogeneizaron en el Stomacher (Lab. Blender) durante 2 min. A partir de esta suspensión madre (→dilución a la 1/10^a), se realiza una gama de diluciones para efectuar el análisis microbiano.

45

En el segundo método utilizado, para mejorar la homogeneidad de las siembras, 20 g de cama de paja se depositaron en una bolsa Stomacher con filtro, que evita extraer residuos de cama de paja durante diluciones. La siembra se hace directamente en las bolsas que se incuban según el tiempo deseado a 30°C, a cada tiempo corresponde una bolsa de 60 ml de diluyente triptona-sal se mezclaron seguidamente con la cama de paja, luego se realizó una gama de diluciones decimales.

Las numeraciones se realizan sobre:

50

- la flora termorresistente (*Bacillus*)
- los coliformes fecales,
- los anaerobios sulfito-reductores (*Clostridium*),
- la flora láctica (*Lactobacillus*),

55

conforme a los protocolos usuales de cultivo.

La presencia de *Salmonella* es investigada igualmente.

60

ES 2 185 752 T3

b) *Evolución del nitrógeno (solubilidad, nitrógeno amoniacal, nitrógeno aminado) y la materia seca de una cama de paja tratada con un complejo según la invención (cama bovina, según el ejemplo 4):*

Las figuras 21 a 23 muestran la evolución con el transcurso del tiempo de la materia seca (en porcentaje), de la relación C/N, del pH, del nitrógeno total (en porcentaje), de la solubilidad del nitrógeno (en porcentaje), del porcentaje de nitrógeno amoniacal con relación al nitrógeno total, del porcentaje de nitrógeno aminado, de las concentraciones en nitrato y de los porcentajes en fósforo, fosfatos y potasio.

En estas figuras, las columnas A representan las camas de paja sin tratar, en su sitio desde hace 2 semanas, las columnas B, C y D representan las camas de paja tratadas con un complejo bacteriano según el ejemplo 4, colocadas desde hace 7 semanas (columnas B), colocadas desde hace 16 semanas (columnas C) y colocadas desde hace 12 semanas y almacenadas desde hace 8 semanas (columnas D).

Estas figuras muestran que después del tratamiento con un complejo bacteriano conforme a la invención, se produce la estabilización del nitrógeno; disminución significativa del nitrógeno en forma soluble y aumento del porcentaje de nitrógeno aminado (figura 22).

Por otro lado, mientras que una putrefacción normal produce una hidrólisis y una baja de la materia seca, el tratamiento conforme a la invención permite evitar dicha baja (figura 21).

c) *Comparación de los contenidos en nitratos de abonos diferentemente tratados*

La figura 24 ilustra más precisamente la evolución del contenido en nitratos de abono, según el tratamiento al cual han sido sometidos.

La columna 1 corresponde al abono tratado por un producto del comercio (BIO-SUPER[®]), la columna 2 corresponde a una cama de paja colocada tratada con un complejo bacteriano según el ejemplo 7, antes de realizar un abonado, y la columna 3 ilustra los porcentajes de nitratos obtenidos en las camas de paja tratadas y abonadas conforme a la invención. Esta figura muestra la capacidad de los complejos bacterianos conformes a la invención para utilizar los nitratos como fuente de nitrógeno.

La figura 25 ilustra el interés del abonado del estiércol para limitar la contaminación de las capas freáticas y muestra, en particular, la disminución significativa de nitrógeno soluble y de amoníaco en un estiércol tratado y abonado conforme a la invención.

En esta figura, las columnas 1 a 3 ilustran la evolución del nitrógeno soluble: la columna 1 ilustra la cantidad de nitrógeno soluble (en porcentaje) de un estiércol testigo (55%), la columna 2 ilustra la cantidad de nitrógeno soluble (en porcentaje) de una cama de paja tratada colocada pero sin abonar con un complejo bacteriano según el ejemplo 7 (33,4%) y la columna 3 ilustra la cantidad de nitrógeno soluble (en porcentaje) de una cama tratada y abonada con un complejo bacteriano según el ejemplo 7 (16,72%), las columnas 4 a 6 ilustran la evolución de la relación amoníaco/nitrógeno total (en porcentaje); la columna 4 ilustra esta relación para un estiércol testigo (45,66%), lo cual corresponde al 83% del nitrógeno soluble, la columna 5 ilustra la indicada relación para una cama de paja tratada colocada con un complejo bacteriano según el ejemplo 7 pero sin abonar (28,37%), lo cual corresponde al 84,9% del nitrógeno soluble y la columna 6 ilustra la misma relación para una cama de paja tratada y abonada con un complejo bacteriano según el ejemplo 7 (4,24%), lo cual corresponde al 25,4% del nitrógeno soluble.

d) *Valores y distribución del nitrógeno en los estiércoles de bovino: estudio comparado*

Las figuras 26, 27 y 28 muestran la evolución y la distribución comparadas del nitrógeno: valores convencionales y valores obtenidos con un estiércol tratado conforme a la invención.

En las figuras 26 y 27, la distribución del nitrógeno es la siguiente.

- (1) nitrógeno amoniacal volatilizado no cuantificable
- (2) nitrógeno perdido: NH_3 en el aire, NH_3 en los suelos,
- (3) nitrógeno amoniacal en el estiércol,
- (4) nitrógeno proteico.

ES 2 185 752 T3

En la figura 26, los resultados se expresan en valores, mientras que en la figura 27, se expresan en porcentaje.

En estas dos figuras, la columna A corresponde a un estiércol testigo fresco sin tratar, la columna B
5 corresponde a un estiércol testigo sin tratar listo para extender, la columna C corresponde a un estiércol
tratado conforme a la invención a la salida de la estabulación, la columna D corresponde a un estiércol
tratado y abonado conforme a la invención, las columnas E (figuras 26 y 27) y F (figura 26) son los
valores convencionales proporcionados por el ITCF (columna E) y el INRA (columna F). Estas figuras
26 y 27 muestran:

- 10
- la ausencia de nitrógeno perdido en un estiércol tratado conforme a la invención (columnas C y D),
 - una presencia muy pequeña de nitrógeno amoniacal en un estiércol tratado y abonado según la
15 invención (columna D) (4,24% contra 31,5% para el estiércol ITCF (columna E)) y una cantidad
importante de nitrógeno proteico (95,76) (columna D).

La figura 28 proporciona los valores comparados de nitrógeno/materia seca: estiércol testigo (columna
A), valores ITCF (columnas B y C), valores INRA (columna D) y valores según la invención (columnas
E y F) e ilustra la ausencia de pérdida de nitrógeno en un estiércol tratado conforme a la invención.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Complejo bacteriano, **caracterizado** porque comprende al menos un *Bacillus* no patógeno seleccionado entre el grupo constituido por *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* y *B. circulans* y al menos un *Lactobacillus* no patógeno seleccionado entre el grupo constituido por *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. fermentum* y *L. acidophilus*, porque utiliza como fuente de nitrógeno, nitrógeno mineral y moléculas de nitrógeno orgánico, y porque es apto para transformar el indicado nitrógeno en nitrógeno orgánico en forma de proteínas bacterianas.
2. Complejo bacteriano según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el indicado nitrógeno mineral está seleccionado entre el grupo constituido por el amoníaco, los nitratos y los nitritos, y porque las indicadas moléculas de nitrógeno orgánico están seleccionadas entre el grupo constituido por urea, uratos, aminoácidos, bases nitrogenadas y cualquier otro compuesto nitrogenado de bajo peso molecular.
3. Complejo bacteriano según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizado** porque presenta al menos las actividades enzimáticas siguientes: actividad celulolítica, actividad proteolítica, actividad amilolítica, actividad lipolítica y actividad pectinolítica.
4. Complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque las proporciones *Lactobacillus*:*Bacillus*, en el indicado complejo, están comprendidas entre 100:1 y 1:100.
5. Complejo bacteriano según la reivindicación 4, **caracterizado** porque las proporciones *Lactobacillus*:*Bacillus*, en dicho complejo, están comprendidas entre 10:1 y 1:10.
6. Complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque cuando el indicado complejo bacteriano comprende varios *Bacillus* y/o varios *Lactobacillus*, las diferentes cepas de un mismo género (*Bacillus* o *Lactobacillus*) se encuentran en una relación comprendida entre 1:1 y 1:100.
7. Complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque las concentraciones bacterianas están comprendidas entre 10^2 y 10^8 ufc/g.
8. Complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque comprende al menos un *Bacillus* seleccionado entre el grupo constituido por *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* y *B. circulans*, a una concentración comprendida entre 10^2 y 10^7 ufc/g, y al menos un *Lactobacillus* seleccionado entre el grupo constituido por *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. fermentum* y *L. acidophilus*, a una concentración comprendida entre 10^3 y 10^8 ufc/g.
9. Complejo bacteriano según la reivindicación 8, **caracterizado** porque el indicado complejo bacteriano comprende *B. subtilis* a una concentración comprendida entre 10^2 y 10^7 ufc/g y un *Lactobacillus* seleccionado entre el grupo constituido por *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. fermentum* y *L. acidophilus*, a una concentración comprendida entre 10^3 y 10^8 ufc/g.
10. Complejo bacteriano según la reivindicación 8, **caracterizado** porque comprende los 5 *Bacillus* siguientes: *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* y *B. circulans*, cada uno a una concentración comprendida entre 10^2 y 10^7 ufc/g, y los 4 *Lactobacillus* siguientes: *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. fermentum* y *L. acidophilus*, cada uno a una concentración comprendida entre 10^3 y 10^8 ufc/g.
11. Complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque comprende al menos un *Bacillus* que utiliza, como fuente de nitrógeno, los uratos.
12. Complejo bacteriano según la reivindicación 11, **caracterizado** porque el indicado *Bacillus* es *B. subtilis*, presente a una concentración mínima de 10^3 ufc/g.
13. Complejo bacteriano según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, **caracterizado** porque comprende otro *Bacillus*, seleccionado entre el grupo constituido por *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* y *B. circulans* y al menos un *Lactobacillus* seleccionado entre el grupo constituido por *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, a una concentración comprendida entre 10^2 y 10^8 ufc/g.
14. Complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque

ES 2 185 752 T3

comprende al menos un *Lactobacillus* seleccionado entre el grupo constituido por *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. fermentum* y *L. acidophilus* y al menos un *Bacillus* seleccionado entre el grupo constituido por *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* y *B. circulans*, estando la relación *Lactobacillus*:*Bacillus* comprendida entre 1:1 y 1:10.

5

15. Complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque comprende los 2 *Bacillus* siguientes: *B. subtilis* y *B. megaterium*, cada uno a una concentración comprendida entre 10^2 y 10^7 ufc/g, y al menos un *Lactobacillus* seleccionado entre el grupo constituido por *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. fermentum* y *L. acidophilus*, a una concentración comprendida entre 10^3 y 10^8 ufc/g.

10

16. Complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado** porque comprende al menos un *Bacillus* no patógeno, al menos un *Lactobacillus* no patógeno y un *Pediococcus* no patógeno, presente a las mismas concentraciones que los *Lactobacillus*.

15

17. Complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, **caracterizado** porque está asociado con al menos un diluyente neutro.

20

18. Complejo según la reivindicación 17, **caracterizado** porque está asociado, además, con un trazador químico o microbiológico.

19. Complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque las cepas de *Bacillus* son cepas de Gram+ que presentan las características siguientes:

25

- utilizan, como fuente de nitrógeno, de nitrógeno mineral y moléculas de nitrógeno orgánico,
- presentan al menos una de las actividades siguientes: actividad amilolítica, actividad celulolítica, actividad lignocelulolítica, actividad pectinolítica, actividad lipolítica, actividad proteolítica, actividad queratolítica, actividad de tipo bacteriocina o parecida a la bacteriocina, y

30

- presentan al menos las características bioquímicas siguientes: gelatinasa + catalasa + ureasa oxidasa - e indol -.

20. Complejo bacteriano según la reivindicación 19, **caracterizado** porque las indicadas cepas de *Bacillus* han sido depositadas en el Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM), con fecha 8 de Junio de 1994, bajo los números I-1433, I-1438 e I-1440 por lo que respecta al *Bacillus subtilis*, bajo los números I-1434 e I-1435, por lo que respecta al *Bacillus amyloliquefaciens*, bajo el número I-1436 por lo que respecta al *Bacillus megaterium*, bajo el número I-1437 por lo que respecta al *Bacillus licheniformis*, y bajo el número I-1439 por lo que respecta al *Bacillus circulans*.

35

21. Complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, **caracterizado** porque las cepas de *Lactobacillus* son cepas de Gram+ que presentan las características siguientes:

40

- utilizan, como fuente de nitrógeno, nitrógeno mineral y moléculas de nitrógeno orgánico,
- presentan al menos una actividad de tipo bacteriocina o similar a la bacteriocina, y
- presenta al menos las características bioquímicas siguientes: catalasa - y oxidasa-.

45

22. Complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, **caracterizado** porque el indicado nitrógeno mineral está seleccionado entre el grupo constituido por el amoníaco, los nitratos y los nitritos, y porque las indicadas moléculas de nitrógeno orgánico están seleccionadas entre el grupo constituido por la urea, el urato, los aminoácidos, las bases nitrogenadas y cualquier otro compuesto nitrogenado de bajo peso molecular.

50

23. Complejo bacteriano según la reivindicación 21 o la reivindicación 22, **caracterizado** porque las indicadas cepas de *Lactobacillus* han sido depositadas en el Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM), con fecha 28 de Julio de 1994, bajo los números I-1450, I-1452, I-1454, I-1455, I-1456, I-1459 por lo que respecta al *Lactobacillus rhamnosus*, bajo los números I-1451, I-1457 e I-1458 por lo que respecta al *Lactobacillus paracasei*, bajo el número I-1460 por lo que respecta al *Lactobacillus acidophilus*, y bajo el número I-1461 por lo que se refiere al *Lactobacillus fermentum*.

55

60

24. Complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, **caracterizado** porque las cepas de *Pediococcus* son cepas de Gram+ que presentan las características siguientes:

ES 2 185 752 T3

- presentan una actividad de tipo bacteriocina o parecida a la bacteriocina al menos respecto al *Staphylococcus aureus* y,

- presentan al menos las características bioquímicas siguientes: catalasa - y oxidasa-.

5 25. Complejo bacteriano según la reivindicación 24, **caracterizado** porque la indicada cepa *Pediococcus* es *Pediococcus pentosaceus*, depositada en el Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM), con fecha 22 de Diciembre 1995, bajo el número I-1654.

10 26. Complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25, **caracterizado** porque las cepas de *Bacillus*, de *Lactobacillus* y de *Pediococcus* son aerobias/anaerobias facultativas.

15 27. Composición de tratamiento de los residuos biológicos, **caracterizada** porque comprende en asociación un complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, al menos un diluyente y al menos un fijador de micropartículas.

28. Composición del producto diluido listo para el empleo según la reivindicación 27, **caracterizada** porque comprende esencialmente de un 5 a 15% de complejo bacteriano, de un 80-89% de diluyente neutro y de un 3 a 5% de fijador de micropartículas.

20 29. Composición según la reivindicación 27 o la reivindicación 28, **caracterizada** porque comprende, además, un trazador químico o microbiológico.

25 30. Procedimiento de tratamiento de residuos biológicos, **caracterizado** porque comprende la puesta en contacto de un complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, con un residuo biológico a tratar.

30 31. Procedimiento según la reivindicación 30, **caracterizado** porque los indicados residuos biológicos son excrementos, camas de paja, estiércol, aguas de estiércol, cadáveres, lagunas o mezclas de desechos vegetales.

32. Procedimiento de preparación de un complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, **caracterizado** porque comprende:

35 - el cultivo y la producción de un número preseleccionado de cepas tales como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 26,

- obtención de diferentes cultivos teniendo cada uno una concentración en micro-organismos del orden de 10^{10} , 10^{11} ufc/g,

40 - la liofilización de cada cultivo,

- la dilución entre 1/100 y 1/1000 000 de cada uno de los indicados cultivos de cepa liofilizada, en presencia de un diluyente neutro, y

45 - la mezcla de las diferentes cepas así diluida para la obtención de un complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

50 33. Procedimiento de preparación de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, **caracterizado** porque comprende la mezcla de un complejo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 con al menos un diluyente neutro y al menos un fijador de micropartículas.

34. Aplicación del complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o de la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, en la producción de productos de transformación no contaminantes de residuos biológicos.

55 35. Aplicación del complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 ó 16 a 18, o de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29 que contiene el indicado complejo bacteriano en el tratamiento de las camas de paja de rumiantes, de equinos o de cerdos.

60 36. Aplicación del complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 ó 16 a 18, o de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29 que contiene el indicado complejo bacteriano, para el tratamiento de las camas de paja de aves o de otros monogástricos.

37. Aplicación del complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 16 a 18, o de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29 que contiene el indicado complejo bacteriano, para el tratamiento de las aguas de estiércol, de las lagunas o de las fosas sépticas.

5 38. Aplicación del complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 o de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29 que contiene el indicado complejo bacteriano, para el tratamiento de los cadáveres de animales.

10 39. Aplicación del complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 ó 16 a 18 o de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29 que contiene el indicado complejo bacteriano, en el tratamiento de los productos que se tratan de abonar.

15 40. Aplicación del complejo bacteriano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29 que contiene el indicado complejo bacteriano, en la desinfección de locales.

20

25

30

35

40

45

50

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

55

60

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

ES 2 185 752 T3

CODIGO DE CEPA: ISB 02

	CODIGO		CODIGO
GLICEROL	+	SALICINA	+
ERITRITOL	-	CELOBIOSA	+
D-ARABINOSA	-	MALTOSA	+
L-ARABINOSA	+	LACTOSA	+
RIBOSA	+	MELIBIOSA	+
D-XILOSA	+	SACAROSA	+
L-XILOSA	-	TREHALOSA	+
ADONITOL	-	INULINA	+
β -METIL-XILOSIDA	-	MELEZITOSA	-
GALACTOSA	=	D-RAFINOSA	+
D-GLUCOSA	+	ALMIDÓN	+
D-FRUCTOSA	+	GLICOGENO	+
D-MANOSA	-	XILITOL	-
L-SORBOSA	-	β -GENTIOBIOSA	+
RHAMNOSA	=	D-TURANOSA	+
DULCITOL	-	D-LIXOSA	-
INOSITOL	+	D-TAGATOSA	-
MANITOL	-	D-FUCOSA	-
SORBITOL	-	L-FUCOSA	-
α -METIL-D-MANOSIDA	-	D-ARABITOL	-
α -METIL-D- GLUCOSIDA	-	L-ARABITOL	-
N-ACETIL- GLUCOSAMINA	-	GLUCONATO	-
AMIGDALINA	+	2-CETO-GLUCONATO	-
ARBUTINA	+	5-CETO-GLUCONATO	-
ESCULINA	+		

FIGURA 1

ES 2 185 752 T3

CODIGO DE CEPA: ISB 09

	CODIGO		CODIGO
GLICEROL	+	SALICINA	+
ERITRITOL	-	CELOBIOSA	+
D-ARABINOSA	-	MALTOSA	+
L-ARABINOSA	+	LACTOSA	-
RIBOSA	+	MELIBIOSA	+
D-XILOSA	-	SACAROSA	+
L-XILOSA	-	TREHALOSA	+
ADONITOL	-	INULINA	+
β -METIL-XILOSIDA	-	MELEZITOSA	-
GALACTOSA	-	D-RAFINOSA	+
D-GLUCOSA	+	ALMIDÓN	+
D-FRUCTOSA	+	GLICOGENO	+
D-MANOSA	+	XILITOL	-
L-SORBOSA	-	β -GENTIOBIOSA	+
RHAMNOSA	-	D-TURANOSA	-
DULCITOL	-	D-LIXOSA	-
INOSITOL	+	D-TAGATOSA	-
MANITOL	+	D-FUCOSA	-
SORBITOL	+	L-FUCOSA	-
α -METIL-D-MANOSIDA	-	D-ARABITOL	-
α -METIL-D-GLUCOSIDA	+	L-ARABITOL	-
N-ACETIL-GLUCOSAMINA	-	GLUCONATO	-
AMIGDALINA	+	2-CETO-GLUCONATO	-
ARBUTINA	+	5-CETO-GLUCONATO	-
ESCULINA	+		

FIGURA 2

CODIGO DE CEPA: ISB 12

	CODIGO		CODIGO
GLICEROL	+	SALICINA	+
ERITRITOL	-	CELOBIOSA	+
D-ARABINOSA	-	MALTOSA	+
L-ARABINOSA	+	LACTOSA	+
RIBOSA	+	MELIBIOSA	-
D-XILOSA	+	SACAROSA	+
L-XILOSA	-	TREHALOSA	+
ADONITOL	-	INULINA	-
β -METIL-XILOSIDA	-	MELEZITOSA	-
GALACTOSA	-	D-RAFINOSA	+
D-GLUCOSA	+	ALMIDÓN	+
D-FRUCTOSA	+	GLICOGENO	+
D-MANOSA	+	XILITOL	-
L-SORBOSA	-	β -GENTIOBIOSA	+
RHAMNOSA	-	D-TURANOSA	+
DULCITOL	-	D-LIXOSA	-
INOSITOL	+	D-TAGATOSA	-
MANITOL	+	D-FUCOSA	-
SORBITOL	+	L-FUCOSA	-
α -METIL-D-MANOSIDA	-	D-ARABITOL	-
α -METIL-D- GLUCOSIDA	+	L-ARABITOL	-
N-ACETIL- GLUCOSAMINA	-	GLUCONATO	-
AMIGDALINA	+	2-CETO-GLUCONATO	-
ARBUTINA	+	5-CETO-GLUCONATO	-
ESCULINA	+		

FIGURA 3

CODIGO DE CEPA: ISB 04

	CODIGO		CODIGO
GLICEROL	+	SALICINA	+
ERITRITOL	-	CELOBIOSA	+
D-ARABINOSA	-	MALTOSA	+
L-ARABINOSA	+	LACTOSA	+
RIBOSA	+	MELIBIOSA	+
D-XILOSA	+	SACAROSA	+
L-XILOSA	-	TREHALOSA	+
ADONITOL	-	INULINA	-
β -METIL-XILOSIDA	-	MELEZITOSA	-
GALACTOSA	-	D-RAFINOSA	+
D-GLUCOSA	+	ALMIDÓN	+
D-FRUCTOSA	+	GLICOGENO	+
D-MANOSA	+	XILITOL	-
L-SORBOSA	-	β -GENTIOBIOSA	+
RHAMNOSA	-	D-TURANOSA	+
DULCITOL	-	D-LIXOSA	-
INOSITOL	+	D-TAGATOSA	-
MANITOL	+	D-FUCOSA	-
SORBITOL	+	L-FUCOSA	-
α -METIL-D-MANOSIDA	-	D-ARABITOL	-
α -METIL-D- GLUCOSIDA	+	L-ARABITOL	-
N-ACETIL- GLUCOSAMINA	-	GLUCONATO	-
AMIGDALINA	+	2-CETO-GLUCONATO	-
ARBUTINA	+	5-CETO-GLUCONATO	-
ESCULINA	+		

FIGURA 4

ES 2 185 752 T3

CODIGO DE CEPA: ISB 05

	CODIGO		CODIGO
GLICEROL	+	SALICINA	+
ERITRITOL	-	CELOBIOSA	+
D-ARABINOSA	-	MALTOSA	+
L-ARABINOSA	+	LACTOSA	+
RIBOSA	+	MELIBIOSA	+
D-XILOSA	+	SACAROSA	+
L-XILOSA	-	TREHALOSA	+
ADONITOL	-	INULINA	-
β -METIL-XILOSIDA	+	MELEZITOSA	-
GALACTOSA	-	D-RAFINOSA	+
D-GLUCOSA	+	ALMIDÓN	+
D-FRUCTOSA	+	GLICOGENO	+
D-MANOSA	+	XILITOL	+
L-SORBOSA	-	β -GENTIOBIOSA	+
RHAMNOSA	-	D-TURANOSA	-
DULCITOL	-	D-LIXOSA	-
INOSITOL	+	D-TAGATOSA	-
MANITOL	+	D-FUCOSA	-
SORBITOL	+	L-FUCOSA	-
α -METIL-D-MANOSIDA	-	D-ARABITOL	-
α -METIL-D- GLUCOSIDA	+	L-ARABITOL	-
N-ACETIL- GLUCOSAMINA	+	GLUCONATO	-
AMIGDALINA	+	2-CETO-GLUCONATO	-
ARBUTINA	+	5-CETO-GLUCONATO	-
ESCULINA	+		

FIGURA 5

ES 2 185 752 T3

CODIGO DE CEPA: ISB 06

	CODIGO		CODIGO
GLICEROL	+	SALICINA	+
ERITRITOL	-	CELOBIOSA	+
D-ARABINOSA	-	MALTOSA	+
L-ARABINOSA	+	LACTOSA	+
RIBOSA	-	MELIBIOSA	+
D-XILOSA	-	SACAROSA	+
L-XILOSA	-	TREHALOSA	+
ADONITOL	-	INULINA	-
β -METIL-XILOSIDA	-	MELEZITOSA	-
GALACTOSA	-	D-RAFINOSA	-
D-GLUCOSA	+	ALMIDÓN	+
D-FRUCTOSA	+	GLICOGENO	+
D-MANOSA	+	XILITOL	-
L-SORBOSA	-	β -GENTIOBIOSA	+
RHAMNOSA	-	D-TURANOSA	-
DULCITOL	-	D-LIXOSA	-
INOSITOL	+	D-TAGATOSA	-
MANITOL	+	D-FUCOSA	-
SORBITOL	+	L-FUCOSA	-
α -METIL-D-MANOSIDA	-	D-ARABITOL	-
α -METIL-D-GLUCOSIDA	+	L-ARABITOL	-
N-ACETIL-GLUCOSAMINA	-	GLUCONATO	-
AMIGDALINA	+	2-CETO-GLUCONATO	-
ARBUTINA	+	5-CETO-GLUCONATO	-
ESCULINA	+		

FIGURA 6

ES 2 185 752 T3

CODIGO DE CEPA: ISB 07

	CODIGO		CODIGO
GLICEROL	+	SALICINA	+
ERITRITOL	-	CELOBIOSA	+
D-ARABINOSA	-	MALTOSA	+
L-ARABINOSA	+	LACTOSA	+
RIBOSA	+	MELIBIOSA	-
D-XILOSA	+	SACAROSA	+
L-XILOSA	-	TREHALOSA	+
ADONITOL	-	INULINA	-
β -METIL-XILOSIDA	-	MELEZITOSA	-
GALACTOSA	-	D-RAFINOSA	+
D-GLUCOSA	+	ALMIDÓN	+
D-FRUCTOSA	+	GLICOGENO	+
D-MANOSA	+	XILITOL	-
L-SORBOSA	-	β -GENTIOBIOSA	+
RHAMNOSA	-	D-TURANOSA	-
DULCITOL	-	D-LIXOSA	-
INOSITOL	+	D-TAGATOSA	-
MANITOL	+	D-FUCOSA	-
SORBITOL	+	L-FUCOSA	-
α -METIL-D-MANOSIDA	-	D-ARABITOL	-
α -METIL-D-GLUCOSIDA	+	L-ARABITOL	-
N-ACETIL-GLUCOSAMINA	-	GLUCONATO	-
AMIGDALINA	+	2-CETO-GLUCONATO	-
ARBUTINA	+	5-CETO-GLUCONATO	-
ESCULINA	+		

FIGURA 7

CODIGO DE CEPA: ISB 11

	CODIGO		CODIGO
GLICEROL	+	SALICINA	+
ERITRITOL	-	CELOBIOSA	+
D-ARABINOSA	-	MALTOSA	+
L-ARABINOSA	+	LACTOSA	+
RIBOSA	+	MELIBIOSA	+
D-XILOSA	+	SACAROSA	+
L-XILOSA	-	TREHALOSA	+
ADONITOL	-	INULINA	+
β -METIL-XILOSIDA	+	MELEZITOSA	+
GALACTOSA	+	D-RAFINOSA	+
D-GLUCOSA	+	ALMIDÓN	+
D-FRUCTOSA	+	GLICOGENO	+
D-MANOSA	+	XILITOL	-
L-SORBOSA	-	β -GENTIOBIOSA	+
RHAMNOSA	-	D-TURANOSA	+
DULCITOL	-	D-LIXOSA	-
INOSITOL	-	D-TAGATOSA	-
MANITOL	+	D-FUCOSA	-
SORBITOL	-	L-FUCOSA	-
α -METIL-D-MANOSIDA	-	D-ARABITOL	-
α -METIL-D- GLUCOSIDA	+	L-ARABITOL	-
N-ACETIL- GLUCOSAMINA	+	GLUCONATO	-
AMIGDALINA	+	2-CETO-GLUCONATO	-
ARBUTINA	+	5-CETO-GLUCONATO	-
ESCULINA	+		

FIGURA 8

ES 2 185 752 T3

CODIGO DE CEPAS: ISL 01

	CODIGO		CODIGO
GLICEROL	-	SALICINA	+
ERITRITOL	-	CELOBIOSA	+
D-ARABINOSA	-	MALTOSA	+
L-ARABINOSA	-	LACTOSA	+
RIBOSA	+	MELIBIOSA	-
D-XILOSA	-	SACAROSA	+
L-XILOSA	-	TREHALOSA	+
ADONITOL	-	INULINA	-
β -METIL-XILOSIDA	-	MELEZITOSA	+
GALACTOSA	+	D-RAFINOSA	-
D-GLUCOSA	+	ALMIDÓN	-
D-FRUCTOSA	+	GLICOGENO	-
D-MANOSA	+	XILITOL	-
L-SORBOSA	-	β -GENTIOBIOSA	+
RHAMNOSA	+	D-TURANOSA	+
DULCITOL	-	D-LIXOSA	-
INOSITOL	-	D-TAGATOSA	+
MANITOL	+	D-FUCOSA	-
SORBITOL	+	L-FUCOSA	-
α -METIL-D-MANOSIDA	-	D-ARABITOL	-
α -METIL-D- GLUCOSIDA	+	L-ARABITOL	-
N-ACETIL- GLUCOSAMINA	+	GLUCONATO	+
AMIGDALINA	+	2-CETO-GLUCONATO	-
ARBUTINA	+	5-CETO-GLUCONATO	-
ESCULINA	+		

FIGURA 9

CODIGO DE CEPA: ISL 05

	CODIGO		CODIGO
GLICEROL	-	SALICINA	+
ERITRITOL	-	CELOBIOSA	+
D-ARABINOSA	-	MALTOSA	+
L-ARABINOSA	-	LACTOSA	+
RIBOSA	+	MELIBIOSA	-
D-XILOSA	-	SACAROSA	+
L-XILOSA	-	TREHALOSA	+
ADONITOL	-	INULINA	-
β -METIL-XILOSIDA	-	MELEZITOSA	+
GALACTOSA	+	D-RAFINOSA	-
D-GLUCOSA	+	ALMIDÓN	-
D-FRUCTOSA	+	GLICOGENO	-
D-MANOSA	+	XILITOL	-
L-SORBOSA	+	β -GENTIOBIOSA	+
RHAMNOSA	+	D-TURANOSA	+
DULCITOL	-	D-LIXOSA	-
INOSITOL	+	D-TAGATOSA	+
MANITOL	+	D-FUCOSA	-
SORBITOL	+	L-FUCOSA	-
α -METIL-D-MANOSIDA	-	D-ARABITOL	-
α -METIL-D- GLUCOSIDA	+	L-ARABITOL	-
N-ACETIL- GLUCOSAMINA	+	GLUCONATO	+
AMIGDALINA	+	2-CETO-GLUCONATO	-
ARBUTINA	+	5-CETO-GLUCONATO	-
ESCULINA	+		

FIGURA 10

ES 2 185 752 T3

CODIGO DE CEPA: ISL 10

	CODIGO		CODIGO
GLICEROL	-	SALICINA	+
ERITRITOL	-	CELOBIOSA	+
D-ARABINOSA	-	MALTOSA	+
L-ARABINOSA	-	LACTOSA	+
RIBOSA	+	MELIBIOSA	-
D-XILOSA	-	SACAROSA	+
L-XILOSA	-	TREHALOSA	+
ADONITOL	-	INULINA	-
β -METIL-XILOSIDA	-	MELEZITOSA	+
GALACTOSA	+	D-RAFINOSA	-
D-GLUCOSA	+	ALMIDÓN	-
D-FRUCTOSA	+	GLICOGENO	-
D-MANOSA	+	XILITOL	-
L-SORBOSA	-	β -GENTIOBIOSA	+
RHAMNOSA	+	D-TURANOSA	+
DULCITOL	-	D-LIXOSA	-
INOSITOL	-	D-TAGATOSA	+
MANITOL	+	D-FUCOSA	-
SORBITOL	+	L-FUCOSA	-
α -METIL-D-MANOSIDA	-	D-ARABITOL	-
α -METIL-D- GLUCOSIDA	+	L-ARABITOL	-
N-ACETIL- GLUCOSAMINA	+	GLUCONATO	+
AMIGDALINA	+	2-CETO-GLUCONATO	-
ARBUTINA	+	5-CETO-GLUCONATO	-
ESCULINA	+		

FIGURA 11

ES 2 185 752 T3

CODIGO DE CEPA: ISL 20

	CODIGO		CODIGO
GLICEROL	-	SALICINA	+
ERITRITOL	-	CELOBIOSA	+
D-ARABINOSA	-	MALTOSA	+
L-ARABINOSA	-	LACTOSA	+
RIBOSA	+	MELIBIOSA	-
D-XILOSA	-	SACAROSA	+
L-XILOSA	-	TREHALOSA	+
ADONITOL	-	INULINA	-
β -METIL-XILOSIDA	-	MELEZITOSA	+
GALACTOSA	+	D-RAFINOSA	-
D-GLUCOSA	+	ALMIDÓN	-
D-FRUCTOSA	+	GLICOGENO	-
D-MANOSA	+	XILITOL	-
L-SORBOSA	+	β -GENTIOBIOSA	+
RHAMNOSA	+	D-TURANOSA	+
DULCITOL	-	D-LIXOSA	-
INOSITOL	-	D-TAGATOSA	+
MANITOL	+	D-FUCOSA	-
SORBITOL	+	L-FUCOSA	-
α -METIL-D-MANOSIDA	-	D-ARABITOL	-
α -METIL-D- GLUCOSIDA	+	L-ARABITOL	-
N-ACETIL- GLUCOSAMINA	+	GLUCONATO	+
AMIGDALINA	+	2-CETO-GLUCONATO	-
ARBUTINA	+	5-CETO-GLUCONATO	-
ESCULINA	+		

FIGURA 12

ES 2 185 752 T3

CODIGO DE CEPA: ISL 21

	CODIGO		CODIGO
GLICEROL	-	SALICINA	+
ERITRITOL	-	CELOBIOSA	+
D-ARABINOSA	-	MALTOSA	+
L-ARABINOSA	-	LACTOSA	+
RIBOSA	+	MELIBIOSA	-
D-XILOSA	-	SACAROSA	+
L-XILOSA	-	TREHALOSA	+
ADONITOL	-	INULINA	-
β -METIL-XILOSIDA	-	MELEZITOSA	+
GALACTOSA	+	D-RAFINOSA	-
D-GLUCOSA	+	ALMIDÓN	-
D-FRUCTOSA	+	GLICOGENO	-
D-MANOSA	+	XILITOL	-
L-SORBOSA	+	β -GENTIOBIOSA	+
RHAMNOSA	+	D-TURANOSA	+
DULCITOL	-	D-LIXOSA	-
INOSITOL	-	D-TAGATOSA	+
MANITOL	+	D-FUCOSA	-
SORBITOL	-	L-FUCOSA	-
α -METIL-D-MANOSIDA	-	D-ARABITOL	-
α -METIL-D-GLUCOSIDA	+	L-ARABITOL	-
N-ACETIL-GLUCOSAMINA	+	GLUCONATO	-
AMIGDALINA	+	2-CETO-GLUCONATO	-
ARBUTINA	+	5-CETO-GLUCONATO	-
ESCULINA	+		

FIGURA 13

CODIGO DE CEPA: ISL 25

	CODIGO		CODIGO
GLICEROL	-	SALICINA	+
ERITRITOL	-	CELOBIOSA	+
D-ARABINOSA	-	MALTOSA	+
L-ARABINOSA	-	LACTOSA	+
RIBOSA	+	MELIBIOSA	-
D-XILOSA	-	SACAROSA	+
L-XILOSA	-	TREHALOSA	+
ADONITOL	-	INULINA	-
β -METIL-XILOSIDA	-	MELEZITOSA	+
GALACTOSA	+	D-RAFINOSA	-
D-GLUCOSA	+	ALMIDÓN	-
D-FRUCTOSA	+	GLICOGENO	-
D-MANOSA	+	XILITOL	-
L-SORBOSA	+	β -GENTIOBIOSA	+
RHAMNOSA	+	D-TURANOSA	+
DULCITOL	-	D-LIXOSA	-
INOSITOL	+	D-TAGATOSA	+
MANITOL	+	D-FUCOSA	-
SORBITOL	+	L-FUCOSA	-
α -METIL-D-MANOSIDA	-	D-ARABITOL	-
α -METIL-D- GLUCOSIDA	+	L-ARABITOL	-
N-ACETIL- GLUCOSAMINA	+	GLUCONATO	+
AMIGDALINA	+	2-CETO-GLUCONATO	-
ARBUTINA	+	5-CETO-GLUCONATO	-
ESCULINA	+		

FIGURA 14

ES 2 185 752 T3

CODIGO DE CEPA: ISB 35

	CODIGO		CODIGO
GLICEROL	-	SALICINA	+
ERITRITOL	-	CELOBIOSA	+
D-ARABINOSA	-	MALTOSA	+
L-ARABINOSA	-	LACTOSA	+
RIBOSA	+	MELIBIOSA	+
D-XILOSA	-	SACAROSA	+
L-XILOSA	-	TREHALOSA	+
ADONITOL	-	INULINA	-
β -METIL-XILOSIDA	-	MELEZITOSA	+
GALACTOSA	+	D-RAFINOSA	+
D-GLUCOSA	+	ALMIDÓN	-
D-FRUCTOSA	+	GLICOGENO	-
D-MANOSA	+	XILITOL	-
L-SORBOSA	-	β -GENTIOBIOSA	-
RHAMNOSA	+	D-TURANOSA	-
DULCITOL	-	D-LIXOSA	-
INOSITOL	-	D-TAGATOSA	+
MANITOL	+	D-FUCOSA	-
SORBITOL	+	L-FUCOSA	-
α -METIL-D-MANOSIDA	-	D-ARABITOL	-
α -METIL-D-GLUCOSIDA	+	L-ARABITOL	-
N-ACETIL-GLUCOSAMINA	+	GLUCONATO	+
AMIGDALINA	+	2-CETO-GLUCONATO	-
ARBUTINA	+	5-CETO-GLUCONATO	-
ESCULINA	+		

FIGURA 15

CODIGO DE CEPA: ISL 03

	CODIGO		CODIGO
GLICEROL	-	SALICINA	+
ERITRITOL	-	CELOBIOSA	+
D-ARABINOSA	-	MALTOSA	-
L-ARABINOSA	-	LACTOSA	+
RIBOSA	-	MELIBIOSA	-
D-XILOSA	-	SACAROSA	-
L-XILOSA	-	TREHALOSA	+
ADONITOL	+	INULINA	-
β -METIL-XILOSIDA	-	MELEZITOSA	+
GALACTOSA	+	D-RAFINOSA	-
D-GLUCOSA	+	ALMIDÓN	-
D-FRUCTOSA	+	GLICOGENO	-
D-MANOSA	+	XILITOL	-
L-SORBOSA	-	β -GENTIOBIOSA	+
RHAMNOSA	-	D-TURANOSA	-
DULCITOL	-	D-LIXOSA	-
INOSITOL	-	D-TAGATOSA	+
MANITOL	+	D-FUCOSA	-
SORBITOL	+	L-FUCOSA	-
α -METIL-D-MANOSIDA	-	D-ARABITOL	-
α -METIL-D- GLUCOSIDA	-	L-ARABITOL	-
N-ACETIL- GLUCOSAMINA	+	GLUCONATO	+
AMIGDALINA	+	2-CETO-GLUCONATO	-
ARBUTINA	+	5-CETO-GLUCONATO	-
ESCULINA	+		

FIGURA 16

ES 2 185 752 T3

CODIGO DE CEPA: ISL 27

	CODIGO		CODIGO
GLICEROL	-	SALICINA	+
ERITRITOL	-	CELOBIOSA	+
D-ARABINOSA	-	MALTOSA	+
L-ARABINOSA	-	LACTOSA	+
RIBOSA	-	MELIBIOSA	-
D-XILOSA	-	SACAROSA	-
L-XILOSA	-	TREHALOSA	+
ADONITOL	+	INULINA	-
β -METIL-XILOSIDA	-	MELEZITOSA	+
GALACTOSA	+	D-RAFINOSA	-
D-GLUCOSA	+	ALMIDÓN	-
D-FRUCTOSA	+	GLICOGENO	-
D-MANOSA	+	XILITOL	-
L-SORBOSA	-	β -GENTIOBIOSA	+
RHAMNOSA	-	D-TURANOSA	-
DULCITOL	-	D-LIXOSA	-
INOSITOL	=	D-TAGATOSA	+
MANITOL	+	D-FUCOSA	-
SORBITOL	+	L-FUCOSA	-
α -METIL-D-MANOSIDA	-	D-ARABITOL	-
α -METIL-D- GLUCOSIDA	-	L-ARABITOL	-
N-ACETIL- GLUCOSAMINA	+	GLUCONATO	+
AMIGDALINA	+	2-CETO-GLUCONATO	-
ARBUTINA	+	5-CETO-GLUCONATO	-
ESCULINA	+		

FIGURA 17

CODIGO DE CEPA: ISL 32

	CODIGO		CODIGO
GLICEROL	-	SALICINA	+
ERITRITOL	-	CELOBIOSA	+
D-ARABINOSA	-	MALTOSA	+
L-ARABINOSA	-	LACTOSA	+
RIBOSA	+	MELIBIOSA	-
D-XILOSA	-	SACAROSA	-
L-XILOSA	-	TREHALOSA	+
ADONITOL	+	INULINA	-
β -METIL-XILOSIDA	-	MELEZITOSA	+
GALACTOSA	+	D-RAFINOSA	-
D-GLUCOSA	+	ALMIDÓN	-
D-FRUCTOSA	+	GLICOGENO	-
D-MANOSA	+	XILITOL	-
L-SORBOSA	-	β -GENTIOBIOSA	+
RHAMNOSA	-	D-TURANOSA	-
DULCITOL	-	D-LIXOSA	-
INOSITOL	-	D-TAGATOSA	+
MANITOL	+	D-FUCOSA	-
SORBITOL	+	L-FUCOSA	-
α -METIL-D-MANOSIDA	-	D-ARABITOL	-
α -METIL-D- GLUCOSIDA	-	L-ARABITOL	-
N-ACETIL- GLUCOSAMINA	-	GLUCONATO	+
AMIGDALINA	+	2-CETO-GLUCONATO	-
ARBUTINA	+	5-CETO-GLUCONATO	-
ESCULINA	+		

FIGURA 18

ES 2 185 752 T3

CODIGO DE CEPA: ISL 44

	CODIGO		CODIGO
GLICEROL	-	SALICINA	+
ERITRITOL	-	CELOBIOSA	+
D-ARABINOSA	-	MALTOSA	+
L-ARABINOSA	-	LACTOSA	+
RIBOSA	-	MELIBIOSA	-
D-XILOSA	-	SACAROSA	+
L-XILOSA	-	TREHALOSA	+
ADONITOL		INULINA	-
β -METIL-XILOSIDA	-	MELEZITOSA	-
GALACTOSA	+	D-RAFINOSA	-
D-GLUCOSA	+	ALMIDÓN	-
D-FRUCTOSA	+	GLICOGENO	-
D-MANOSA	+	XILITOL	-
L-SORBOSA	-	β -GENTIOBIOSA	+
RHAMNOSA	-	D-TURANOSA	+
DULCITOL	-	D-LIXOSA	-
INOSITOL	-	D-TAGATOSA	+
MANITOL	-	D-FUCOSA	-
SORBITOL	-	L-FUCOSA	-
α -METIL-D-MANOSIDA	-	D-ARABITOL	-
α -METIL-D- GLUCOSIDA	-	L-ARABITOL	-
N-ACETIL- GLUCOSAMINA	+	GLUCONATO	-
AMIGDALINA	+	2-CETO-GLUCONATO	-
ARBUTINA	+	5-CETO-GLUCONATO	-
ESCULINA	+		

FIGURA 19

ES 2 185 752 T3

CODIGO DE CEPA: ISL 102

	CODIGO		CODIGO
GLICEROL	-	SALICINA	-
ERITRITOL	-	CELOBIOSA	-
D-ARABINOSA	-	MALTOSA	+
L-ARABINOSA	+	LACTOSA	-
RIBOSA	+	MELIBIOSA	-
D-XILOSA	-	SACAROSA	+
L-XILOSA	-	TREHALOSA	-
ADONITOL	-	INULINA	-
β -METIL-XILOSIDA	-	MELEZITOSA	-
GALACTOSA	+	D-RAFINOSA	+
D-GLUCOSA	+	ALMIDÓN	-
D-FRUCTOSA	+	GLICOGENO	-
D-MANOSA	-	XILITOL	-
L-SORBOSA	-	β -GENTIOBIOSA	-
RHAMNOSA	-	D-TURANOSA	-
DULCITOL	-	D-LIXOSA	-
INOSITOL	-	D-TAGATOSA	-
MANITOL	-	D-FUCOSA	-
SORBITOL	-	L-FUCOSA	-
α -METIL-D-MANOSIDA	-	D-ARABITOL	-
α -METIL-D-GLUCOSIDA	-	L-ARABITOL	-
N-ACETIL-GLUCOSAMINA	-	GLUCONATO	+
AMIGDALINA	-	2-CETO-GLUCONATO	-
ARBUTINA	-	5-CETO-GLUCONATO	-
ESCULINA	-		

FIGURA 20

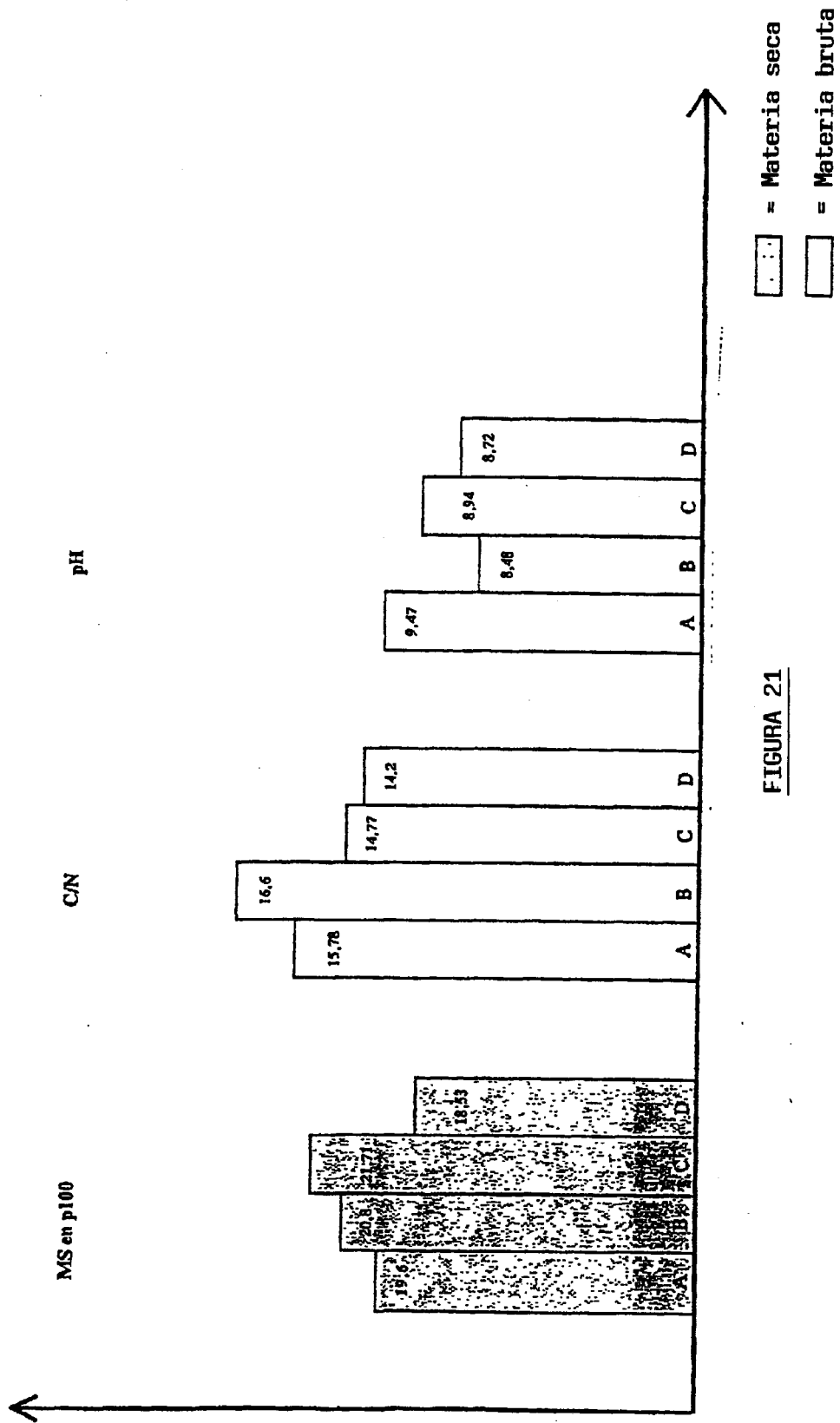


FIGURA 21

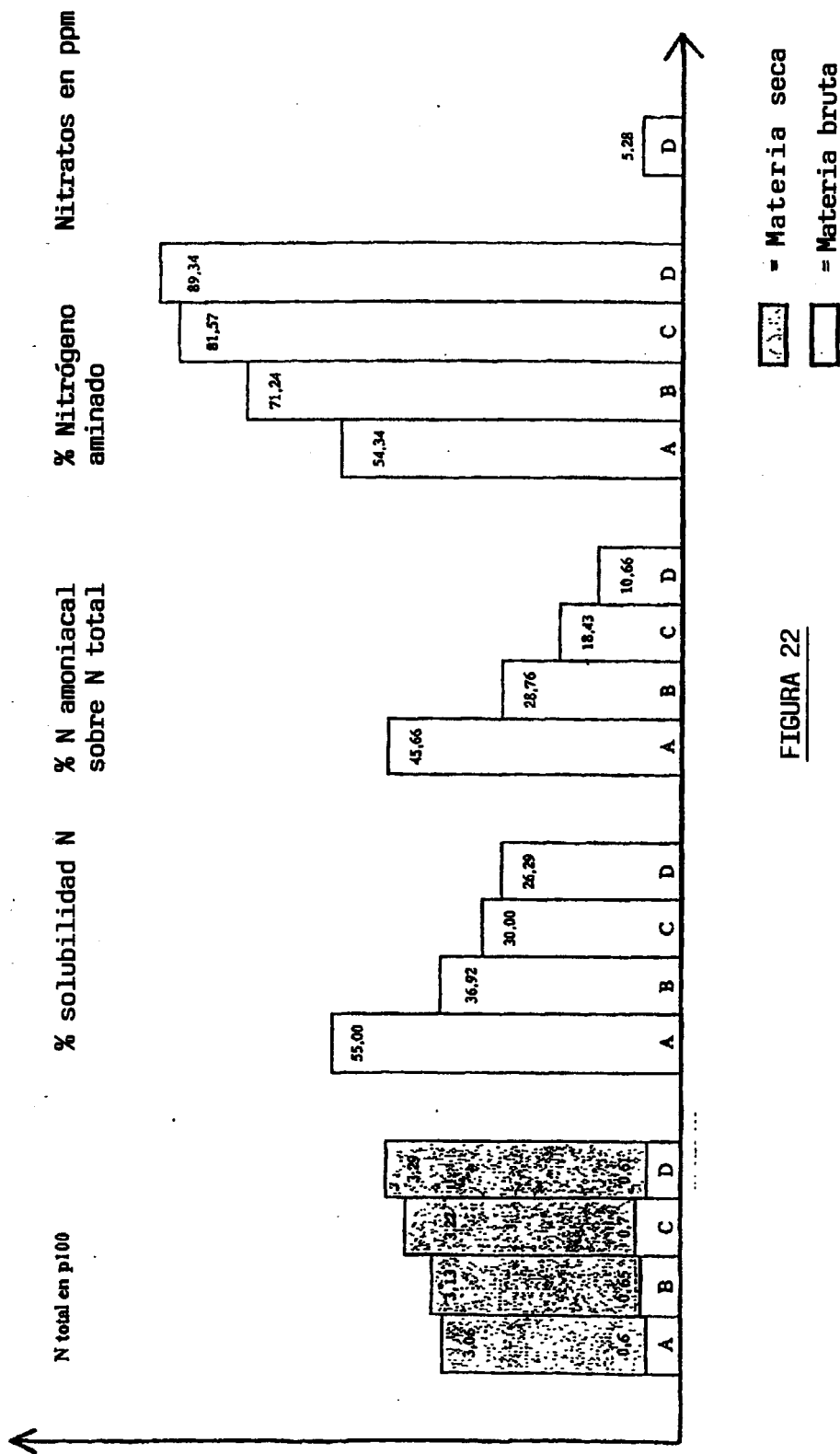
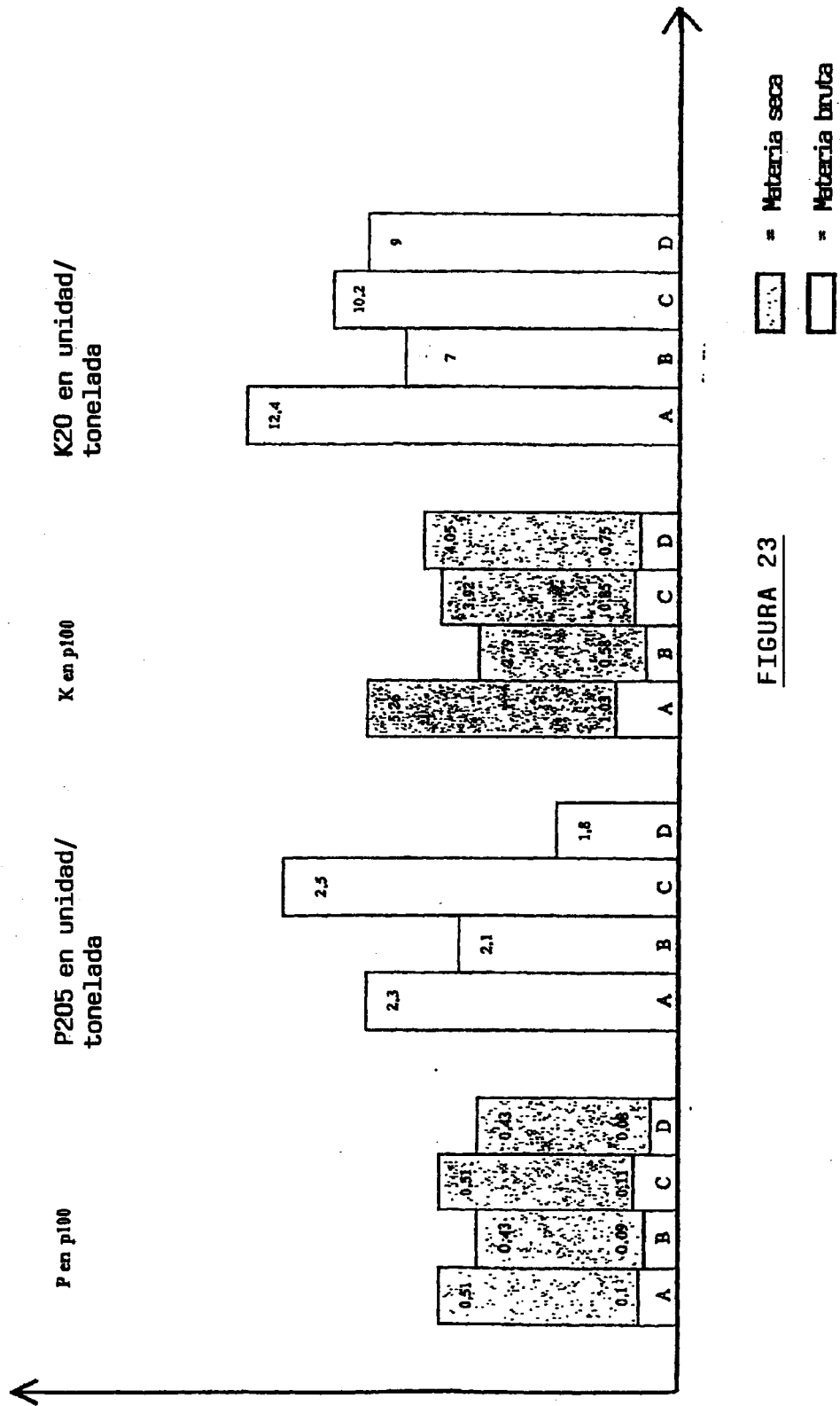


FIGURA 22



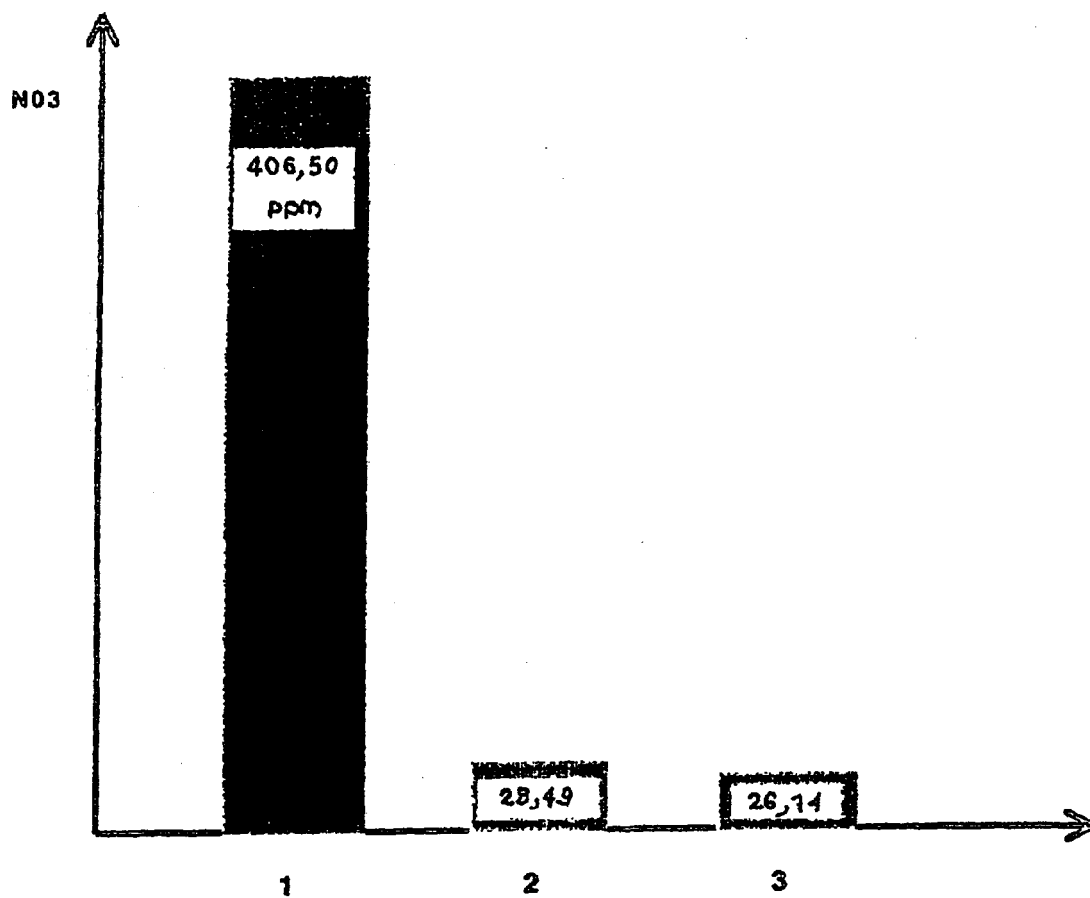


FIGURA 24

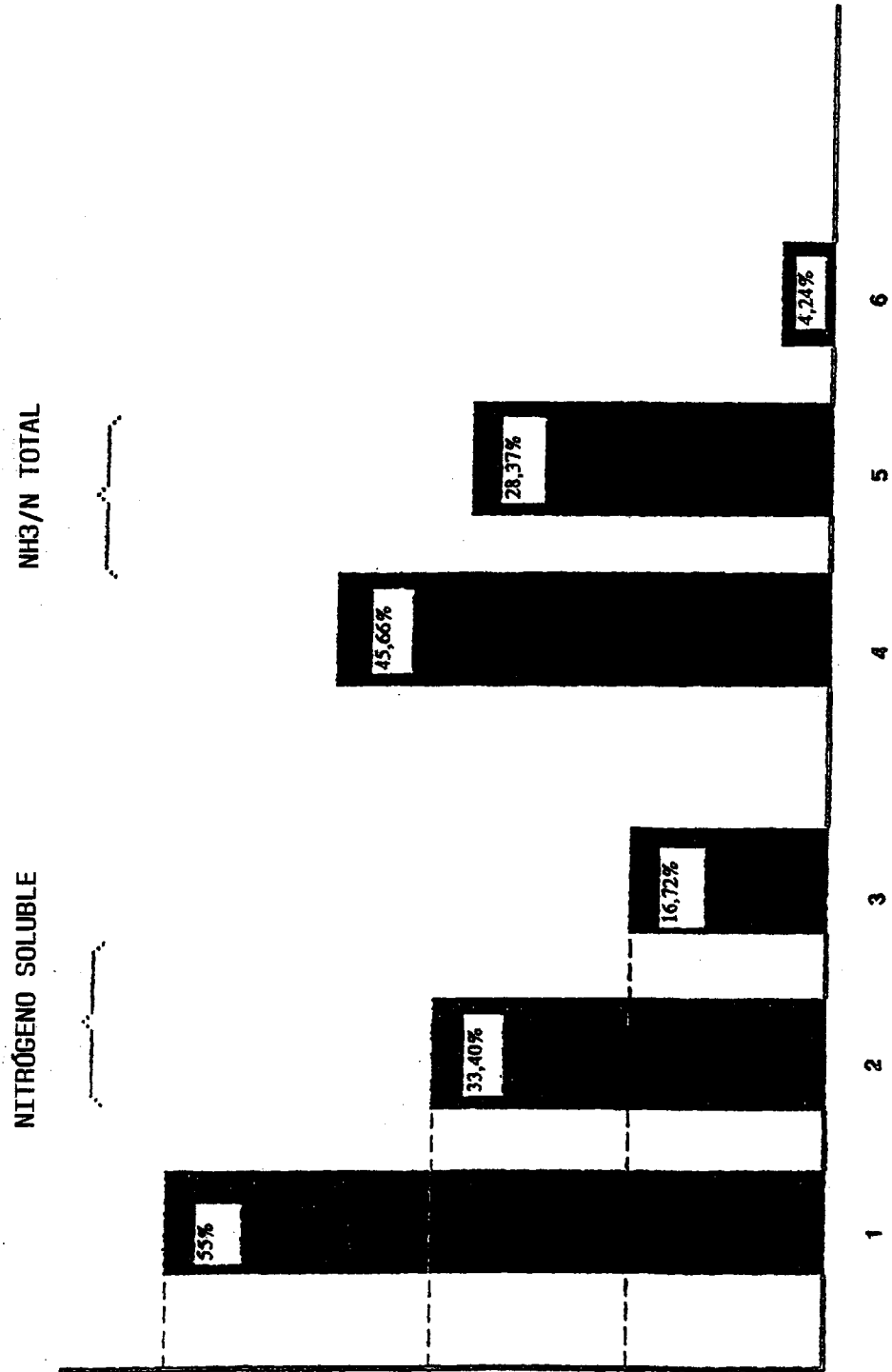
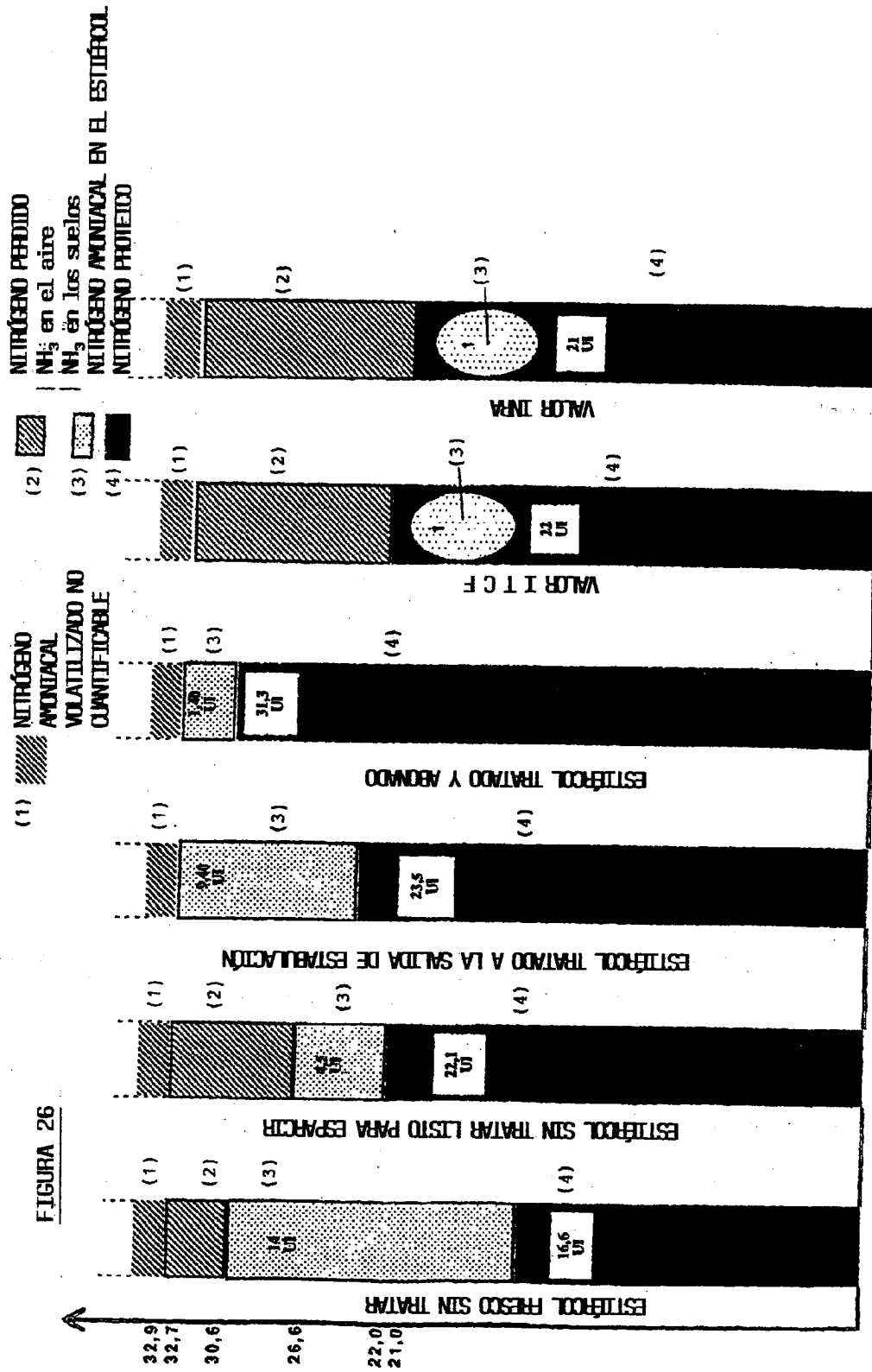
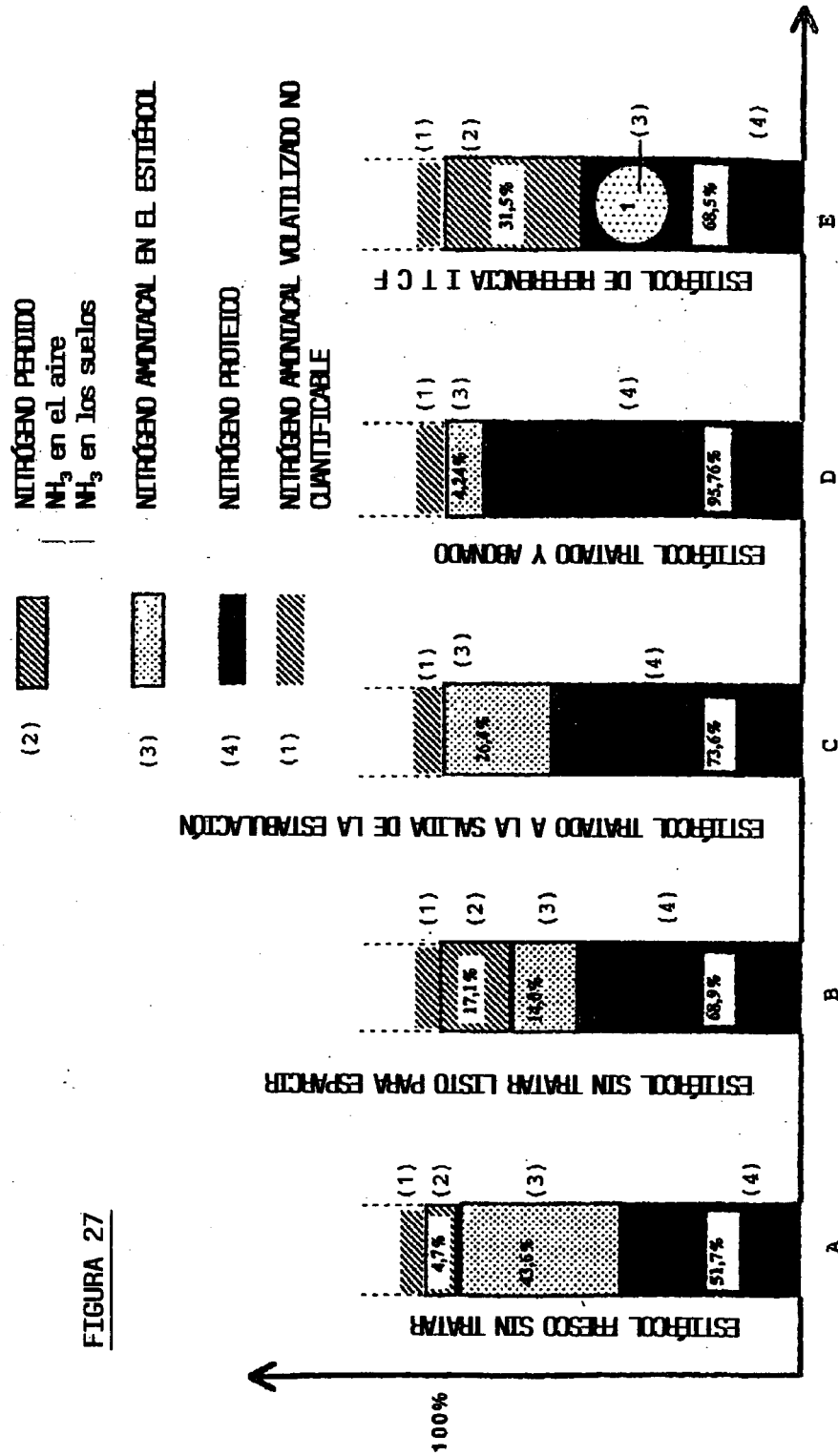
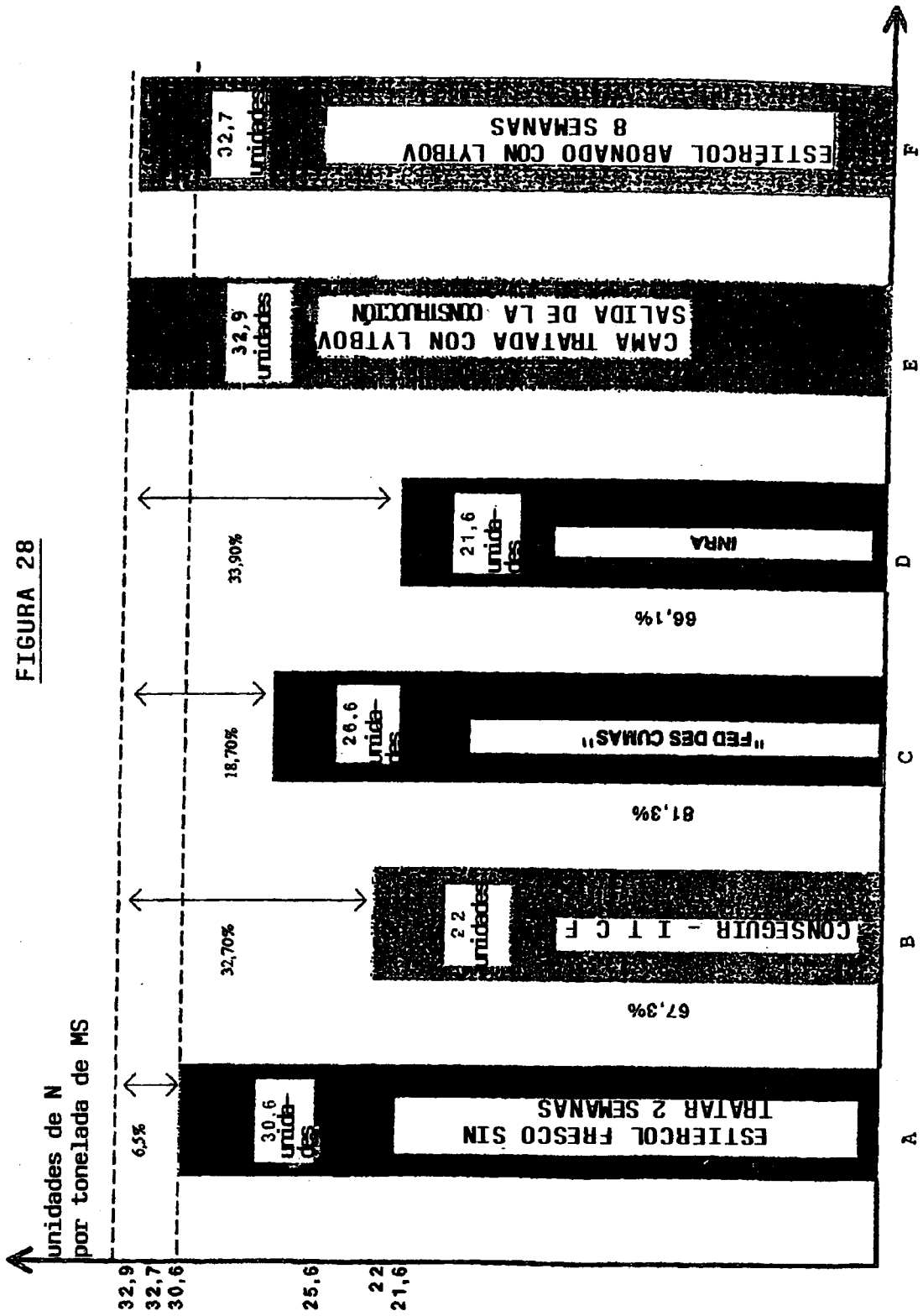


FIGURA 25







ES 2 185 752 T3

CODIGO DE CEPA: ICP 01

Identificación propuesta: PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS

PERFIL API 50 CH

(caracteres positivos después de 48 horas de máximo de incubación)

El orden elegido es el de la galería

FUENTE DE CARBONO	Respuesta	FUENTE DE CARBONO	Respuesta
GLICEROL	-	SALICINA	+
ERITRITOL	-	CELOBIOSA	+
D-ARABINOSA	-	MALTOSA	+
L-ARABINOSA	+	LACTOSA	-
RIBOSA	+	MELIBIOSA	-
D-XILOSA	-	SACAROSA	-
L-XILOSA	-	TREHALOSA	+
ADONITOL	-	INULINA	-
β -METIL-XILOSIDA	-	MELEZITOSA	-
GALACTOSA	+	D-RAFINOSA	-
D-GLUCOSA	+	ALMIDÓN	-
D-FRUCTOSA	+	GLICOGENO	-
D-MANOSA	+	XILITOL	-
L-SORBOSA	-	β -GENTIOBIOSA	+
RHAMNOSA	+v	D-TURANOSA	-
DULCITOL	-	D-LIXOSA	-
INOSITOL	-	D-TAGATOSA	+
MANITOL	-	D-FUCOSA	-
SORBITOL	-	L-FUCOSA	-
α -METIL-D-MANOSIDA	-	D-ARABITOL	-
α -METIL-D-GLUCOSIDA	-	L-ARABITOL	-
N-ACETIL-GLUCOSAMINA	+	GLUCONATO	-
AMIGDALINA	+	2-CETO-GLUCONATO	-
ARBUTINA	+	5-CETO-GLUCONATO	-
ESCULINA	+		

NB: +v señala una respuesta irregular en este carácter (4 galerías realizadas después de varias transferencias sucesivas del mismo cultivo y comprobación de la pureza)

FIGURA 29