



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 334 147**

51 Int. Cl.:
C12N 1/20 (2006.01)
C05F 17/00 (2006.01)
C12R 1/11 (2006.01)
C12R 1/125 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05381022 .2**
96 Fecha de presentación : **11.05.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1721966**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.11.2006**

54 Título: **Cepa bacteriana y composición utilizada para acelerar el compostaje y como fertilizante.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.03.2010

73 Titular/es: **TRICHODEX, S.A.**
Polígono Industrial La Isla
Avda. Río Viejo, Parc. 44-45
41700 Dos Hermanas, Sevilla, ES

72 Inventor/es: **Pérez Barrera, Francisco;**
Expósito Cubero, Carmelo;
Gomis García, M. Dolores y
Akti, Khalid

74 Agente: **Esteban Pérez-Serrano, María Isabel**

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

Cepa bacteriana y composición utilizada para acelerar el compostaje y como fertilizante.

5 Objeto de la invención

La presente invención se refiere al desarrollo de una composición basada en microorganismos naturales, capaz de acelerar el proceso de compostaje de residuos orgánicos agrícolas, residuos orgánicos sólidos y lodo a partir de estaciones de purificación de aguas residuales entre otras cosas, así como de usarse como un fertilizante.

10 La presente invención se refiere al enriquecimiento de los residuos con una población microbiana beneficiosa que puede intervenir en, acelerar y completar el proceso de descomposición en un tiempo óptimo, así como la descomposición de los componentes volátiles (subproductos de azufre, aminas y ácidos grasos) responsables del mal olor.

15 La composición de la presente invención aumenta el número de microorganismos presentes de manera natural para descomponer el residuo orgánico. Las cepas bacterianas usadas en la composición de esta invención, gracias a la creación de una batería de enzimas extracelulares, son capaces de descomponer las cadenas moleculares relativamente grandes (proteínas, carbohidratos y grasas) convirtiéndolas en productos más solubles y asimilables.

20 Además, la composición también se puede usar como un fertilizante.

El solicitante de la presente invención ha aislado nuevas cepas que pertenecen a las especies de *Bacillus megaterium* y *Bacillus subtilis*.

25 La invención se caracteriza por una composición para acelerar los procesos de compostaje que al menos comprende las dos cepas aisladas la primera vez, así como su uso para acelerar los procesos de fermentación y como un fertilizante.

30 Antecedentes de la invención

Los residuos que se producen de las actividades agrícolas e industriales, así como los residuos sólidos municipales y los lodos de aguas residuales, están estrechamente relacionados con la contaminación ambiental.

35 Actualmente, la gestión de estos residuos está controlada por directivas y normas destinadas a determinar las condiciones en las que se debe tratar el residuo, así como sus aplicaciones e incidencia sobre el medio ambiente, cultivos, criaturas vivas y salud en general. Un aspecto central de estas directivas es la prohibición de uso de dichos residuos sin un tratamiento previo. Un ejemplo de este Plan Nacional para la gestión de residuos, emitido por la secretaria General para el Medio Ambiente, que establece la gestión apropiada de residuos y establece la estructura legal para su correcta evaluación y reciclado, de acuerdo con la ley Europea y Española. El objeto del Plan es proteger el medio ambiente, particularmente la calidad del terreno, mediante la gestión apropiada de los residuos.

40 El plan sigue el principio jerárquico considerado en la Ley de Residuos de 1998, que requiere el reciclado de residuos tanto como sea posible esto es, haciendo uso completo de esta materia antes de usar la energía contenida en ella. Ésto implica priorizar compostaje en todas sus variedades.

45 El proceso de compostaje implica una transformación microbiana en condiciones aerobias de materia orgánica. Este proceso requiere un sustrato sólido sobre el que actúan diversas poblaciones de microorganismos (bacterias, actinomicetos y hongos) responsables de la descomposición de la materia orgánica, para producir un producto orgánico estabilizado que se puede usar en agricultura para mejorar el suelo.

El compostaje de residuos llega a ser la mejor opción para eliminarlos, solucionando un problema financiero y de salud proporcionándolos un valor y objeto.

55 La inoculación de residuos que van a formar compost con una biomasa microbiana es una estrategia de vital importancia para acelerar estos procesos.

60 Esta estrategia consiste en la adición de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) a los residuos orgánicos. Estos microorganismos se pueden usar a partir de residuos o a partir de otra parte, y se seleccionan por sus propiedades especiales de acelerar el proceso de compostaje y terminarlo de manera exitosa.

65 La estrategia comienza mediante una caracterización exhaustiva de los microorganismos en la inoculación en el laboratorio. Vargas-García y col. han estudiado la capacidad de seis cepas de hongos ligno-celulíticos para crecer en residuos agrícolas y para producir inóculos para el compostaje. (Vargas-García, M.C., López, M.J., Suárez, F. y Moreno, J. (2005), Laboratory study of inocula production for composting processes. Bioresource Technology, 96: 797-803).

Además, Lei y VanderGheynst han estudiado el efecto de la inoculación con microorganismos y pH sobre la población microbiana durante el proceso de compostaje (Lei, F. y VanderGheynst, J.S., (2000). The effects of microbial inoculation and pH on microbial community structure changes during composting. *Process Biochemistry*, 35: 923-929).

La patente con número de publicación JP2003009848 describe un procedimiento para descomponer materia orgánica que usa *Bacillus subtilis* entre otros microorganismos.

En vista de lo anterior, el solicitante ha desarrollado composiciones basadas en microorganismos naturales, particularmente bacterias, que además de enriquecer los sustratos con una población de microorganismos beneficiosos son capaces de participar y acelerar el proceso de compostaje en períodos óptimos, así como reducir el trabajo del proceso de compostaje y permitir su uso como un fertilizante.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere al aislamiento de una cepa bacteria, una composición que acelera el proceso de compostaje y el uso que se hace de ella.

La composición de la presente invención incluye al menos dos cepas, aisladas por el mismo solicitante.

Estas cepas se aislaron y se seleccionaron a partir de muestras de suelo obtenidas de áreas alrededor de plantas sanas y huéspedes, tomadas de diferentes áreas geográficas; específicamente, se han aislado de raíces de cebolla.

Estas cepas se han depositado para propósitos de patente en la Colección Española de Cultivos Tipo (*Colección Española de Cultivos Tipo, CECT*) el 27 de julio de 2004, con los siguientes números asignados a ellas: AMCB1, CECT 7012 y AMCB3, CECT 7014.

Las cepas aisladas se mantuvieron con una alta tasa de supervivencia en una solución de glicerol al 25% y se almacenaron a -80°C. Las cepas se recuperaron fácilmente en medios de cultivo de laboratorio normales tales como agar nutricional (NA), caldo nutricional (NB), agar tripton-soja (TSA) y agar patata-dextrosa (PDA).

Se llevaron a cabo un número de ensayos para caracterizar las cepas.

Se estudió su crecimiento en medios sólidos tales como TY (triptona-levadura), agar nutricional (NA) e YM (levadura manitol). En todos los casos el microorganismo que creció más rápido (14 h) fue AMCB1.

Se realizaron ensayos bioquímicos cinco veces para establecer un análisis fiable de las bacterias con respecto a su crecimiento y comportamiento con diferentes reactivos.

Ambas cepas AMCB1 y AMCB3 mostraron resultados positivos al ponerse a prueba en el ensayo para la enzima catalasa.

En el ensayo para la enzima oxidasa la cepa AMCB1 mostró resultado negativo al ponerse a prueba y AMCB3 dio un resultado variable.

También se estudió la capacidad para reducir nitratos y nitritos.

Un resultado positivo en este ensayo significa que el microorganismo puede usar nitrógeno en cualquier estado de oxidación, pero siempre se asimila como ion amonio. Específicamente, para las cepas en estudio el resultado fue negativo para AMCB1 y positivo para AMCB3. La cepa AMCB3 presenta enzima nitrato reductasa pero no nitrito reductasa.

También se determinó la capacidad de hidrolizar urea. El resultado fue positivo pero débil para AMCB1 y negativo para AMCB3.

La actividad de PGPR (Rizobacterias Promotoras de Crecimiento de Plantas) de las cepas objeto de esta patente se estudió por su crecimiento en diferentes medios: ACC (1-amino-ciclopropan-1-carboxilato), MLACC (medio que carece de 1-amino-ciclopropan-1-carboxilato), PDYA (agar patata-dextrosa-levadura), también se determinó la producción de siderofora y la capacidad de producir auxinas.

Los resultados obtenidos parecen indicar que las cepas AMCB1 y AMCB3 tienen una buena actividad de PGPR, ya que eran capaces de crecer en todos los medios excepto en el único con siderofora y presentaban una mayor producción de auxinas. Por lo tanto, pueden ejercer una influencia beneficiosa sobre la planta tanto directamente, mejorando su nutrición mediante la solubilización de fosfatos en el medio, como indirectamente mediante la actividad de la enzima ACC desaminasa, que provoca una reducción en los niveles de etileno de la planta que da como resultado un incremento en la longitud de las raíces.

ES 2 334 147 T3

Se estudió individualmente el perfil de ácidos grasos de las diversas cepas bacterianas, de acuerdo con el protocolo descrito por Jarvis (1994) y Sasser (1990).

5 Las cepas AMCB1 y AMCB3 muestran gran variabilidad en la composición de ácidos grasos, así como muestran contener ácidos grasos del tipo 18:2w6 o 17:1w8 característicos de especies de Bacillus entre otras.

Se llevaron a cabo estudios sobre la asimilación de fuentes de carbono "Biolog".

10 La cepa AMCB3 muestra un bajo uso de glucógeno, mientras AMCB1 muestra un alto uso de glucógeno, con un moderado uso de los polímeros que quedan.

Con respecto al uso de carbohidratos, i-eritritol producía un compuesto en el que las cepas crecían muy poco o nada.

15 Como con los resultados para el glucógeno, la cepa AMCB1 muestra el mayor crecimiento en todos los medios con precursores de glucosa. AMCB3 crecía bien solamente en la presencia de ácido D-galacturónico y metiléster pirúvico.

20 Con respecto al comportamiento con aminoácidos, la cepa AMCB3 mostró el mayor requerimiento para ellos y creció muy bien en su presencia.

Con relación al uso de aminas, solamente AMCB1 presentaba una capacidad para usarlas de manera significativa, aunque no mostró un crecimiento alto con etilamina.

25 Los compuestos fenólicos no fueron usados por ninguna de las dos cepas.

Las cepas AMCB1 y AMCB2 se caracterizaron genéticamente.

La secuenciación de ARNr 16S: AMCB1

30

**GCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAG
CTT**

35

**GCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACC
TGC**

40

**CTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAG
GAT**

45

**CTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTA
CA**

**GATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGG**

50

**CAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT
GAG**

**ACACGGCCCANACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCA
ATG**

55

**GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGT
CGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCTTG**

TA

60

65

ES 2 334 147 T3

CCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGTAACTACGTGCCAGCA
GCC
GTGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAA
5 AGC
GCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAAC
CGT
10 GGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAGTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGA
A
TTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGT
GGC
15 GAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTG
GGG
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG
20 TGC
TAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA
GC
ACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACG
25 GGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC
GAA
GAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACTCTAGAGATAGAGCG
30 TT
CCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT
CGT
35 GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATC
TTA
GTTGCCAGCATTNAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCG
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGG
40 GCT
ACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAG
GTCA
45 AGCCAATCCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTC
GC
CTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGG
TGA
50 ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGT
AACACCCGAAGTCGGTGGAGTAACCGTAAGGAGCTAGCCGCCTAAG
GTGG GACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCG

55 Después de los resultados obtenidos con la secuenciación de ARNr 16S, la cepa AMCB1 se identificó como *Bacillus megaterium*.

60

65

ES 2 334 147 T3

Secuenciación de ARNr 16S: AMCB3

5 **GGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCT**
 GATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTA
 AGA
10 **CTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTNTGA**
 ACC
 GCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGG
15 **ACC**
 CGCGGCGCATTANCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCNACG
 ATG
20 **CGTANCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC**
 C
 CANACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA
 AAG
25 **TCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAA**
 AGC
 TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTT
30 **GAC**
 GGTACCTAACCAGAAAGCCACGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
 TAA
35 **TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCA**
 GGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAG
 GGT
40 **CATTGGAAACTGGGGAAC TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCC**
 ACG
 TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCCGAA
 GGCG
45 **ACTCTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCG**

50

55

60

65

AAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAGTGCTAAGTGT
5 **TAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC**
GC
CTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
10 **GCCC**
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAAC
CTT
15 **ACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAAGATAGGACGTCCCCT**
TC
GGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAG
20 **ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCC**
AG
CATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA
25 **AGG**
TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC
GT
30 **GCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCC**
AATC
35 **CCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGA**
AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG
TTC
40 **CCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACAC**
CCG
AAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCGAAGGTGGGACA
45 **GAT GATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCC**

En vista de los resultados obtenidos, la cepa AMCB3 se identificó como *Bacillus subtilis*.

50 De acuerdo con lo anterior, los solicitantes de la presente invención aislaron dos cepas, AMCB1 y AMCB3, que pertenecen a las especies *Bacillus megaterium* y *Bacillus subtilis* respectivamente y que son aceleradoras de los procesos de compostaje.

55 Del mismo modo, la invención se refiere a composiciones que incluyen diversas combinaciones de estas cepas y/u otras cepas que son compatibles.

Específicamente, se refiere a una cepa que contiene al menos la cepa bacteriana de *Bacillus megaterium* AMCB1 junto con la cepa bacteriana *Bacillus subtilis* AMCB3, que son aceleradoras de los procesos de compostaje.

60 También se refiere a una composición que contiene al menos la cepa bacteriana *Bacillus megaterium* AMCB1 y la cepa bacteriana *Bacillus subtilis* AMCB3, que son aceleradoras de los procesos de compostaje, y/o la cepa *Azospirillum brasilense*; y/o *Azotobacter chroococcum* y/o *Saccharomyces cerevisiae*, conjuntamente con una reserva nutricional.

65 Las composiciones se pueden aplicar en forma sólida o líquida incluyendo coadyuvantes tales como agentes emulsionantes y agentes de resuspensión.

ES 2 334 147 T3

Las composiciones sólidas pueden estar en forma de polvo, gránulos o polvo humectable, mientras que las composiciones líquidas pueden estar en forma de soluciones, suspensiones, dispersiones, o formulaciones concentradas acuosas o no acuosas.

5 La concentración preferida de microorganismos en la formulación sólida debe estar entre 10^3 y 10^9 unidades formadoras de colonia por gramo (CFU/g), preferentemente entre 10^5 y 10^7 CFU/g. La concentración preferida de microorganismos en la formulación líquida debe estar entre 10^3 y 10^9 unidades formadoras de colonia por mililitro (CFU/ml), preferentemente entre 10^5 y 10^7 CFU/ml. Sin embargo, estos intervalos pueden variar de acuerdo con el residuo a tratar, entre otros factores.

10 En estas formulaciones el “portador” o vehículo constituye una reserva nutricional para los microorganismos, así como les proporciona la protección requerida para una mayor supervivencia para colonizar el residuo en cuestión.

15 El éxito en la producción de una biomasa importante de los diversos microorganismos depende del desarrollo de un medio adecuado, que puede ser un subproducto agrícola barato, fácilmente obtenible y con el equilibrio de nutrientes adecuado.

20 El uso de la biomasa vegetal en los procesos de fermentación como una fuente de energía renovable y materia prima para la industria es uno de los campos de mayor interés en biotecnología. Dentro de la biomasa vegetal, los residuos agrícolas constituyen el material lignocelulósico más adecuado debido a su bajo coste y alta disponibilidad. Estos sustratos incluyen melazas, harina de semillas (algodón, soja, etc.), heno, trigo, maíz, cebada, etc.

25 Al final de un proceso de fermentación líquida o sólida, la biomasa se recoge al mismo tiempo que el sustrato, proporcionando el último protección física y una base nutricional para el microorganismo.

La composición de la invención también se puede usar como un fertilizante debido a la buena actividad de PGPR mostrada por las cepas AMCB1 y AMCB3.

Descripción de los dibujos

30 La presente memoria descriptiva se completa mediante un conjunto de dibujos que ilustran el ejemplo preferido y no limitan de ninguna manera la invención.

35 La Figura 1 muestra los cromatogramas de iones totales emparejados (TIC) de los productos de pirólisis obtenidos por desorción térmica y pirólisis ultrarrápida a 300°C que resultan del análisis de muestras de compost de un montón de control (A) y del montón tratado (B) en el primer ejemplo de realización. Se representa gráficamente la abundancia frente al tiempo en minutos.

40 La Figura 2 muestra los cromatogramas de iones totales emparejados (TIC) de los productos obtenidos por pirólisis a 500°C que resultan del análisis de las muestras de compost del montón de control (A) y del montón tratado (B) en el primer ejemplo de realización. Se representa gráficamente la abundancia frente al tiempo en minutos.

45 La Figura 3 muestra los cromatogramas de iones totales emparejados (TIC) de los productos obtenidos por pirólisis directa a 500°C que resultan del análisis de las muestras de compost del montón de control (A) y del montón tratado (B) en el primer ejemplo de realización. Se representa gráficamente la abundancia frente al tiempo en minutos.

50 La Figura 4 muestra los cromatogramas de iones totales emparejados (TIC) de los productos de pirólisis obtenidos por desorción térmica y pirólisis ultrarrápida a 300°C que resultan del análisis de muestras de compost del caballón de control (C) y del caballón tratado (D) en el segundo ejemplo de realización. Se representa gráficamente la abundancia frente al tiempo en minutos.

55 La Figura 5 muestra los cromatogramas de iones totales de los productos obtenidos por pirólisis ultrarrápida a 500°C para el segundo ejemplo de realización para tanto el caballón de control (C) como el caballón tratado (D). Se representa gráficamente la abundancia frente al tiempo en minutos.

La Figura 6 muestra un ensayo de reproducibilidad para los resultados del segundo ejemplo de realización. Se representa gráficamente la abundancia frente al tiempo en minutos.

60 La Figura 7 muestra los cromatogramas de iones totales (TIC) de los productos de pirólisis obtenidos por desorción térmica y pirólisis ultrarrápida a 300°C que resultan del análisis de muestras de compost del caballón de control (E) y los caballones tratados (F, G) en el tercer ejemplo de realización. Se representa gráficamente la abundancia frente al tiempo en minutos.

65 La Figura 8 muestra los cromatogramas de iones totales (TIC) de los productos de pirólisis obtenidos por desorción térmica y pirólisis ultrarrápida a 500°C que resultan del análisis de muestras de compost del caballón de control (E) y los caballones tratados (F, G) para el tercer ejemplo de realización. Se representa gráficamente la abundancia frente al tiempo en minutos.

ES 2 334 147 T3

La Figura 9 muestra una comparación de los pirogramas para el compost control (parte superior) y el compost tratado (I) recogido en mayo (parte inferior). Se representa gráficamente la abundancia frente al tiempo en minutos.

La Figura 10 muestra una comparación de los pirogramas para el compost control (parte superior) y el compost tratado (I) recogido en junio (parte inferior). Se representa gráficamente la abundancia frente al tiempo en minutos.

La Figura 11 muestra una comparación de los pirogramas del compost control (parte superior) y el compost tratado (J) recogido en mayo (parte inferior). Se representa gráficamente la abundancia frente al tiempo en minutos.

La Figura 12 muestra una comparación de los pirogramas para el compost control (parte superior) y el compost tratado (J) recogido en junio (parte inferior). Se representa gráficamente la abundancia frente al tiempo en minutos.

Realización preferida de la invención

En vista de lo anterior, la presente invención consta de una composición para acelerar los procesos de compostaje.

En un ejemplo de la realización, la presente invención proporciona una formulación líquida con la siguiente composición cuantitativa:

20	Melazas	40 - 100 g/l
	Mn AEDT	40 - 100 g/l
25	Zn AEDT	0,1 - 40 g/l
	Fe AEDT	50 - 200 g/l
	Molibdato de sodio	0,1 - 1 g/l
30	Ácido bórico	0,1- 1 g/l
	pH	6,5 - 7,5

35 cepas de las especies *Bacillus megaterium* AMCB1 (CECT 7012);
Bacillus subtilis AMCB3 (CECT 7014); *Azospirillum brasilense*;
40 *Azotobacter chroococcum* y / o *Saccharomyces cerevisiae*.

En otro ejemplo de la realización, la presente invención proporciona una formulación sólida compuesta por un soporte sólido y una combinación de componentes biológicos, con la siguiente composición cuantitativa:

45	Proteína bruta	10 - 50 %
	Materia grasa bruta	10 - 30 %
50	Celulosa	1 - 10%
	Lactosa	10 - 60 %
55	Sulfato ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5 - 20 mg/Kg
	pH	6,5 - 7,5

60 cepas que pertenecen a otras especies *Bacillus megaterium* AMCB1
(CECT 7012); *Bacillus subtilis* AMCB3 (CECT 7014); *Azospirillum*
brasilense; *Azotobacter chroococcum* y / o *Saccharomyces cerevisiae*.

65

ES 2 334 147 T3

Ejemplo 1

Un primer ejemplo de la invención estudia la aplicación de la composición líquida durante el proceso de compostaje del lodo de la estación de purificación de aguas residuales, para ensayar su eficacia en acelerar el proceso y reducir las tareas de operación del proceso (volteos).

El ensayo se realizó en la planta de compostaje de biosólidos de la compañía EMASESA, localizada en la estación de purificación de aguas residuales del sur (Copero, provincia de Sevilla) el 24 de septiembre de 2004.

La material prima usada en esta experiencia es lodo obtenido de las estaciones de purificación de aguas residuales municipales de la compañía EMASESA.

Después que se reciben los biosólidos se vierten en los controles de secado, se extienden mediante palas de carga y se exponen a secado natural hasta que su nivel de humedad sea del 40-50% (la humedad óptima para la actuación de los microorganismos).

Después que se alcanza la humedad óptima el material extendido se divide en dos partes (de \approx 11000 litros cada una) formando el montón de control (A) y el montón tratado (B).

El tratamiento con la composición líquida se realizó en esta fase, ya que el material estaba bien extendido de manera que se pudo asegurar la aplicación uniforme del producto. Se usó inicialmente una dosis inicial orientativa de 3 litros de composición líquida (equivalente a 1,5 kg de la fórmula sólida) por 11 m³; estas dosis se pueden optimizar después. Se preparó una reserva del producto con una cantidad mínima de agua (7 litros) con el fin de no cambiar la humedad de la material prima que va a formar el compost y se pulverizó sobre el lodo extendido usando un pulverizador de mochila con una capacidad de 10 litros. Después se apiló y se volteó formando montones semicirculares. El montón de control (A) se prepare en las mismas condiciones pero no se trató con la composición.

La fermentación usualmente comienza en esta fase, y se debe mantener en condiciones adecuadas volteándose a frecuencia variable. Una mayor frecuencia de volteo acelerará la transformación proporcionando una mayor aireación a los montones. La aireación acelera la descomposición de las mezclas, que genera altas temperaturas de 50-70°C, permitiendo de este modo que los patógenos presentes se eliminen.

El proceso de compostaje se completa con un período de maduración que en condiciones normales (sin ser tratado con la composición) se prolonga durante al menos tres meses. En esta última fase se produce una mayor descomposición, estabilización, destrucción de patógenos y desgasificación, contribuyendo de este modo a un compost final de mayor cualidad.

Después se puede aplicar una fase de secado y selección opcional, que varía entre unos pocos días y varios meses.

Para controlar la temperatura en los montones se realizaron mediciones en varias áreas de los montones con un termómetro de escala circular fabricado por MARTIN MARTENS.

Las lecturas de temperatura del montón de control (A) y del montón tratado (B) se proporcionan en la siguiente tabla. Se aplicó la composición el 24/09/2004 y se realizaron los volteos el 30/9/04, 14/10/04 y 29/10/04.

Fecha de la lectura de la temperatura	Montón de control (A) temperatura en °C	Montón (B) temperatura en °C
24/09/04	31	32
27/09/04	31	33
28/09/04	33	32

ES 2 334 147 T3

	Fecha de la lectura de la temperatura	Montón de control (A) temperatura en °C	Montón (B) temperatura en °C
5	29/09/04	33	32
	30/09/04	33	33
	1/10/04	36	37
10	04/10/04	37	37
	05/10/04	38	38
15	06/10/04	37	39
	07/10/04	37	40
	08/10/04	37	42
20	11/10/04	38	43
	13/10/04	38	44
	14/10/04	29	31
25	15/10/04	34	45
	18/10/04	35	46
	19/10/04	35	47
30	20/10/04	36	44
	21/10/04	36	45
35	22/10/04	37	46
	25/10/04	38	46
	24/09/04	31	32
40	27/09/04	31	33
	28/09/04	33	32
	29/09/04	33	32
45	30/09/04	33	33
	1/10/04	36	37
50	04/10/04	37	37
	05/10/04	38	38
	06/10/04	37	39
55	07/10/04	37	40
	08/10/04	37	42
	11/10/04	38	43
60	13/10/04	38	44
	26/10/04	37	45

65

ES 2 334 147 T3

	Fecha de la lectura de la temperatura	Montón de control (A) temperatura en °C	Montón (B) temperatura en °C
5	27/10/04	36	44
	28/10/04	34	46
	29/10/04	27	32
10	02/11/04	34	44
	03/11/04	34	43
15	04/11/04	34	42
	05/11/04	33	42
	08/11/04	33	41
20	09/11/04	33	41
	10/11/04	33	41
	11/11/04	34	41
25	12/11/04	33	41

Las lecturas de temperatura se caracterizaron por una evolución favorable en el montón tratado (B) con las formulaciones. Este incremento fue rápido en comparación con el montón de control (A). De hecho, las diferencias de temperatura alcanzaron hasta 12°C (19 octubre). La temperatura máxima en el montón de control (A) fue 38°C, mientras que en el montón (B) tratado con las formulaciones alcanzó 47°C. Después del primer volteo de los montones el incremento de temperatura fue mayor en el montón tratado (B) que en el montón de control (A). El montón (B) tratado con las formulaciones alcanzó temperaturas favorables para la operación de los microorganismos termófilos (>45°C), permitiendo que los patógenos presentes se eliminen.

Durante los volteos se observaron las diferencias visualmente. De hecho, en el montón tratado (B) se observó una fuerte emisión de gas, debido a que se alcanzaron altas temperaturas (que no se observó en el montón de control (A)), así como un fuerte olor a fermentación. Otro hecho importante es que el experimento tuvo lugar durante los días con gran lluvia, que no evitaron el desarrollo favorable del proceso en el montón tratado con las formulaciones.

El procedimiento empleado fue pirólisis con cromatografía de gases-espectrometría de masas (Py-CG-EM), para una caracterización directa de la materia orgánica (OM) presente en las matrices de complejos.

En el caso específico de los estudios de la composición de compost, se mostró que la pirólisis analítica permite que se diferencien tanto el origen del sustrato orgánico como su grado de maduración.

En vista de esto, se llevó a cabo un estudio directo por Py-CG-EM de muestras de compost de control y el mismo compost se sometió a tratamiento con la formulación y a un grado diferente de maduración, para detectar cambios posibles en las características de su OM (materia orgánica).

Del mismo modo, se usó otro procedimiento: “desorción”, fundamentalmente similar a la pirólisis. Mientras se realiza la pirólisis a una temperatura de alrededor de 500°C, la desorción tiene lugar a una temperatura más baja (300°), permitiendo obtener información molecular sobre la descomposición de precursores de OM muy sensibles.

Los análisis que usan pirólisis (Py) se realizaron con un pirolizador PY2020 (Frontier Lab) asociado a una unidad Agilent 5973 de cromatografía de gas-espectrometría de masas (CG-EM). El sistema de pirólisis (disparo doble) permite una pirólisis secuencial a diferentes temperaturas en la misma muestra.

Después de realizar varios ensayos, se obtuvieron las condiciones de medición optimizadas (para tanto cromatografía como pirólisis) para analizar las muestras de compost, implicando básicamente un primer calentamiento entre 100 y 300°C (temperatura de pirólisis secundaria) a una velocidad de 30°C por minuto, seguido de una pirólisis ultrarrápida a 500°C durante un minuto. La primera etapa se puede considerar un tratamiento de desorción térmica, no una verdadera pirólisis, y se sugiere que es especialmente adecuado para la liberación mediante desorción térmica de compuestos volátiles y semivolátiles débilmente asociados al sustrato que se está analizando. La segunda fase (pirólisis a 500°C) da lugar a los productos de pirólisis obtenidos a partir de la ruptura de las macromoléculas presentes en la matriz que se está analizando.

ES 2 334 147 T3

Se analizaron pares de muestras de compost de la muestra de control (A) y la muestra tratada (B) tomadas a intervalos de una semana en los meses de septiembre y octubre. Las principales alteraciones de las muestras se encontraron en la primera semana, y se mantuvieron estables en los muestreos siguientes. Una representación significativa de los cromatogramas de iones totales (TIC) de los productos de pirólisis obtenidos por desorción térmica y pirólisis ultrarrápida (pirogramas), así como la pirólisis directa a 500°C obtenida en el análisis de las muestras de compost control y tratado se proporciona en las figuras 1-3.

La Figura 1 muestra los cromatogramas de análisis de Py/desorción (300°C)-CG-EM para las muestras de pares de control (A) y para las muestras de pares tratados (B). Las alteraciones claras, principalmente de un tipo cuantitativo, se pueden observar en el perfil pirolítico de las muestras. Específicamente, el tratamiento da como resultado una reducción significativa en la abundancia de ácidos grasos de cadena larga (C¹⁴-C¹⁸). Además, se observa la evaporación térmica abundante de esteróles de origen microbiano en ambas muestras. Aproximadamente todos los productos de pirólisis se identificaron de manera inequívoca mediante espectrogramas de masa. La Figura 1 muestra la identidad química de algunos productos de pirólisis significativos, tales como ácido dodecanoico (1), ácido tetradecanoico (2), ácido palmítico (3), ácido oleico (4), ácido esteárico (5), ftalato de dialquilo (6), 5-alfa colestano (7).

La Figura 2 muestra los cromatogramas de análisis de Pirólisis (500°C)-CG-EM donde se observó un comportamiento similar. Esto es, las diferencias cuantitativas entre los productos de pirólisis liberados en las muestras de control (A) y tratadas (B), aunque los cambios son menos notables. La destrucción de los productos de pirólisis indica la presencia de biopolímeros alifáticos (pares de alcano-alqueno), lípidos (ácidos grasos) paredes celulares (esteróles), componentes aromáticos no ligníticos (tolueno y fenoles) entre los componentes de ambas muestras. En la muestra tratada el patrón del par alcano-alqueno típico de la pirólisis de polímeros alifáticos es menos claro, y la reducción de los ácidos grasos mencionados anteriormente es igualmente significativa. La Figura 2 puntualiza la naturaleza química de los productos de pirólisis representativos tales como tolueno (8), estireno (9), metilestireno (10), metilfenol (11), hexadecanitrilo (12), ácido palmítico (13), ácido oleico (14), ácido esteárico (15) y 5-alfa colestano (16).

La Figura 3 muestra los cromatogramas de la pirólisis directa emparejada (500°C)-CG-EM, es decir, eliminación de la fase anterior de desorción a 300°C, que confirma la tendencia observada en las pirólisis secuenciales, particularmente la reducción de ácidos grasos en las muestras tratadas. Un punto que merece la pena mencionar es la incorporación aparente de los productos de pirólisis típicos de proteínas y polisacáridos en la muestra tratada (B), como se muestra mediante la aparición de furfural (17) y levoglucosano (19) y mediante el máximo aumentado de indeno (18).

Los resultados obtenidos mediante pirólisis o desorción muestran una capacidad de reproducción excelente de pirogramas para las muestras tomadas unas semanas después de la aplicación de las formulaciones: control tratado con pirólisis los días diferentes.

Los resultados obtenidos permiten sacar la conclusión de que el uso de las formulaciones biológicas basadas en los microorganismos permite la aceleración del proceso de compostaje de tratamiento de lodos de la planta de aguas residuales en aproximadamente el 50%.

Los resultados del análisis de pirólisis (Py-CG-EM) de las muestras muestran que la descomposición de los diversos productos orgánicos obtenidos a partir de polímeros (lípidos, polisacáridos, proteínas, etc.) presentes en el lodo es mucho más eficaz cuando las formulaciones se aplican en comparación con la muestra no tratada.

La aceleración del proceso de compostaje de lodo de la planta de tratamiento de aguas residuales mediante la realización de la formulación, tiene como una consecuencia, además de un mejor uso del espacio dedicado al compostaje, tareas de operación reducidas (volteos) y, por lo tanto, costes más bajos.

Ejemplo 2

En un segundo ejemplo de realización la aplicación de la composición de la invención se estudia durante el compostaje del lodo de la planta de tratamiento de aguas residuales mezclado con biomasa vegetal (VB), con el fin de poner a prueba su eficacia en acelerar el proceso y reducir las tareas de operación (volteos).

La material prima usada en este ejemplo es el lodo de la planta de tratamiento y la biomasa vegetal como un agente de estructura, obtenido a partir de las podas de bosque y de jardín. Este último agente, aparte de actuar como una fuente de carbono durante el compostaje, juega un papel esencial incrementando la porosidad y por lo tanto el área de contacto del lodo expuesto al oxígeno durante el proceso. También reduce el nivel de humedad inicial de la mezcla. Además, la descomposición de la materia incrementa su área superficial expuesta a ataque microbiano, afectando a la velocidad del proceso. Una relación de 1:3, es decir una parte de lodo a tres partes de agentes estructurales, se considera adecuada.

El lodo y la biomasa requieren un tratamiento anterior. En el caso de lodo, dependiendo de su humedad puede o puede no requerir un tratamiento de secado realizado en un número de comprobaciones proporcionadas para tal propósito.

ES 2 334 147 T3

La biomasa puede estar en pedacitos, obtenidos por molienda hasta que se obtienen fragmentos más pequeños que 15 cm de largo y 2 cm de ancho.

5 Se usa el procedimiento de caballón, que proporciona las siguientes ventajas: secado rápido del compost (pérdida de humedad cuando los montones se voltean); material compost más seco; posibilidad de manipulación de un gran volumen de material; gran estabilidad del producto; bajo coste económico.

10 Se depositan los diversos materiales en capas para amontonamiento o formación del caballón. Se colocan las capas de las diferentes materias primas de manera consecutiva y alternativamente. Después del amontonamiento, se realiza una primera mezcla y comienza la fermentación.

15 El tratamiento con las formulaciones se realiza durante la primera mezcla de los materiales amontonados. Se usa inicialmente una dosis de 1 a 1,5 litros de formulación bacteriana por 10 m³ de sustrato. Se prepara un caldo del producto usando una cantidad mínima de agua y se pulveriza sobre el caballón, que más tarde se voltea para homogeneizar el tratamiento. Se prepara otro caballón en las mismas condiciones sin aplicar el tratamiento con la formulación, con el fin de usarlo como control.

20 En esta fase comienza la fermentación en sí misma y se mantiene en condiciones adecuadas mediante los volteos aplicados con una frecuencia variable.

Una mayor frecuencia de volteo acelera la transformación proporcionando una mayor aireación de los caballones.

25 El proceso de formación de compost se completa con un período de maduración que en condiciones normales (sin tratamiento con la formulación) durará al menos dos meses. En esta última fase, tiene lugar una mayor descomposición, estabilización, destrucción de patógenos y desgasificación, contribuyendo a producir un compost final de mayor calidad.

30 Las lecturas de temperatura de los caballones de control y tratado se caracterizan por una evolución favorable. Sin embargo, este incremento fue muy rápido en el caballón tratado con la formulación (las temperaturas máximas obtenidas en el caballón de control estaban entre 50 y 52°C, mientras que en el caballón tratado eran 10 grados mayores). Esto es debido a un proceso de fermentación aeróbica correcta llevado a cabo por los microorganismos inoculados.

35 En este ejemplo, además de una lectura de temperatura diaria, el proceso de compostaje se controló mediante la técnica Py-CG-EM.

40 Los cromatogramas de iones totales (TIC) de los productos de pirólisis obtenidos por desorción térmica y pirólisis ultrarrápida (pirogramas) en el análisis de las muestras de compost se muestran en las figuras 4-5, y permiten que se deduzcan las siguientes conclusiones:

45 La Figura 4 muestra un análisis de (300°C)-CG-EM Py/desorción que muestra las alteraciones en el perfil pirolítico de la muestra de control (C) y la muestra tratada (D), tanto en un sentido cuantitativo como en un sentido cualitativo. El tratamiento con las formulaciones provoca un cambio brusco en el comportamiento de la muestra en la desorción térmica, mostrado en la evaporación térmica abundante de los compuestos alifáticos (ácidos grasos con una baja masa molecular y n-alcanos de cadena lineal saturados).

50 La Figura 5 muestra un análisis de pirólisis (500°C)-CG-EM en el que se reproduce el comportamiento anteriormente mencionado, es decir existen diferencias entre la muestra de control (C) y la muestra tratada (D), aunque los cambios están menos marcados. Los datos moleculares indican que el pirograma de la muestra de control (C) claramente muestra los productos de pirólisis de lignina (20). En la muestra tratada el patrón de lignina es menos obvio, y el pirograma está dominado por los compuestos alifáticos con una masa molecular alta (cetonas, ácidos grasos no saturados, etc.), probablemente de las paredes celulares microbianas.

55 La Figura 6 muestra la excelente reproducibilidad de los pirogramas en las pruebas descritas anteriormente.

60 Los resultados obtenidos como un todo permiten llegar a la conclusión de que el uso de las formulaciones biológicas basadas en microorganismos, objeto de la presente invención, permite que se acelere el proceso de compostaje de residuos obtenidos a partir de lodo de planta de tratamiento de aguas residuales mezclados con la biomasa vegetal (agente estructural).

65 Los resultados obtenidos a partir del análisis de Pirólisis (Py-CG-EM) muestran que la humidificación de los diversos compuestos orgánicos obtenidos a partir de polímeros (ligninas, polisacáridos, proteínas, etc.), presentes en el lodo, es mucho más eficaz cuando se aplica la formulación comparada con el control no tratado.

ES 2 334 147 T3

Ejemplo 3

5 En un tercer ejemplo de realización, la materia prima usada es residuo sólido municipal reciente (MSW) suministrado por la compañía EDIFESA-Sevilla. Se seleccionó la fracción orgánica de la materia prima (MSW), se troceó y se homogeneizó.

Se depositan los diferentes materiales en capas para el amontonamiento o para la formación del caballón. Después que se amontonan se realiza una primera mezcla y comienza la fermentación.

10 El tratamiento con la composición de esta invención se realiza durante la fase descrita anteriormente, específicamente en la primera mezcla de los materiales amontonados. La dosis inicial es 1 litro de formulación por 10 m³. Se prepara una reserva del producto en 50 litros de agua aproximadamente y se pulveriza sobre el caballón, que después se voltea para homogeneizar el tratamiento. En el caso de la presente invención, se prepara otro caballón en las mismas condiciones sin tratamiento con la formulación, con el fin de usar como un control.

15 Normalmente, al final del proceso se realiza una evaluación de la maduración y estabilidad del compost que asegura su obtención.

20 El control de las lecturas de temperatura de los caballones de control y tratado se caracteriza por una evolución favorable. Sin embargo, este incremento ha sido muy rápido en el caballón tratado con la composición que es el objeto de esta patente (las temperaturas máximas alcanzadas en el caballón de control estaban entre 60 y 62°C, mientras que en el caballón tratado variaban entre 65 y 70°C). Esto se debe a un proceso de fermentación aeróbica correcta realizado por los microorganismos inoculados en el residuo.

25 El proceso de compostaje en los caballones de control y tratado se controló mediante la técnica Py-CG-EM.

Los resultados del análisis de las muestras de este compost se muestran en las figuras 7 y 8. Se puede concluir lo siguiente en vista de los pirogramas mostrados:

30 La Figura 7 muestra los cromatogramas de desorción térmica. Se pueden ver claras diferencias en los perfiles pirolíticos de la muestra de control (E) y las muestras tratadas (F, G). El comportamiento pirolítico de una de las muestras tratadas (G) corresponde a un material de alta estabilidad, que resulta a partir de una alta maduración.

35 La identidad de los diversos picos indicados en la Figura 7 es como sigue: ácidos alcanóicos lineales C₆-C₇ (20-22); ceras de alta masa molecular alta (23,24); escualeno (25); n-alcano de alta masa molecular (26).

La Figura 8 muestra cromatogramas de pirólisis a 500°C de la muestra de control (E) y de las muestras tratadas (F, G).

40 La identidad química de los diversos picos mostrados es la siguiente: 1-3, pares de alcano/alqueno C₁₄-C₁₆ (27-29), n-alcanonas C₁₇-C₁₉ (30-31).

45 Los resultados obtenidos a partir de la pirólisis o desorción muestran una excelente reproducibilidad de pirogramas de las muestras tomadas 10 días después de aplicar la formulación: muestra de control y muestra tratada sometidas a pirólisis en días diferentes. Validación de la selección de la muestra para análisis y técnica.

Una evaluación de los resultados mostrada en las figuras permite ver que el tratamiento con las formulaciones provoca un cambio brusco en el pirograma de las muestras tratadas.

50 La interpretación de los datos moleculares permite conclusiones importantes que se alcanzan en relación al grado de humedad de la materia durante el proceso. De este modo, en solamente 10 días se observan grandes diferencias entre las muestras de control y las tratadas, con algunos picos apareciendo (fenoles) y otros desapareciendo, indicando la descomposición gradual y rápida del sustrato lignocelulósico, descomponiéndose apenas en los caballones de control.

55 Ejemplo 4

60 En este ejemplo se usaron montones de ensayo con un volumen de 10 m³ que contenían materia de residuos vegetales de cultivos de Almería occidental, España. Este volumen permite manipulación sencilla de los montones cuando se voltean y se aplican las diversas preparaciones a ellos.

65

ES 2 334 147 T3

Los tratamientos aplicados se muestran en la siguiente tabla:

Montón (10 m ³)	Fecha de aplicación	Dosis de composición de la invención y Prog	Urea añadida (kg)
1	15/05/03	100 cc	7,5
2	16/05/03	1500 cc	
3	16/05/03	1500 cc, Prog 1000 cc	
4	16/05/03	1500 cc y Prog 1000 cc	7,5
5	16/05/03	1500 cc	7,5
6	23/05/03	150 cc	7,5

Prog se refiere a Progrowth, un producto para potenciar el crecimiento microbiano en el suelo fabricado por el solicitante de esta patente.

Se realizaron estos tratamientos disolviendo las formulaciones en agua hasta un volumen final de 50 litros, la cantidad requerida para la aplicación a 1 m³ de material vegetal.

En diferentes momentos durante el proceso de compostaje, se tomaron muestras de cada tratamiento, se midió la temperatura de los diversos montones y se realizó posteriormente un análisis de las muestras tomadas a lo largo del proceso mediante Pirólisis (Py-CG-EM).

La siguiente tabla proporciona las lecturas de temperatura diarias en los diversos montones.

Fecha	Montón 1	Montón 2	Montón 3	Montón 4	Montón 5	Montón 6
17/05/03	43	50,1	44,3	45,4	48,3	
19/05/03	45,3	51	46,3	47,8	49,2	
20/05/03	48,9	51,2	49,5	50,3	51,1	
21/05/03	50,5	51,8	53,3	52,7	53	
22/05/03	53,5	55,2	55,7	54,3	56,8	41,3
23/05/03	57,1	56,4	58,2	57,5	58,3	45,7
16/05/03	60	59,4	60,5	59	61,5	55,4
27/05/03	52,4	56,1	55,6	57,1	58,2	53,4
28/05/03	49,8	54,5	52,4	52,3	56,1	53,8
29/05/03	49,6	54,5	55,5	52,6	55,7	55,1
30/05/03	49,9	54,8	57,9	53,1	55,1	56,3
31/05/03	50,3	53	57,9	53,1	55,1	56,3
2/06/03	51,5	53,1	55,8	53,3	54,5	57
03/06/03	51,2	52,3	55,4	53,5	53,5	56,3
04/06/03	51,4	52,5	53,7	53	52,1	56,2
05/06/03	51,1	52	53,2	52,7	50,6	55,1
06/06/03	50,8	51,4	53,5	51,5	49,3	53,7
07/06/03	50,3	51,2	53	51,3	49,1	52,2
09/06/03	50,1	50,6	52,9	50,4	48,2	50,5
10/06/03	50	50,5	52,7	49,5	48,6	50,2
Promedio	50,84	53,08	53,55	52,49	53,29	52,7

Se vio una evolución favorable de la temperatura en todos los montones, verificando un rápido incremento de la temperatura con el tiempo como resultado de un correcto proceso de fermentación aeróbica realizado mediante los diversos microorganismos inoculados. Se alcanzaron temperaturas de alrededor de 58-60°C en todos los casos, con una lectura ligeramente más alta (3-4°C) en los montones tratados con la composición de la invención y Pro-growth.

ES 2 334 147 T3

Este incremento de temperatura fue muy significativo en el montón 6, considerando la diferencia en el tiempo de inoculación (1 semana más tarde).

5 Posteriormente (después del 25/05/03), los montones tratados con la composición de la invención y Progrowth mantuvieron una temperatura constante, estable, cayendo gradualmente hasta que el proceso terminó. En vista de estos resultados, se puede concluir que en los montones tratados con la composición de la invención y con Progrowth la fermentación permaneció activa durante un tiempo mayor que en el montón no tratado. Este efecto positivo ocasiona una calidad mejorada del compost (mayor degradación de los polímeros que constituyen el material vegetal inicial).

10 Se realizó un estudio directo mediante Py-CG-EM sobre composts de control y el mismo compost se sometió a diversos tratamientos en un grado diferente de maduración, con el fin de detectar posibles variaciones en las características de su OM.

15 Las Figuras 9-12 permiten la comparación de los pirogramas del compost de control (que mostró excelente reproducibilidad en diversos ensayos) y de los composts tratados recogidos en diversas fases de maduración (I, J).

20 A pesar de su complejidad, se identificaron prácticamente todos los productos de Pirólisis, y con ellos sus probables precursores. Sin embargo, en este caso es más interesante hacer énfasis en las diferencias obvias entre los diversos patrones de productos, particularmente en el área del pirograma que muestra los productos más volátiles (aproximadamente los primeros 15 minutos en las condiciones de cromatografía usadas). También son obvias las diferencias entre los pirogramas respectivos de los composts tratados (I, J) en diferentes fases de maduración.

 Las partes inferiores de las figuras 9 y 11 muestran el compost tratado (I) recogido en mayo y junio respectivamente.

25 La parte inferior de las figuras 10 y 12 muestran el compost tratado (J) recogido en mayo y junio respectivamente.

30 El uso de las formulaciones biológicas basadas en microorganismos objeto de esta invención permite acelerar el proceso de compostaje del material vegetal. El estudio comparativo ha mostrado que la aplicación de las formulaciones da como resultado una evolución adecuada de las temperaturas que permiten los procesos de fermentación responsables de una mayor degradación del material vegetal usado para obtener el compost.

35 Los resultados del análisis de Pirólisis (Py-CG-EM) muestran que la humidificación de los diversos compuestos orgánicos producidos a partir de polímeros (tales como ligninas, polisacáridos, proteínas, etc.) presentes en la materia vegetal fue más eficaz cuando se aplicaron las formulaciones. Es económicamente aprovechable tratar el compost con la formulación bacteriana, ya que el incremento en coste no es significativo comparado con las ventajas obtenidas.

 La esencia de esta invención no está afectada por las variaciones en los materiales, forma, tamaño y disposición de los elementos componentes, descritos de una manera no limitante que permite su reproducción por un experto.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. La cepa bacteriana de *Bacillus megaterium* AMCB1 depositada en la Colección de Cultivos Estándar Española (Colección Española de Cultivos Tipo, CECT) el 27 de julio de 2004 con el número de acceso CECT 7012 que acelera los procesos de compostaje.

10 2. Una composición **caracterizada** porque comprende al menos la cepa bacteriana de la reivindicación 1, conjuntamente con la cepa bacteriana *Bacillus subtilis* depositada en la Colección de Cultivos Estándar Española (Colección Española de Cultivos Tipo, CECT) el 27 de julio de 2004 con el número de acceso CECT 7014, que acelera los procesos de compostaje.

15 3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada** porque contiene las cepas de *Azospirillum brasilense*, *Azotobacter chroococcum* y *Saccharomyces cerevisiae*, conjuntamente con una reserva nutricional.

20 4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada** porque la concentración preferida de los microorganismos en una formulación líquida es 10^3 a 10^9 unidades formadoras de colonia por mililitro (cfu/ml).

25 5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizada** porque la concentración preferida de los microorganismos en una formulación líquida es 10^5 a 10^7 unidades formadoras de colonia por mililitro (cfu/ml).

30 6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada** porque la concentración preferida de los microorganismos en una formulación sólida es 10^3 a 10^9 cfu/g.

35 7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada** porque la concentración preferida de los microorganismos en una formulación sólida es 10^5 a 10^7 cfu/g.

40 8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada** porque la reserva nutricional al menos contiene:

30	Melazas	40 - 100 g/l
	Mn AEDT	40 - 100 g/l
35	Zn AEDT	0,1 - 40 g/l
	Fe AEDT	50 - 200 g/l
40	Molibdato de sodio	0,1 - 1 g/l
	Ácido bórico	0,1 - 1 g/l
	pH	6,5 - 7,5

45 9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada** porque la reserva nutricional al menos contiene:

50	Proteína bruta	10 - 50 %
	Materia grasa bruta	10 - 30 %
55	Celulosa	1 - 10%
	Lactosa	10 - 60 %
	Sulfato ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5 - 20 mg/Kg
60	pH	6,5 - 7,5

10. Uso de una composición de acuerdo con las reivindicaciones 2 a 9 para acelerar el compostaje.

65 11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada** porque acelera el proceso de compostaje de lodo de planta de tratamiento de aguas residuales.

ES 2 334 147 T3

12. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada** porque acelera el proceso de compostaje de lodo de planta de tratamiento de aguas residuales mezclado con biomasa vegetal.

5 13. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada** porque acelera el proceso de compostaje de residuos sólidos municipales (MSW).

14. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada** porque acelera el proceso de compostaje de materia vegetal.

10 15. Uso de una composición de acuerdo con las reivindicaciones 2 a 9 como un fertilizante.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

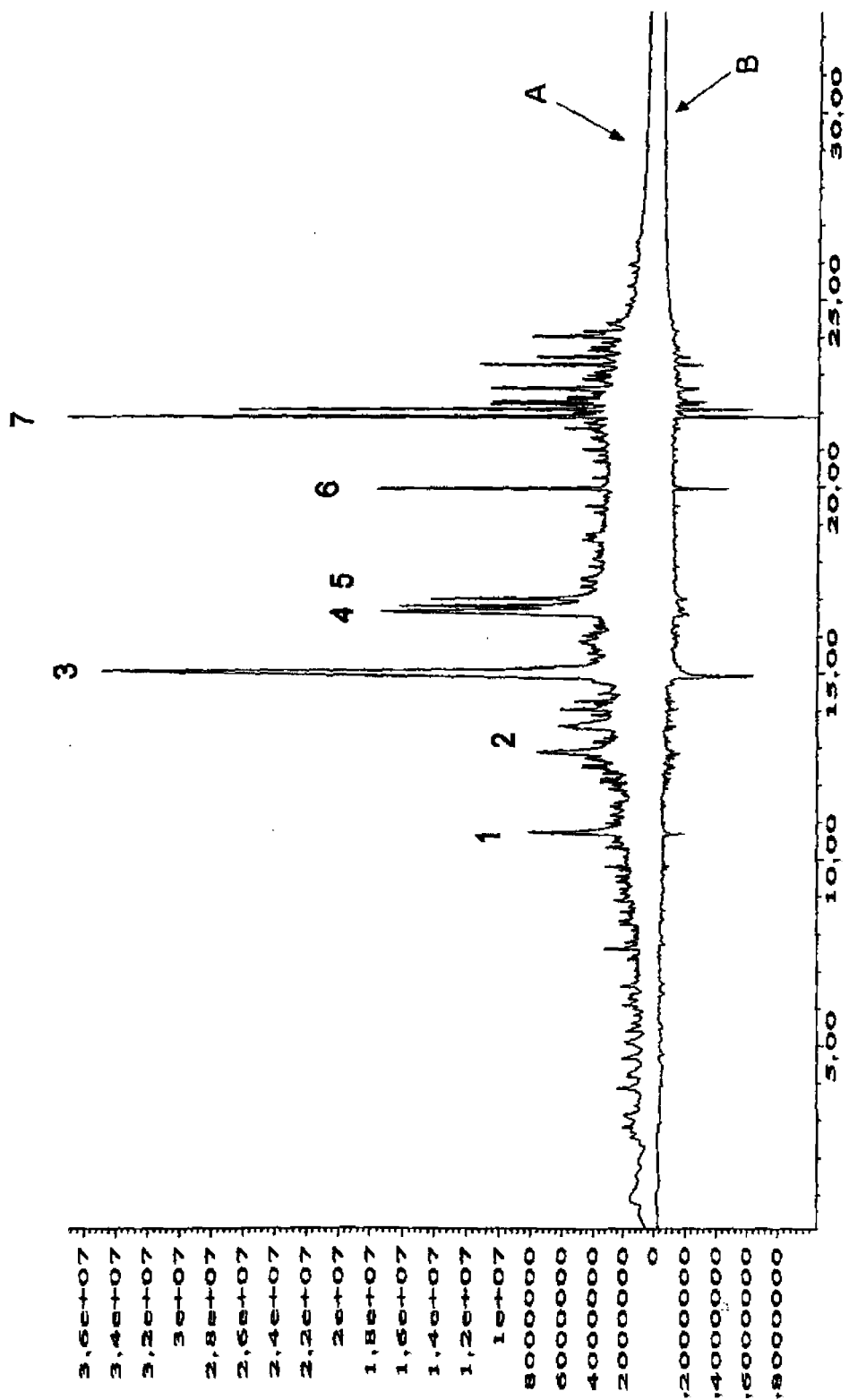


FIG.1

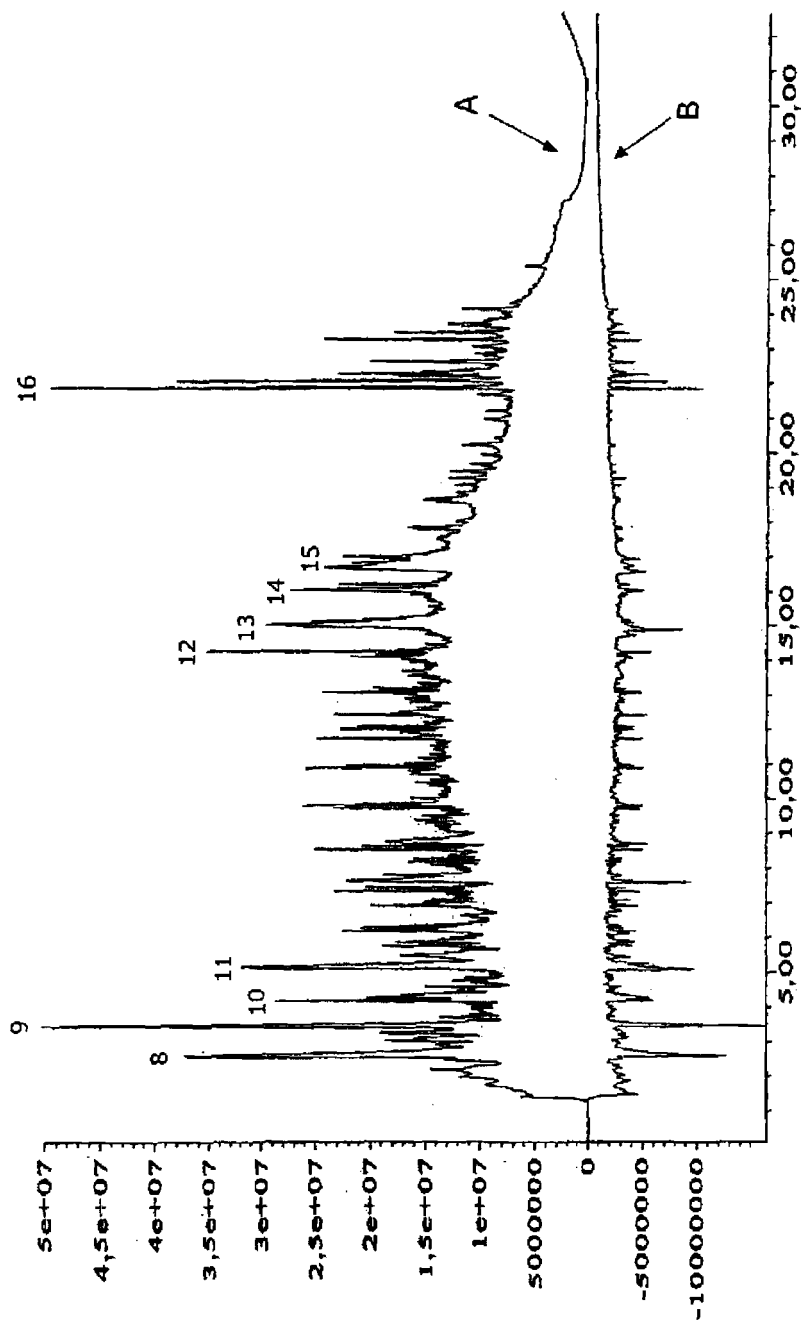


FIG.2

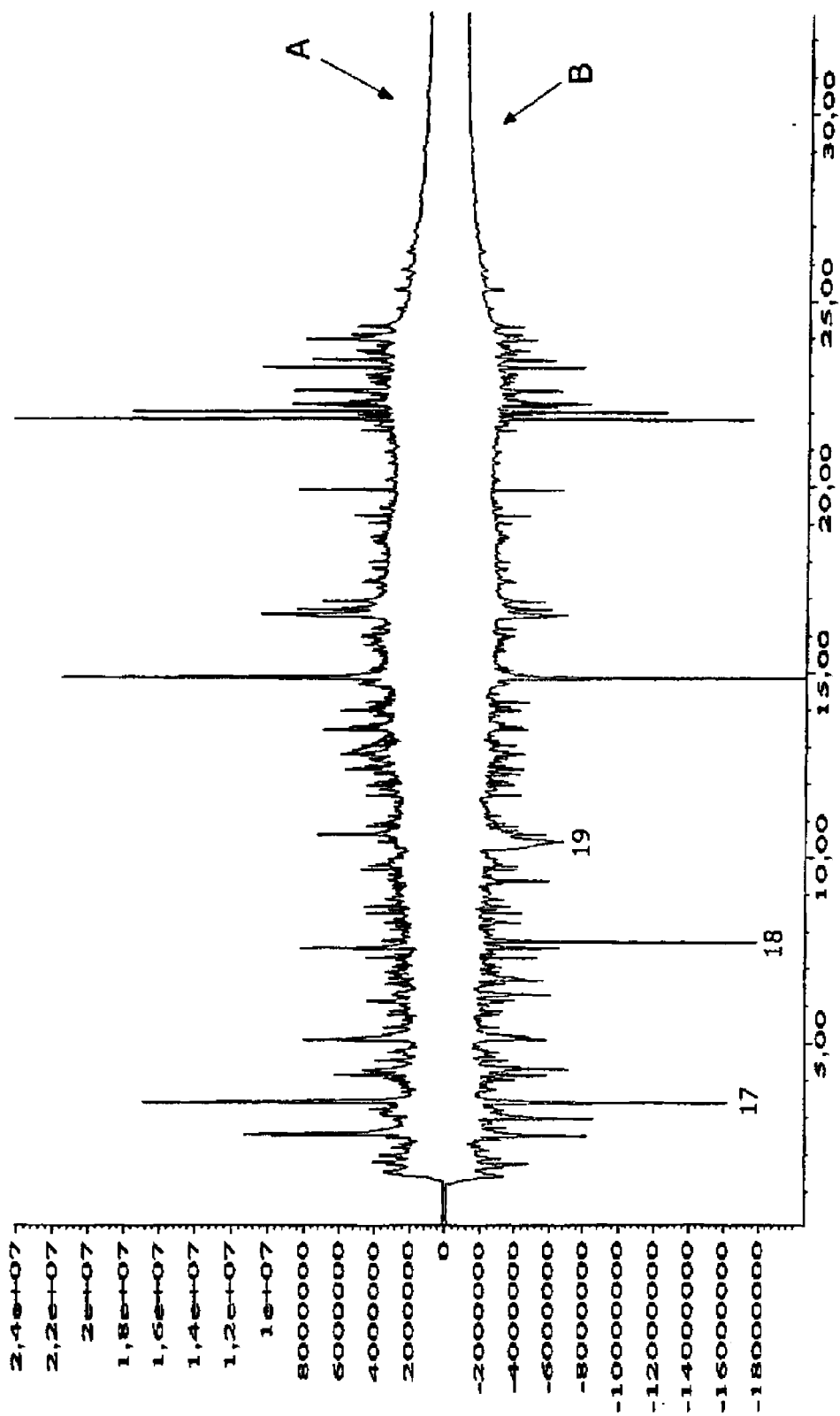


FIG.3

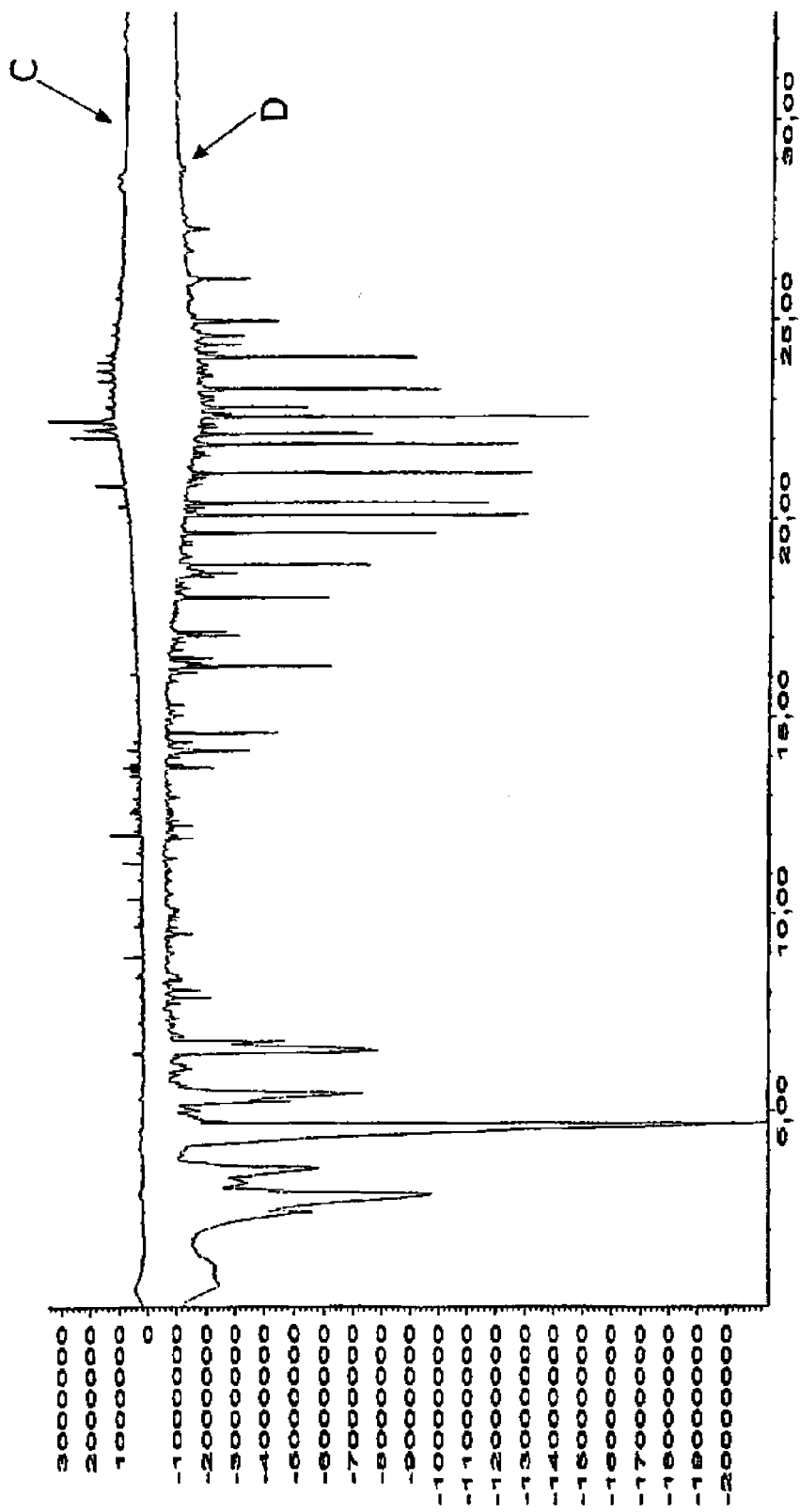


FIG.4

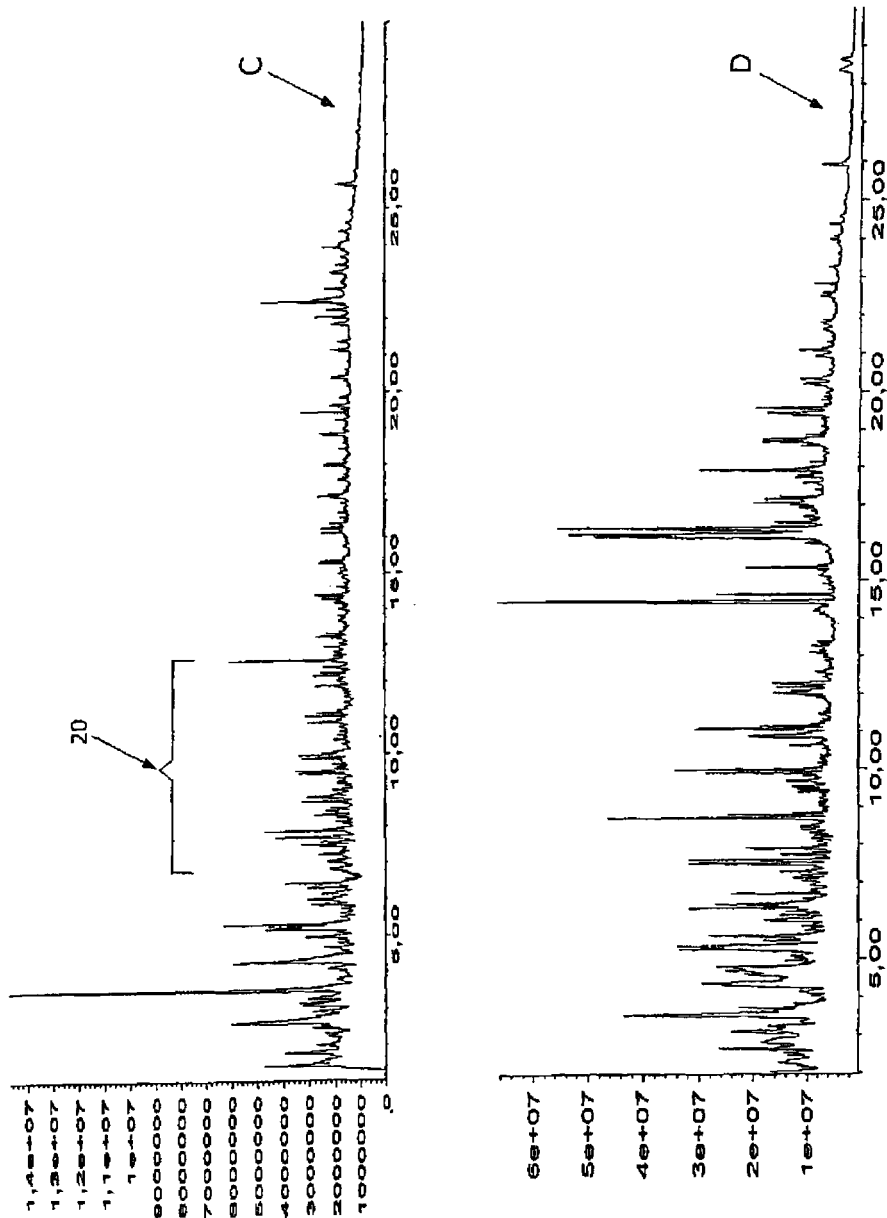


FIG.5

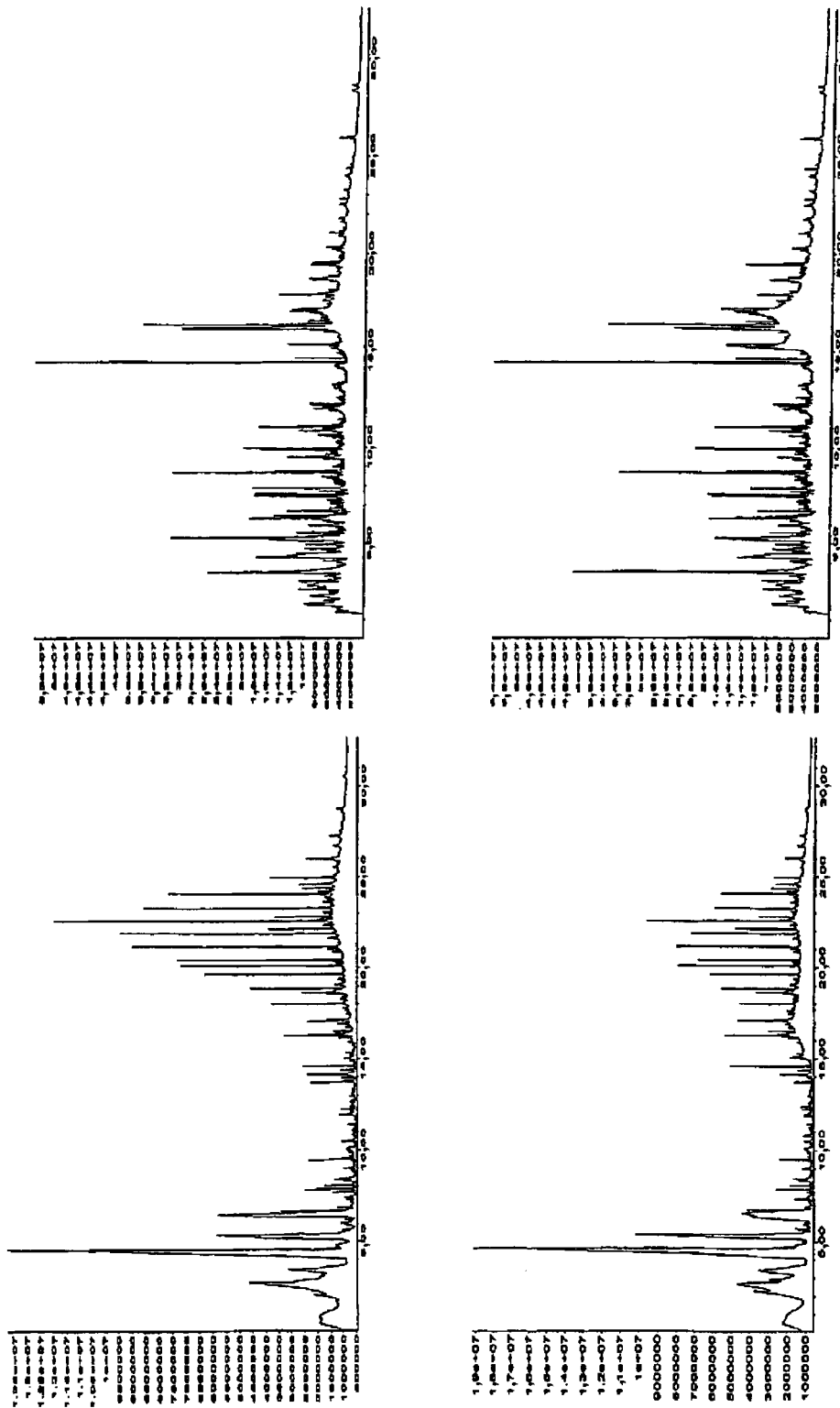


FIG.6

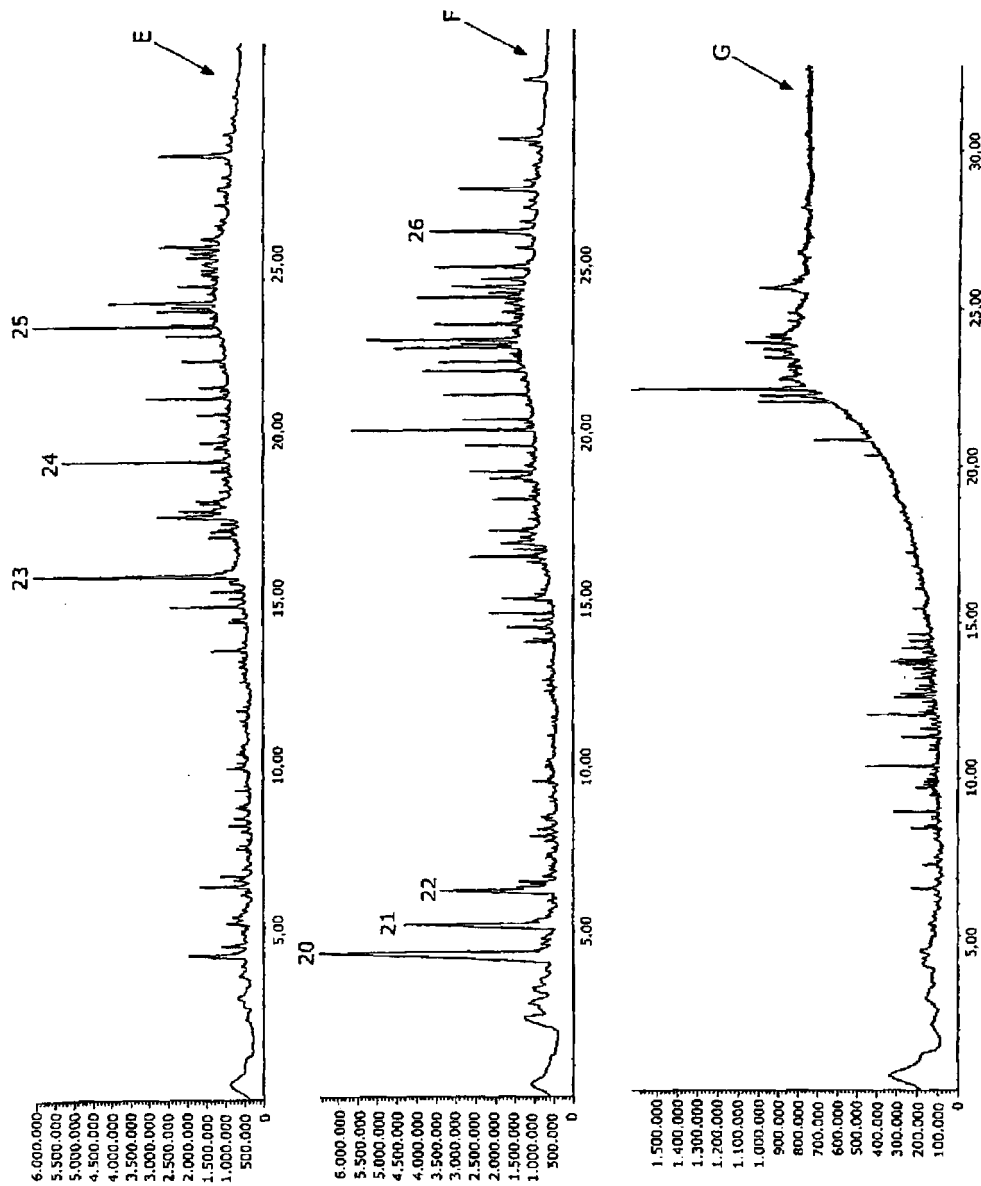


FIG.7

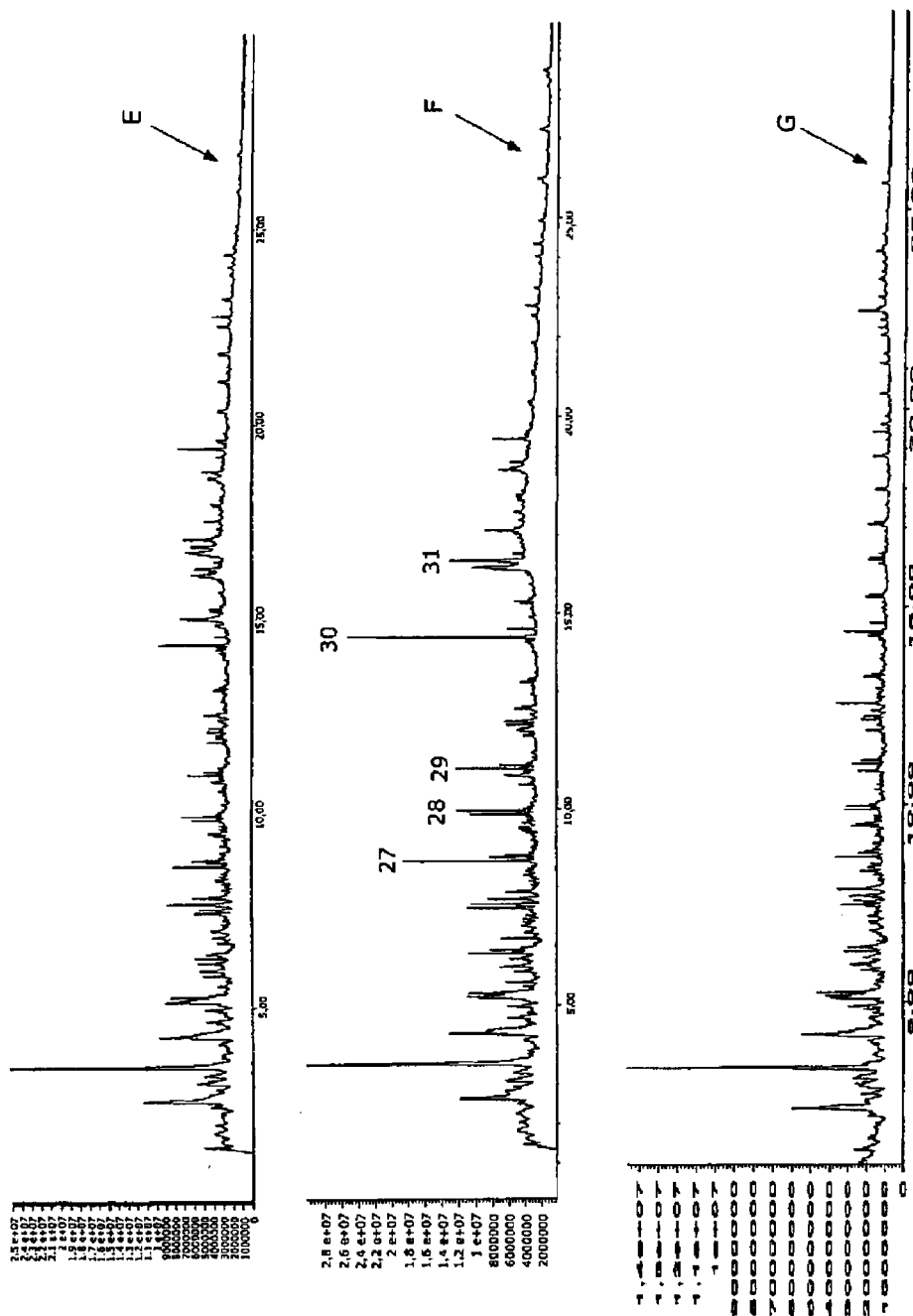


FIG.8

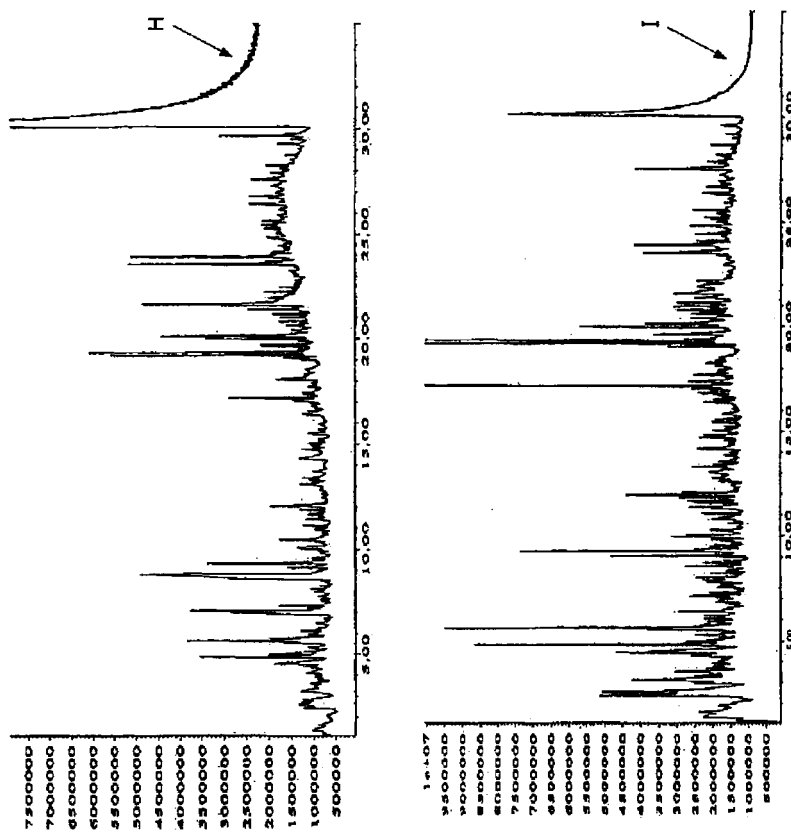


FIG.9

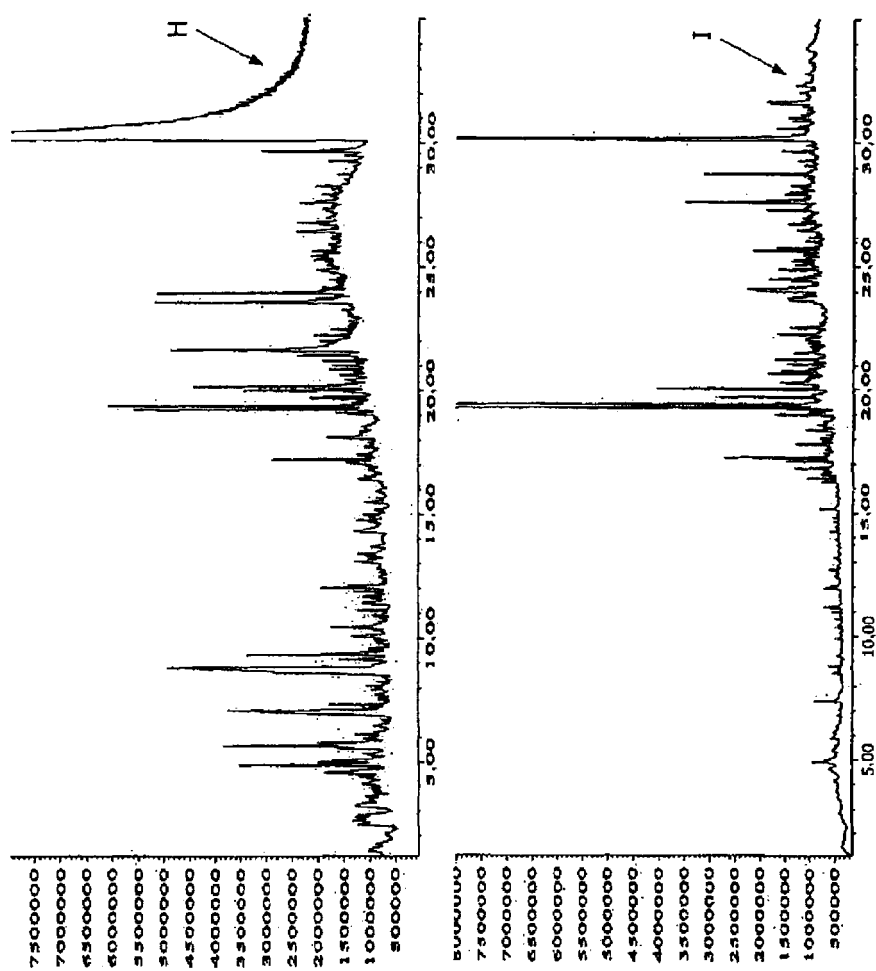


FIG.10

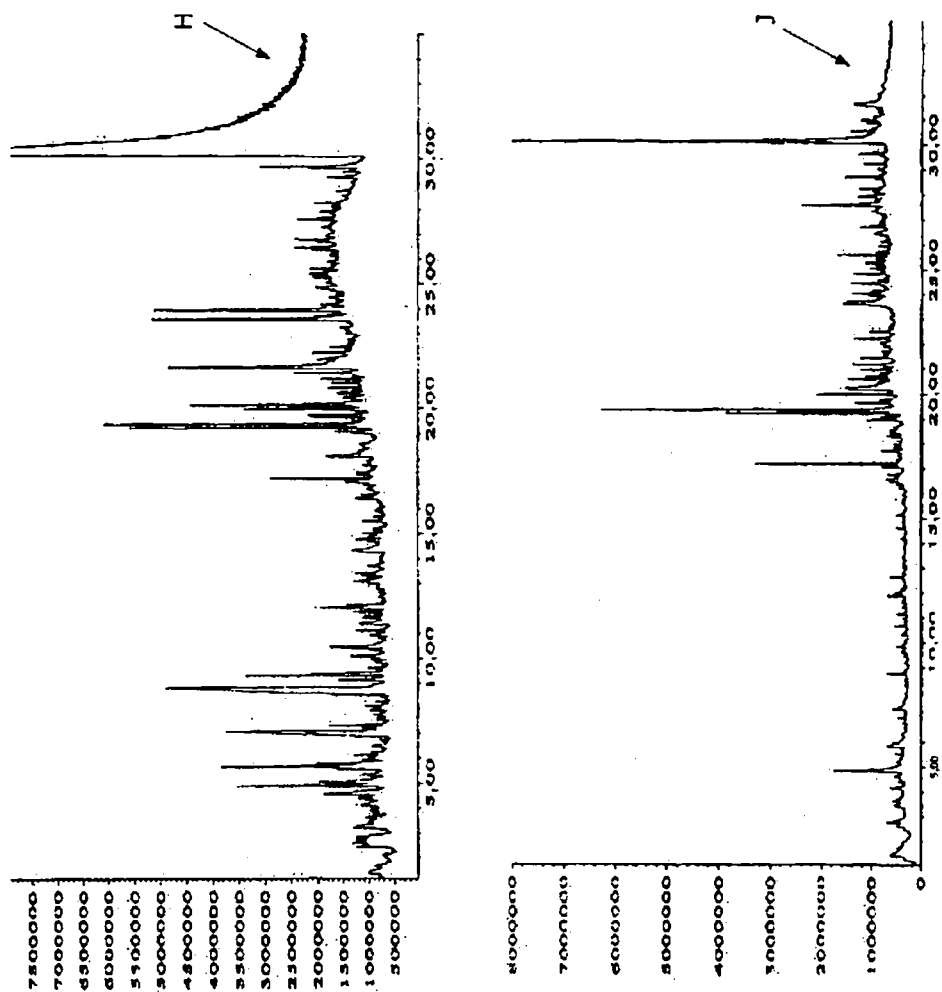


FIG.11

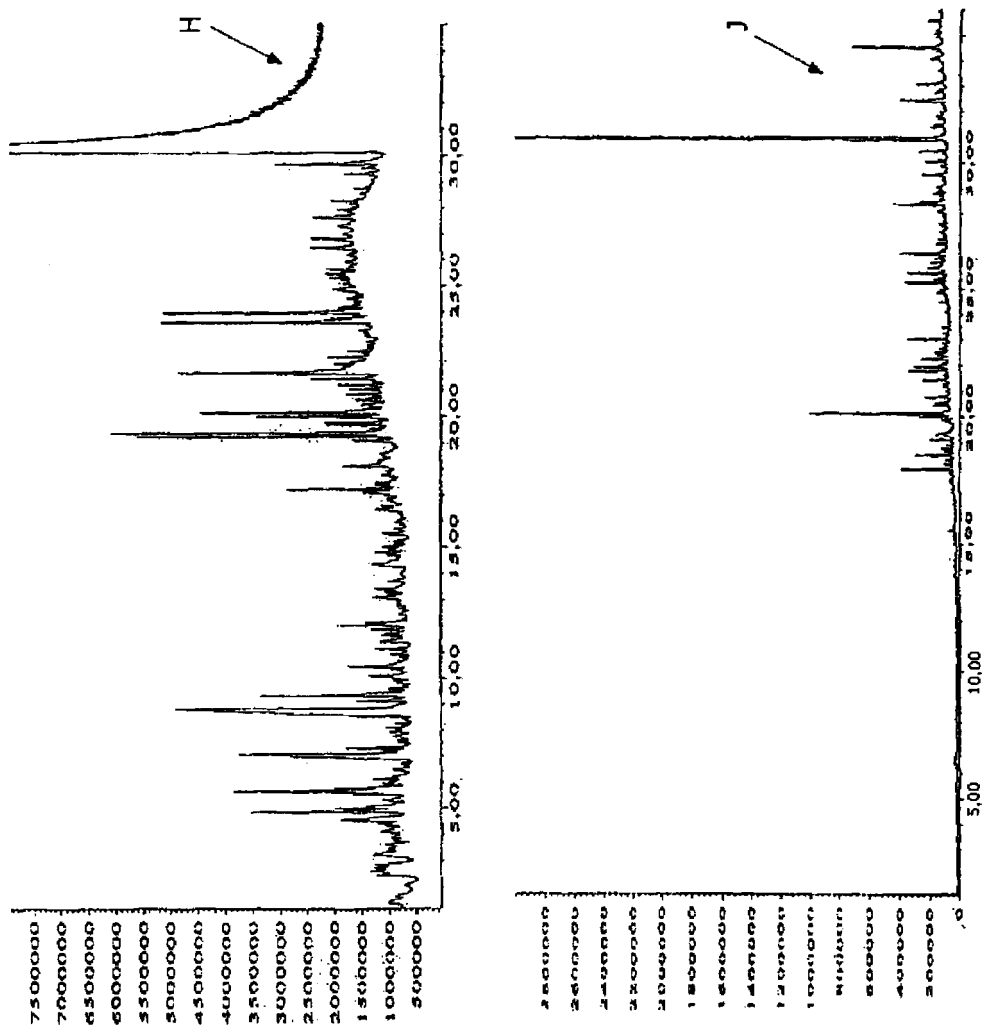


FIG.12

ES 2 334 147 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> TRICHODEX, S.A.
5 <120> CEPA BACTERIANA Y COMPOSICIÓN PARA SU USO EN LA ACELERACIÓN DEL COMPOSTAJE Y
COMO FERTILIZANTE
<130> 20051434
<160> 2
10 <170> PatentIn versión 3.3
<210> 1
<211> 1487
<212> ADN
15 <213> *Bacillus megaterium*
<220>
<221> misc_feature
20 <222> (311)..(311)
<223> n es a, c, g, o t
<220>
<221> misc_feature
25 <222> (1113)..(1113)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 1
30
gctggcggcg tgcctaatac atgcaagtcg agcgaactga ttagaagctt gcttctatga 60
cgttagcggc ggacgggtga gtaacacgtg ggcaacctgc ctgtaagact gggataactt 120
35 cgggaaaccg aagctaatac cggataggat cttctccttc atgggagatg attgaaagat 180
ggtttcggct atcacttaca gatgggcccg cgggtgcatta gctagttggt gaggtaacgg 240
ctcaccaagg caacgatgca tagccgacct gagagggtga tcggccacac tgggactgag 300
40 acacggccca nactcctacg ggaggcagca gtaggggaatc ttccgcaatg gacgaaagtc 360
tgacggagca acgccgctg agtgatgaag gctttcgggt cgtaaaactc tgttgtagg 420
45 gaagaacaag tacaagagta actgcttgta ccttgacggg acctaaccag aaagccacgg 480
ttaactacgt gccagcagcc gtggtataac gtaggtggca agcgttatcc ggaattattg 540
ggcgtaaagc gcgcgcaggg ggtttcttaa gtctgatgtg aaagcccacg gctcaaccgt 600
50 ggagggtcat tggaaactgg ggaacttgag tgcagaagag aaaagcggaa ttccacgtgt 660
agcgggtgaaa tgcgtagaga tgtggaggaa caccagtggc gaaggcggct ttttgggtctg 720
55 taactgacgc tgaggcgcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc 780
acgccgtaaa cgatgagtgc taagtgttag agggtttccg ccctttagtg ctgcagctaa 840
cgcattaagc actccgcctg gggagtacgg tcgcaagact gaaactcaaa ggaattgacg 900
60 ggggcccgca caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc 960

65

ES 2 334 147 T3

```

    aggtcttgac atcctctgac aactctagag atagagcgtt ccccttcggg ggacagagtg   1020
    acagggtggtg catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgcaac   1080
5    gagcgcaacc cttgatctta gttgccagca ttnagttggg cactctaagg tgactgccgg   1140
    tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gacctgggct   1200
10   acacacgtgc tacaatggat ggtacaaagg gctgcaagac cgcgaggtca agccaatccc   1260
    ataaaaccat tctcagttcg gattgtaggc tgcaactcgc ctacatgaag ctggaatcgc   1320
    tagtaatcgc ggatcagcat gccgcggtga atacgttccc gggccttgta cacaccgcc   1380
15   gtcacaccac gagagtttgt aacacccgaa gtcggtggag taaccgtaag gagctagccg   1440
    cctaaggtgg gacagatgat tggggtgaag tcgtaacaag gtagccg                   1487

```

```

20 <210> 2
    <211> 1479
    <212> ADN
    <213> Bacillus subtilis
25 <220>
    <221> misc_feature

    <222> (144)..(144)
30 <223> n es a, c, g, o t
    <220>
    <221> misc_feature
35 <222> (213)..(213)
    <223> n es a, c, g, o t
    <220>
    <221> misc_feature
40 <222> (244)..(244)
    <223> n es a, c, g, o t
    <220>
    <221> misc_feature
45 <222> (255)..(255)
    <223> n es a, c, g, o t
    <220>
50 <221> misc_feature
    <222> (303)..(303)
    <223> n es a, c, g, o t
55 <400> 2

```

```

    ggcgtgccta atacatgcaa gtcgagcggg cagatgggag cttgctccct gatgtagcgg   60
    gcggacgggt gagtaacacg tgggtaacct gcctgtaaga ctgggataac tccgggaaac   120
60   cggggctaata accggatggt tgtntgaacc gcatggttca aacataaaag gtggcttcgg   180
    ctaccactta cagatggacc cgcggcgcgat tanctagttg gtgaggtaac ggctcaccaa   240
65   ggcnacgatg cgtanccgac ctgagagggg gatcggccac actgggactg agacacggcc   300

```

ES 2 334 147 T3

	canactccta cgggaggcag cagtagggaa tcttccgcaa tggacgaaag tctgacggag	360
5	caacgccgcg tgagtgatga aggttttcgg atcgtaaagc tctggtgta ggaagaaca	420
	agtgccgttc aaatagggcg gcaccttgac ggtacctaac cagaaagcca cggttaacta	480
	cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggtg gcaagcgttg tccggaatta ttgggcgtaa	540
10	agggctcgca ggcggtttct taagtctgat gtgaaagccc ccggctcaac cggggagggt	600
	cattggaaac tggggaactt gagtgcagaa gaggagagtg gaattccacg tgtagcggtg	660
15	aaatgcgtag agatgtggag gaacaccagt ggcgaaggcg actctctggt ctgtaactga	720
	cgctgaggag cgaagcgtg gggagcgaac aggattagat accctggtag tccacgccgt	780
	aaacgatgag tgctaagtgt tagggggttt ccgcccctta gtgctgcagc taacgcatta	840
20	agcactccgc ctggggagta cggtcgcaag actgaaactc aaaggaattg acgggggccc	900
	gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt accaggtctt	960
25	gacatcctct gacaatccta gaagatagga cgtccccttc gggggcagag tgacagggtg	1020
	tgcatggttg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcga	1080
	cccttgatct tagttgccag cattcagttg ggcactctaa ggtgactgcc ggtgacaaac	1140
30	cggaggaagg tggggatgac gtcaaatcat catgcccctt atgacctggg ctacacacgt	1200
	gctacaatgg acagaacaaa gggcagcgaa accgcgaggt taagccaatc ccacaaatct	1260
35	gttctcagtt cggatcgcag tctgcaactc gactgcgtga agctggaatc gctagtaatc	1320
	gcggatcagc atgccgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc	1380
	acgagagttt gtaacacccg aagtcggtga ggtaaccttt taggagccag ccgccgaagg	1440
40	tgggacagat gattggggtg aagtcgtaac aaggtagcc	1479

45

50

55

60

65