

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-528044
(P2024-528044A)

(43)公表日 令和6年7月26日(2024.7.26)

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 0 5 F 11/08 (2006.01) C 0 5 F 11/08 4 B 0 6 5

C 1 2 N 1/20 (2006.01) C 1 2 N 1/20 A 4 H 0 6 1

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全20頁)			
(21)出願番号	特願2024-505242(P2024-505242)	(71)出願人	524036310
(86)(22)出願日	令和4年7月28日(2022.7.28)		フェルティベリア, エセ. アー.
(85)翻訳文提出日	令和6年3月19日(2024.3.19)		スペイン国 2 8 0 3 6 マドリード ア
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/071273		グスティン デ フォクサ 2 7 プランタ
(87)国際公開番号	WO2023/006917		1 1
(87)国際公開日	令和5年2月2日(2023.2.2)	(74)代理人	110000796
(31)優先権主張番号	21382702.5		弁理士法人三枝国際特許事務所
(32)優先日	令和3年7月28日(2021.7.28)	(72)発明者	ゴンサレス アンドレス フェルナンド
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		スペイン国 2 4 0 0 4 レオン アベニ
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(72)発明者	バルケーロ キロス マルシア パウリーナ
			スペイン国 2 4 0 0 4 レオン アベニ
			ーダ デ ラ ファクルターダ 2 5 ウニ
			ベルシダー デ レオン
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 硝酸塩の溶脱を防止する生物学的組成物

(57)【要約】

本発明は、土壌硝酸塩の蓄積を低減させる微生物組成物及びそれらを含む肥料、並びに窒素溶脱を回避するためのそれらの使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 つの好気性根圏微生物を含む組成物を含む肥料であって、該微生物がそのゲノム内に、少なくとも 1 つの硝酸レダクターゼ遺伝子と、少なくとも 1 つの亜硝酸レダクターゼ遺伝子とを含み、唯一の窒素源として硝酸塩を含む最小増殖培地中で前記微生物を培養する場合、前記微生物が硝酸塩をアンモニウムに還元し、該肥料が、窒素肥料、リン酸肥料、カリウム肥料、NP 化合物肥料、PK 化合物肥料、NK 化合物肥料又は NPK 化合物肥料、石灰石改良剤、マグネシウム改良剤、硫黄改良剤、カルシウムと硫黄との改良剤、水分保持改良剤、シリカ改良剤、及び有機改良剤からなる群より選択される、肥料。

10

【請求項 2】

前記組成物が、組成物 1 グラム当たり 10^3 CFU $\sim 5 \times 10^{12}$ CFU、好ましくは組成物 1 グラム当たり 10^5 CFU $\sim 10^{11}$ CFU、より好ましくは組成物 1 グラム当たり 10^6 CFU $\sim 10^{10}$ CFU を含む、請求項 1 に記載の肥料。

【請求項 3】

前記微生物がそのゲノム内に *nrfA* 遺伝子を含まない、請求項 1 又は 2 に記載の肥料。

【請求項 4】

前記微生物が硝酸塩から N_2 を生成することができない、請求項 1 $\sim$ 3 のいずれか一項に記載の肥料。

20

【請求項 5】

前記微生物が、遺伝子 *nasB* 又は *nasC* の少なくとも一方と、遺伝子 *nasD* 又は *nasE* の少なくとも一方とを含む、請求項 1 $\sim$ 4 のいずれか一項に記載の肥料。

【請求項 6】

前記微生物がグラム+である、請求項 1 $\sim$ 5 のいずれか一項に記載の肥料。

【請求項 7】

前記微生物がバチルス属の一種であり、好ましくは前記微生物が枯草菌種又はバチルス・メガテリウム種のものである、請求項 1 $\sim$ 6 のいずれか一項に記載の肥料。

【請求項 8】

前記微生物が、CECT 30572 株、CECT 30573 株、又は両方の組合せである、請求項 1 $\sim$ 7 のいずれか一項に記載の肥料。

30

【請求項 9】

前記肥料が、肥料 1 グラム当たり 10^2 CFU $\sim 10^{10}$ CFU、好ましくは肥料 1 グラム当たり 10^3 CFU $\sim 10^9$ CFU、より好ましくは肥料 1 グラム当たり 10^4 CFU $\sim 10^8$ CFU を含む、請求項 1 $\sim$ 8 のいずれか一項に記載の肥料。

【請求項 10】

前記肥料が、リン酸肥料、カリウム肥料、NP 化合物肥料、PK 化合物肥料、NK 化合物肥料又は NPK 化合物肥料からなる群より選択される、請求項 1 $\sim$ 9 のいずれか一項に記載の肥料。

【請求項 11】

前記肥料が、固体又は液体の無機肥料、有機無機肥料又は有機肥料である、請求項 1 $\sim$ 10 のいずれか一項に記載の肥料。

40

【請求項 12】

前記微生物が、トレハロース、カロブガム又はキサンタンガム等の微生物保護化合物によって保護される、請求項 1 $\sim$ 11 のいずれか一項に記載の肥料。

【請求項 13】

窒素溶脱を防止するための、及び／又は全般的な作物の生産力又は作物収量を高めるための、少なくとも 1 つの好気性根圏微生物を含む組成物の使用であって、該微生物がそのゲノム内に、少なくとも 1 つの硝酸レダクターゼ遺伝子と、少なくとも 1 つの亜硝酸レダクターゼ遺伝子とを含み、唯一の窒素源として硝酸塩を含む最小増殖培地中で前記微生物

50

を培養する場合、前記微生物が硝酸塩をアンモニウムに還元する、組成物の使用、又は請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の肥料の使用。

【請求項 14】

前記組成物又は肥料が、そのまま又は有機若しくは無機担体と組み合わせて土壤に直接施用されるか、又は、前記組成物が、灌漑用水又は堆肥又は土壤改質剤において土壤に施用されるか、又は、前記組成物が播種前に種子に施用される、請求項 13 に記載の組成物又は肥料の使用。

【請求項 15】

N_2O の放出を防止するための、少なくとも 1 つの好気性根圏微生物を含む組成物の使用であって、該微生物がそのゲノム内に、少なくとも 1 つの硝酸レダクターゼ遺伝子と、少なくとも 1 つの亜硝酸レダクターゼ遺伝子とを含み、唯一の窒素源として硝酸塩を含む最小増殖培地中で前記微生物を培養する場合、前記微生物が硝酸塩をアンモニウムに還元する、組成物の使用、又は請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の肥料の使用。

10

【請求項 16】

少なくとも 1 つの好気性根圏微生物を含む組成物であって、該微生物がそのゲノム内に、少なくとも 1 つの硝酸レダクターゼ遺伝子と、少なくとも 1 つの亜硝酸レダクターゼ遺伝子とを含み、唯一の窒素源として硝酸塩を含む最小増殖培地中で前記微生物を培養する場合、前記微生物が硝酸塩をアンモニウムに還元し、前記微生物が、C E C T 30572 株、C E C T 30573 株、又は両方の組合せである、組成物。

20

【請求項 17】

窒素溶脱を防止するための、全般的な作物の生産力若しくは作物収量を高めるための、又は N_2O の放出を防止するための、請求項 16 に記載の組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は農業分野に属する。本発明は、土壤硝酸塩の蓄積を低減させる微生物組成物及びそれらを含む肥料、並びに窒素溶脱を回避するためのそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

溶脱は、土壤断面を通る水の流れ又は排水に硝酸塩が同伴することである。結果として、窒素はより深い層に輸送され、作物の根に届かなくなる。硝酸塩は水に溶解し、土壤コロイドと相互作用せず、移動性が非常に高いため、硝酸塩は溶脱プロセスを経て、地下水及び地表水に到達し、水質汚染の問題を引き起こす。対照的に、アンモニウムイオンは土壤のコロイドに吸着するため、溶脱しない。

30

【0003】

肥料により提供される窒素は、土壤に取り込まれる際に複数の行先を有する。作物による窒素の使用率が 60% 又は 70% を超えることはめったにない。加えて、より効率の良い窒素肥料、例えば徐放性の窒素肥料が求められており、これは、窒素損失に関する環境傾向、及び作物サイクル全体にわたる窒素の必要性に関する農業上の理由により奨励されている。この目的は、ウレアーゼ及び硝化の阻害剤を使用することによって達成することができる。ウレアーゼ及び硝化の阻害剤は、農業生産力を高め、また汚染物質の放出及び浸出液を削減することを目的とする無機窒素肥料に最もよく使用されるサプリメントである。これまでに確認されている主な硝化阻害剤の幾つかは、ジシアナミド、3-メチルピラゾール、1-グアニル-3-メチルピラゾールニトレート、3,4-ジメチルピラゾール、3,4-ジメチルピラゾールホスフェート、1H-1,2,4-トリアゾール、3-アミノ-1H-1,2,4-トリアゾール、4-クロロ-3-メチルピラゾール及びニトラピリンである。これまでに確認されている主なウレアーゼ活性阻害剤の幾つかは、フェニルホスホロジアミデート、N-(n-ブチル)リン酸ジアミド、N-(n-ブチル)チオリン酸トリアミド、N-ジアミノホスホリル-N'-(4-メトキシフェニル)-尿素、N-ジアミノホスホリル-尿素、N-ジアミノホスホリル-N'-フェニル-尿素

40

50

、メチルジアミノホスホリルカルバメート、ベンジルジアミノホスホリルカルバメート、イソプロピルジアミノホスホリルカルバメート及びアンモニウムチオシアネートである。

【0004】

農業システムには、窒素を変換して輸送する一連の相互作用及びプロセスがあり、それらは全ていわゆる窒素サイクルに含まれる。窒素はこのサイクル内において様々な形態で存在する。窒素の最大の供給源及び貯蔵物は、地球の大気の78%を占める N_2 ガスである。しかしながら、高等植物は主に土壌溶液から NO_3^- 及び NH_4^+ の形態で窒素を吸収する。気体窒素の土壌への取込みは固定プロセスを通じて生じ、該固定プロセスでは、気体窒素が、土壌中に存在する共生及び非共生微生物（生物学的固定）、窒素化合物の乾式及び湿式堆積（暴風雨中及び大気粉塵による）、窒素肥料を合成するための産業プロセス（産業的固定）を介して取り込まれる。固定プロセスでは、大抵の場合、 N_2 が還元して NH_3 となる。取り込まれた窒素は主に有機的に土壌に蓄積され、これは土壌中に存在する窒素の90%超と想定される。有機形態は植物によって直接同化されないが、無機窒素への変換を経た後に同化される。主な無機形態はアンモニウム（ NH_4^+ ）、亜硝酸塩（ NO_2^- ）及び硝酸塩（ NO_3^- ）であり、通常、土壌中の全窒素の2%~5%に相当する。有機窒素から無機窒素への変換は、幾つかの段階で起こる無機化、初めに大きなタンパク質分子の分解（アミノ化）、次にアンモニア化により、 NH_4^+ に変換することによって行われる。アンモニウムは植物によって直接使用され、硝化され、固定化され、揮発するか、又は土壌交換複合体中に保持される。

【0005】

硝化はアンモニウムから硝酸塩への酸化であり、基本的に細菌の作用により二段階で行われる。第1段階では、細菌がアンモニアを亜硝酸塩（ NO_2^- ）へと酸化させる。第2段階では、亜硝酸塩が酸化して硝酸塩となる。土壌交換複合体により保持される NH_4^+ とは対照的に、 NO_2^- 及び NO_3^- は土壌溶液中で移動性である。そのため、これらのイオンは、植物の根によって土壌水分と共に吸収されるか、又は土壌断面を通過して排水と共に徐々に溶脱する。

【0006】

NO_3^- は土壌中の微生物によって還元され得る。硝酸塩の還元には様々な代謝経路、すなわち、脱窒、アンモニウムへの異化的硝酸還元（DNRA）及びアンモニウムへの同化的硝酸還元（ANRA）がある。

【0007】

また、無機形態が大気中へと移行する気体に転換されるため、土壌から窒素が失われる。これらの窒素は揮発及び脱窒によって生成される。揮発は、アンモニア態窒素が水溶液から NH_3 （揮発性ガス）として大気へ失われるプロセスである。脱窒は、細菌によって嫌気条件下で土壌中の硝酸塩及び亜硝酸塩が N_2O 又は N_2 等のガスに変換することである。亜酸化窒素（ NO 、 N_2O ）は、硝酸塩から N_2 への変換の不完全な生成物であり、温室効果ガスとして、気候変動の一因となっている。

【0008】

窒素溶脱を防止し、また環境にやさしい肥料が必要とされている。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、作物の土壌における窒素溶脱の問題に対する解決策を提供する。その上、提供する解決策は環境にやさしいものである。本発明者らは、硝酸塩をアンモニウムに還元することができる好気性根圏微生物が、単独で又は肥料と組み合わせて土壌に添加されると、土壌からの窒素溶脱を低減させるのに有効であることを見出した。

【0010】

したがって、第1の態様において、本発明は、少なくとも1つの好気性根圏微生物を含む組成物であって、該微生物がそのゲノム内に、少なくとも1つの硝酸レダクターゼ遺伝子と、少なくとも1つの亜硝酸レダクターゼ遺伝子とを含み、唯一の窒素源として硝酸塩を含む最小増殖培地中で微生物を培養する場合、微生物が硝酸塩をアンモニウムに還元す

10

20

30

40

50

る、組成物に関する。

【0011】

第2の態様において、本発明は、第1の態様による組成物を含む肥料に関する。

【0012】

第3の態様において、本発明は、窒素溶脱を防止するための、及び／又は全般的な作物の生産力又は作物収量を高めるための、第1の態様の組成物又は第2の態様の肥料の使用に関する。

【0013】

第4の態様において、本発明は、 N_2O の放出を防止するための、第1の態様の組成物又は第2の態様の肥料の使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】CBLUT9（枯草菌（*Bacillus subtilis*））株及びRPVPMO04（バチルス・メガテリウム（*Bacillus megaterium*））株のそれぞれで処理した土壌、又は未処理の土壌（対照）中の60日間にわたる総無機窒素の漸進的な変化を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、窒素溶脱の問題に対する自然的な解決策を提供するため、作物土壌における化学的な硝化阻害剤の使用を回避することができる。

【0016】

本発明の第1の態様の組成物の微生物に関して、「好気性」という用語は、含酸素環境で生存及び増殖することができる微生物を指し、この含酸素環境は、条件的（代替的に含酸素環境又は酸素不含環境で生存及び増殖することができる）又は厳密（含酸素環境でのみ生存及び増殖することができる）なもののいずれかである。「根圏（rhizospheric）」という用語は、本明細書で使用される場合、根圏から単離された微生物を指す。好ましい実施形態において、微生物は植物成長促進根圏細菌（PGPR）である。

【0017】

硝酸レダクターゼ遺伝子は、硝酸塩を亜硝酸塩に変換することができる酵素をコードするヌクレオチド配列である。亜硝酸レダクターゼ遺伝子は、亜硝酸塩をアンモニウムに変換することができる酵素をコードするヌクレオチド配列である。好ましい実施形態では、微生物のゲノム内の硝酸レダクターゼ遺伝子及び亜硝酸レダクターゼ遺伝子が発現する。アンモニウムの生成は最小増殖培地において試験する： $0.6\text{ g/l KH}_2\text{PO}_4$ 、 $0.4\text{ g/l MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 4 g/l グルコース、 8 g/l マンニトール、 8 g/l ビルビン酸ナトリウム、 1 ml/l ビタミン溶液及び 1 ml/l 微量元素（Berger sen et al., 1961 Aust J Biol Sci 14: 349-360）、並びに唯一の窒素源として 1 g/l KNO_3 。試験は次のように2度行う。 5 ml の増殖培地を入れた試験管に微生物を接種し、 28°C で72時間インキュベートする。アンモニウムの存在は、強アルカリ性溶液中でアンモニアと反応し、アンモニア濃度に正比例して黄色複合体を生成するネスラー試薬（ K_2HgI_4 ）に基づく比色アッセイ、例えば、商用の比色試験VACUettes KIT Ammonia（CHEMetrics）により試験する。

【0018】

第1の態様の好ましい実施形態において、組成物は、組成物1グラム当たり $10^3\text{ CFU} \sim 5 \times 10^{12}\text{ CFU}$ 、好ましくは組成物1グラム当たり $10^5\text{ CFU} \sim 10^{11}\text{ CFU}$ 、より好ましくは組成物1グラム当たり $10^6\text{ CFU} \sim 10^{10}\text{ CFU}$ を含む。

【0019】

第1の態様の好ましい実施形態において、微生物は、そのゲノム内にnrfA遺伝子を含まない。この遺伝子は、DNRAのマーカーと考えられる。そのため、微生物がDNRAではなくANRAを実施することが好ましい。

【0020】

第1の態様の好ましい実施形態において、微生物が硝酸塩から N_2 を生成することはで

10

20

30

40

50

きない。微生物の硝酸塩からの窒素 N_2 の生成は、次のように試験される。5 g / l ペプトン、3 g / l 肉抽出物、及び窒素源として 1 g / l 硝酸カリウムからなる硝酸還元アッセイ用の従来の増殖培地中で微生物を増殖し、28℃で48時間インキュベートする。脱窒微生物が、増殖培地中に存在する硝酸塩 (NO_3^-) を気体窒素に還元することにより、インキュベーション後の硝酸塩及び亜硝酸塩の非存在によって脱窒微生物を検出することができる。この目的のために、インキュベーション後、微生物懸濁液を、亜硝酸塩を赤色に染色する反応性 NIT 1 (0.8 g のスルファニル酸 + 100 ml 酢酸 5 N) + NIT 2 (0.6 g N-N-ジメチル-1-ナフチルアミン + 100 ml 酢酸 5 N) で処理する。その後、試料が染色しなければ、硝酸塩を赤色に染色する亜鉛末で処理する。結果として、脱窒微生物の場合、試料は2つの染色工程のいずれにおいても染色しない。

10

【0021】

第1の態様の好ましい実施形態において、微生物は、遺伝子 *nasB* 又は *nasC* の少なくとも一方と、遺伝子 *nasD* 及び *nasE* の少なくとも一方とを含む。好ましい実施形態において、遺伝子 *nasB*、*nasC*、*nasD* 及び *nasE* が微生物によって発現するため、それらの発現は、例えば RT-qPCR によって検出することができる。

【0022】

第1の態様の好ましい実施形態において、微生物はグラム+である。

【0023】

上記微生物がバチルス属の一種であり、好ましくは上記微生物が枯草菌種又はバチルス・メガテリウム種のものである、上記の請求項のいずれか一項に記載の組成物。好ましい実施形態において、上記微生物は、CECT 30572 株又は CECT 30573 株、又はそれらの組合せである。別の態様において、本発明は、窒素溶脱を防止するための、全般的な作物の生産力若しくは作物収量を高めるための、又は N_2O の放出を防止するための第1の態様の組成物の使用であって、好ましくは微生物が CECT 30572 株若しくは CECT 30573 株、又はそれらの組合せである、使用に関する。

20

【0024】

本発明の第2の態様の肥料に関して、「肥料」という用語は、植物の成長及び生産性を高める化学元素を含有する天然又は人工の物質を指す。好ましい実施形態において、肥料は、窒素肥料、リン酸肥料、カリウム肥料、NP化合物肥料、PK化合物肥料、NK化合物肥料又はNPK化合物肥料、石灰石改良剤、マグネシウム改良剤、硫黄改良剤、カルシウムと硫黄との改良剤、水分保持改良剤、シリカ改良剤、有機改良剤、及び他の土壌調整剤又は土壌補正剤からなる群より選択される。好ましい実施形態において、肥料は、固体又は液体の無機肥料、有機無機肥料又は有機肥料である。好ましい実施形態において、肥料は、リン酸肥料、カリウム肥料、NP化合物肥料、PK化合物肥料、NK化合物肥料又はNPK化合物肥料からなる群より選択される。通常、窒素肥料が 10 kg ~ 500 kg の N / ha で土壌に施用される。

30

【0025】

第2の態様の肥料の好ましい実施形態において、肥料は、肥料 1 グラム当たり 10^2 CFU ~ 10^{10} CFU、好ましくは肥料 1 グラム当たり 10^3 CFU ~ 10^9 CFU、より好ましくは肥料 1 グラム当たり 10^4 CFU ~ 10^8 CFU を含む。好ましい実施形態において、肥料は、土壌 1 g 当たり 10 CFU ~ 10^4 CFU が適用されるように土壌に施用される。

40

【0026】

第2の態様の肥料の好ましい実施形態において、組成物中の微生物は、トレハロース、カロブガム又はキサンタンガム等の微生物保護化合物によって保護される。「微生物保護化合物」という用語は、本明細書で使用される場合、欧州特許第 3085679 号に記載されているように、最確数法に従って微生物の生存を試験する場合に、肥料の生理学的条件下での微生物の生存を可能にする化合物を指す。

【0027】

本発明の第3の態様の好ましい実施形態において、組成物又は肥料は、そのまま又は有

50

機若しくは無機担体、例えば泥炭、バイオ炭、クレイと組み合わせて土壌に直接施用されるか、又は、組成物は、灌漑用水又は堆肥又は土壌改質剤、調整剤若しくは改良剤において土壌に施用されるか、又は、組成物は播種前に種子に施用される。

【実施例】

【0028】

以下の実施例は本発明を例示するものである。

【0029】

硝酸塩の溶脱を防止するのに有用な微生物

2つの細菌株（CBLUT9（枯草菌）及びRPVPMO04（バチルス・メガテリウム））を根圏から単離した。これらの菌株は、それぞれ寄託番号CECT 30572及びCECT 30573でスペイン基準株コレクション（Coleccion Espanola de Cultivos Tipo（CECT））に寄託した。微生物は両方ともグラム+で好気性であり、唯一の窒素源として硝酸塩とともに増殖させると硝酸塩をアンモニウムに還元する。また、上記の方法に従って試験した場合、これらの微生物はいずれも硝酸塩からN₂を生成しない。

【0030】

2つの微生物の全ゲノムのシーケンシングを行った。そのために、細菌株をトリプシン大豆寒天（TSA、Merck）プレート上、28℃で24時間増殖させた。ゲノムDNAは、細菌ゲノムDNA単離キット（NORGEN（商標））を使用し、製造業者のプロトコルに従って取得した。シーケンシングは、ペアエンドライブラリーの調製に際して、Microbes NG（英国）によるIllumina MiSeqシーケンシングプラットフォーム（2×250bp）において実施した。

【0031】

CBLUT9（枯草菌）株及びRPVPMO04（バチルス・メガテリウム）株のゲノム内の特定の遺伝子を探索するために、ソフトウェアGeneious Prime（商標）2020.2.4（Biomatters Ltd.）を使用した。

【0032】

これらの微生物はいずれも、DNRAのマーカーであるnrfA遺伝子をゲノム内に含んでおらず、nrfA遺伝子の存在を探索するためにゲノムマイニングに供したこれらの微生物のいずれにもこの代謝経路が存在しないことを示している。

【0033】

nrfA遺伝子の配列は、バチルス（Bacillus）種のNCBIデータベースから取得し、Geneious PrimeによるツールBlast（Megablast）を使用して対応するゲノム内で検索した。結果を表1に示す。

【0034】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. *nrfA* 遺伝子の非存在；反応：亜硝酸塩＞アンモニウム；代謝経路：D N R A；
出典：Uniprot 又は KEGG 2020。

遺伝子名	タンパク質名	遺伝子配列のソース	nrfA 遺伝子の配列と指定菌株の配列との類似性	
			CBLUT9 (枯草菌)	RPVPMO04 (バチルス・メガテリウム)
nrfA	窒素同化転写因子 <i>nirA</i> (Uniprot)	バチルス・アゾトフォルマンズ (<i>Bacillus azotoformans</i>) LMG 9581。 受託番号：AJLR01000037.1 遺伝子位置：9926～11395	5% 未満 (非存在)	5% 未満 (非存在)
	亜硝酸レダクターゼ (シトクロム c-552) (KEGG) [EC:1.7.2.2]	バチルス・バタビエンシス (<i>Bacillus bataviensis</i>) LMG 21833、全ゲノム。 受託番号：AJLS01000123.1 遺伝子位置：39386～40837 バチルス・セレンイテリデュセンス (<i>Bacillus selenitireducens</i>) MLS10。受託番号：CP001791.1 遺伝子位置：1494856～1496307		
		バチルス・ベバリジイ (<i>Bacillus beveridgei</i>) 株 MLTeJB、完全ゲノム。受託番号：CP012502.1 遺伝子位置：904052～905503 バチルス・ビレティ (<i>Bacillus vireti</i>) LMG 21834。受託番号：ALAN01000129.1 遺伝子位置：14648～16099		

【0035】

硝酸／亜硝酸レダクターゼ遺伝子

代謝経路 ANRA に関与する硝酸レダクターゼ及び亜硝酸レダクターゼ遺伝子の存在を探索するために、細菌株 CBLUT9 (枯草菌) 及び RPVPMO04 (バチルス・メガテリウム) をゲノムマイニングに供した。

【0036】

全ゲノム配列は上記の通り取得し、問題の菌株における特定の遺伝子の存在の探索は、前述と同じツール及び同じ手順を用いて行った。

【0037】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2. ANRA 経路に関与する遺伝子の存在；反応：亜硝酸塩からアンモニウム、又は硝酸塩からアンモニウム。出典 KEGG 2020 又は GenBank。

遺伝子名	タンパク質名	遺伝子配列のソース	類似性*	
			CBLUT9 (枯草菌)	RPVPM004 (バチルス・メガテリウム)
NIT-6	亜硝酸レダクターゼ [NAD(P)H] [EC:1.7.1.4]	枯草菌亜種サブティリス (Bacillus subtilis subsp. subtilis) 168 受託番号 (KEGG 2020): BSU03300	nasD (大サブユニット) 99.7% (存在)	
		枯草菌亜種サブティリス 168: 受託番号 (KEGG 2020): BSU03290	nasE (小サブユニット) 99.1% (存在)	
		バチルス・メガテリウム QM B1551、完全ゲノム 受託番号 (GenBank): P001983.1 遺伝子位置: 1138543~1140957		nasD (大サブユニット) 98.3% (存在) 及び 99.2%
		バチルス・メガテリウム QM B1551、完全ゲノム 受託番号 (GenBank): P001983.1 遺伝子位置: 1140976~1141302		nasE (小サブユニット) 99.2% (存在)
nasBC	硝酸レダクターゼ	バチルス・メガテリウム QM B1551、完全ゲノム 受託番号 (GenBank): CP001983.1 遺伝子位置: 740879~743224	nasB (大サブユニット) 98.5% (存在)	
		バチルス・メガテリウム QM B1551、完全ゲノム 受託番号 (GenBank): CP001983.1 遺伝子位置: 743244~745394	nasC (小サブユニット) 99.2% (存在)	
		枯草菌亜種サブティリス 168: 受託番号 (KEGG 2020): BSU03320		nasB (大サブユニット) 99.3% (存在)
		枯草菌亜種サブティリス 168		nasC (

		受託番号 (KEGG 2020): BSU03310		小サブユニット) 98.9% (存在)
--	--	----------------------------	--	---------------------

* 対応する遺伝子の配列と指定菌株の配列との類似性。

【0038】

アンモニウムへの硝酸塩の還元

CBLUT9 (枯草菌) 株及び RPVPM004 (バチルス・メガテリウム) 株を両方

10

20

30

40

50

、硝酸塩からのアンモニウムの生成について試験した。両方とも、唯一の窒素源として硝酸塩を含む培地中で培養した場合、アンモニウムを生成することが見出された。

【0039】

硝酸塩をアンモニウムに還元する同化的代謝経路（ANRA）を有する細菌は、単独の窒素源として硝酸塩を含有する最小増殖培地中におけるインキュベーション後に、アンモニウムイオンの存在によって検出することができる。アンモニウムイオンは中間種であっても検出することができる、すなわち、アンモニウムイオンは続いて細菌により同化され、細菌のマクロ分子（ $R-NH_2$ ）に変換される。最小増殖培地の組成は、 0.6 g/l KH_2PO_4 、 0.4 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 4 g/l グルコース、 8 g/l のマンニトール、 8 g/l ビルビン酸ナトリウム、 1 ml/l ビタミン溶液及び 1 ml/l の微量元素（Bergersen et al., 1961. Aust J Biol Sci 14: 349-360）、及び唯一の窒素源として 1 g/l NO_3K とした。試験は、 5 ml の上述の増殖培地を入れた試験管内で、細菌を 28°C で72時間インキュベートして2度行った。アンモニウムの存在は、商用の比色試験キット（VACUettes KIT Ammonia、CHEMetrics）を使用して検出した。

10

【0040】

【表3】

表3. 唯一の窒素源として 1 g/l NO_3K を補充した最小増殖培地でインキュベートした両菌株によるアンモニウムイオンの生成（Bergersen et al. 1961. Aust J Biol Sci 14: 349-360）。商用の試験キットVACUettes KIT Ammonia、CHEMetricsを使用した半定量的測定。

20

菌株	識別名	アンモニウムイオン (mg/l 単位の ppm)
RPVPMO04	バチルス・メガテリウム	45
CBLUT-9	枯草菌	15

【0041】

溶脱の防止

CBLUT9（枯草菌）株及びRPVPMO04（バチルス・メガテリウム）株は両方とも、60日間にわたる連続灌漑後に農業用土壌から溶脱する窒素を測定するカラム試験において溶脱の防止に有効であった。試験は、各菌株でコーティングした無機肥料（硝酸アンモニウムカルシウム27%窒素）を、溶脱カラムの上部土壌層に組み込むことによって行った。微生物を含まない対照も含めた。菌株でコーティングした肥料が、どちらの場合も窒素の溶脱を20%~30%低減させることが観察された。

30

【0042】

また、図1に見ることができるように、菌株を土壌に添加した場合、未処理の対照と比較して土壌中の無機窒素レベルが高くなることが観察された。この実験では、土壌 1 kg 当たり 270 mg のN、及び土壌 1 g 当たり $3 \times 10^2\text{ CFU}$ を適用させた。

【0043】

本発明者らはまた、CBLUT9（枯草菌）株及びRPVPMO04（バチルス・メガテリウム）株の両方でコーティングした硝酸アンモニウム肥料を試験し、溶脱プロセスに供する植物を含まないポット内で微生物が硝酸塩をアンモニアに還元することができるかどうかを確認した。これらの試験により、植物のない実際の土壌条件で、硝酸塩をアンモニウムに還元する各菌株による硝酸アンモニウムカルシウム肥料（窒素含量27%）のコーティングが、様々な形態の窒素の溶脱に及ぼす影響を分析することができた。

40

【0044】

処理は、CBLUT9（枯草菌）株及びRPVPMO04（バチルス・メガテリウム）株をそれぞれ1%（培養液の体積／肥料の重量）の用量でコーティングした肥料で構成した。培養液の濃度はどちらの場合も 1 ml 当たり $6 \times 10^8\text{ CFU}$ とした。いずれの場合も、微生物を含む組成物は1重量%カロブガムも含んでいた。

50

【0045】

5日及び20日後に溶脱した硝酸塩（浸出液中のmg/l）を、各菌株を入れたポット及び対照として肥料のみを入れたポットについて試験したところ、以下の結果が得られ、両方の菌株が硝酸塩の溶脱を低減させたことが示された：

【0046】

【表4】

処理	5日目に洗浄	20日目に洗浄
対照	4100	3800
CBLUT9	1280	1450
RPVPMO04	1480	1650

10

【0047】

この実験では、土壌1kg当たり225mgのN、及び土壌1g当たり 6×10^3 CFUを適用させた。

【0048】

本発明者らはまた、カラム内で硝酸塩をアンモニアに還元することができる菌株のそれぞれでコーティングした硫硝安（ammonium sulphonitrate）（ASN）肥料を溶脱プロセスに供して試験した。陰性対照は土壌とし、陽性対照はコーティングしていないASNとした。異なる日に実施した2つの試験では、両方の菌株が、カラムから溶脱する硝酸塩の量を著しく低減させた：

20

【0049】

【表5】

試験	処理	溶脱した NO_3^- (mg)
1	C-（土壌）	1172
1	C+（ASN）	2631
1	CBLUT9	1667
1	RPVPMO04	1907
2	C-（土壌）	1202
2	C+（ASN）	3271
2	CBLUT9	1771
2	RPVPMO04	2175

30

【0050】

この実験では、土壌1kg当たり148mgのN、及び土壌1g当たり 1.71×10^2 CFUを適用させた。

【0051】

生物刺激効果、及び施肥効率の向上

植物を用いたマイクロコズム（Microcosmos）試験は以下の条件で実施した：

農業用土壌。pH：中性。肥料：NPK 22-10-6。作物：トウモロコシ。期間：5週間。

40

【0052】

以下の表の結果は、土壌中の $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 比の低下による環境への効果と、バイオマスの結果による生物刺激効果とを実証している。また、より高い施肥効率を観察される。2つの菌株であるCBLUT9及びRPVPMO04を試験し、植物に何も添加しなかった対照（対照0）に加えて、NPK肥料のみを含む対照（微生物を含まないNPK）も含めた。

【0053】

50

【表 6】

	C B L U T 9	R P V P M O 0 4	微生物を含まない N P K	対照 0
新鮮重量 (g / 植物)	2 5 . 2 (+ 1 1 %)	2 8 . 2 (+ 2 4 %)	2 2 . 8	1 1 . 3
乾燥重量 (g / 植物)	2 . 8 (+ 1 7 %)	3 . 1 (+ 2 9 %)	2 . 4	1 . 3
草高 (c m)	5 9 . 8 (+ 2 0 %)	5 3 . 1 (+ 6 %)	5 0 . 0	4 2 . 9
N の抽出量 (m g / 植物)	4 7 . 3	5 3 . 4	4 8 . 9	1 5 . 7
窒素の生理学的効率 ($P E = (Y - Y_0) / (U - U_0)$; Y (収量、乾燥バイオマスの g)、U (窒素取込み m g))	0 . 0 4 7 (+ 4 2 %)	0 . 0 4 8 (+ 4 5 %)	0 . 0 3 3	
内部窒素利用効率 I E (増産量 / 窒素抽出量)	0 . 0 3 2 (+ 4 5 %)	0 . 0 3 4 (+ 5 5 %)	0 . 0 2 2	
試験終了時の $N O_3^- / N H_4^+$	1 3 . 8 (- 2 2 %)	1 3 . 2 (- 2 5 %)	1 7 . 7	

P E : 窒素の生理学的効率

Y : 収量 (バイオマスの g)。

Y₀ : 対照 0 処理での収量 (バイオマスの g)

U : 植物バイオマスが獲得した養分 (窒素取込み) 量 (m g / 植物)

U₀ : 対照 0 処理 (窒素添加 0) の植物バイオマスが獲得した養分 (窒素取込み) 量 (m g / 植物)

【 0 0 5 4 】

括弧内は、微生物を含まない N P K に対するパーセントの差である。

【 0 0 5 5 】

この実験では、土壌 1 k g 当たり 5 0 m g の N、及び土壌 1 g 当たり $1 . 3 7 \times 1 0^3$ C F U を適用させた。

【 0 0 5 6 】

生物刺激効果

最初のフィールド試験は以下の条件で実施した：

2 0 1 6 年、スペインのバリャドリードでのトウモロコシ栽培。肥料：N P K 1 8 - 8 - 1 0。

【 0 0 5 7 】

10

20

30

40

50

【表 7】

	N P Kに対する相対パフォーマンス (%)	A E
対照 0	5 1	
N P K	1 0 0	3 2
N P K + C B L U T 9	1 0 5	3 5
N P K + R P V P M O O 4	1 0 7	3 7

$N P K$ に対する相対パフォーマンス $= 100 \times (Y - Y_{N P K}) / Y_{N P K}$

$A E$ = 供給した養分の農業効率 (適用する養分 1 k g 当たりの収量増加 k g) $= (Y - Y_0) / F$

Y = 収量 (トウモロコシ) (k g / h a)

Y_0 = 対照 0 処理での収量 (k g / h a)

$Y_{N P K}$ = N P K 処理での収量 (k g / h a)

F = 作物が利用することができる養分の量 (肥料 N の k g / h a)

生物刺激効果がより多くの収穫をもたらす。

10

【0058】

この実験では、1 h a 当たり 220 k g の N、及び土壌 1 g 当たり 5.5×10^{11} C F U を適用させた。

【0059】

第 2 のフィールド試験は以下の条件で実施した：

2016 年、スペインのバリャドリッドでのトウモロコシ栽培。肥料：N P K 20-5-10。

【0060】

【表 8】

	作物サイクル全体にわたる 平均 $N - NO_3^-$	作物サイクル全体にわたる 平均 $N - NO_3^- / N - NH_4^+$
C (N P K)	35.0	21.0
N P K + C B L U T 9	32.1	15.3
変化量 (%)	-8.3	-26.6
N P K + R P V P M O O 4	31.3	13.4
変化量 (%)	-10.6	-36.2

20

30

【0061】

土壌中の硝酸塩濃度が低下し、また NO_3^- / NH_4^+ 比が低下するという環境への効果を実証されている。

【0062】

この実験では、1 h a 当たり 160 k g の N、及び土壌 1 g 当たり 5.5×10^{11} C F U を適用させた。

【0063】

N_2O の放出の削減

制御条件下での試験では、湿った土壌を備え、植物のないポットにおいて、肥料施用後 14 日間 N_2O の放出を測定した。

【0064】

C B L U T 9 株及び R P V P M O O 4 株は、土壌に施用した場合に肥料からの N_2O の放出を削減することができた。本発明者らは、これらの菌株と共に窒素肥料を添加すると、使用した両方の肥料における N_2O の放出が削減することを見出した。

【0065】

40

50

【表 9】

肥料	菌株	N ₂ Oの累積放出 (N ₂ O-Nのkg/h a)	N ₂ Oの放出の削減
ASN	なし	109.4	
ASN	CBLUT9	84.3	-23%
ASN	RPVPMO04	103.25	-6%
CAN	なし	161.0	
CAN	CBLUT9	123.1	-24%
CAN	RPVPMO04	127.8	-21%

ASN：ニトロ硫酸アンモニウム（窒素26%）

CAN：硝酸アンモニウムカルシウム（窒素27%）

10

【0066】

この実験では、土壌1kg当たり700mgのN、及び土壌1g当たり 7.77×10^2 CFUを適用させた。

【0067】

インキュベーションの支持材（support）は、直径16cm、高さ11.5cmのポットからなるものとした。土壌のかさ密度が 1 g/cm^3 になるように、各ポットに2300gの農業用土壌を加えた。処理を5回繰り返し（実験ブロック）、ポットを各ブロックに無作為に配置した。1日目に、水で満たされた細孔空間（WFPS）60%に達するまで水を各ポットに加えた。次に、選択した種々の肥料製品をポットに施用した。同じ日、肥料製品を施用した1、2時間後に、N₂Oの最初の測定を行った。次の14日間にわたって、異なる日に計10回のN₂O測定を行った。サンプリングは、直径11.5cm、長さ20cmの各ポットにPVCチャンバーを挿入することにより構成した（6cm挿入した）。各チャンバーの上部には開口部があり、サンプリング期間中は密閉PVC蓋で閉じていた。これらの蓋にはゴム隔壁で覆われたサンプリング用の穴があり、チャンバー内の空気をサンプリングするために6mlシリンジを挿入することができた。チャンバーを閉じたら、蓋を閉めたとき（Ti）と20分後（Tf）の2つの時点で内部の空気をサンプリングした。各時点で収集した空気はエクセテナー（exetainer）タイプの真空バイアルに保管した。各バイアルに保管したN₂Oの濃度は、280℃の温度で動作する電子捕獲型検出器（ECD）と、キャリアガスとしてHeを使用するHP-Plot Qカラムとを備えたAgilent 7890Bガスクロマトグラフを使用して分析した。各チャンバー内の2つのN₂O濃度値をサンプリング日毎に取得することで、各チャンバー内の土壌から大気への1日当たりの放出フラックスを算出することができた。この流量値は1日当たりのN₂O-Nの mg/m^2 として表した。同様に、毎日の値の各々を積算することにより、14日間の実験中各チャンバーについて放出されたN₂Oの累積値を算出することができた。

20

30

40

50

【表 10】

PCT

(Original in Electronic Form)

(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

0-1	Form PCT/RO/134 Indications Relating to Deposited Microorganism(s) or Other Biological Material (PCT Rule 13bis)	
0-1-1	Prepared Using	PCT Online Filing Version 3.51.000.275e MT/FOP 20141031/0.20.5.24
0-2	International Application No.	
0-3	Applicant's or agent's file reference	PCT-1049

10

1	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
1-1	page	6
1-2	line	26-29
1-3	Identification of deposit	
1-3-1	Name of depositary institution	CECT Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)
1-3-2	Address of depositary institution	Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia), Spain
1-3-3	Date of deposit	29 March 2022 (29.03.2022)
1-3-4	Accession Number	CECT 30572
1-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations
2	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
2-1	page	6
2-2	line	26-29
2-3	Identification of deposit	
2-3-1	Name of depositary institution	CECT Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)
2-3-2	Address of depositary institution	Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia), Spain
2-3-3	Date of deposit	05 April 2022 (05.04.2022)
2-3-4	Accession Number	CECT 30573
2-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations

20

30

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

0-4	This form was received with the international application: (yes or no)	
0-4-1	Authorized officer	

40

50

PCT

(Original in Electronic Form)
(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

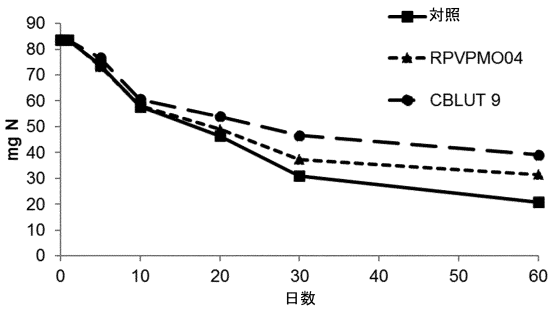
FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

0-5	This form was received by the international Bureau on:	
0-5-1	Authorized officer	

10

【図面】
【図 1】

FIG. 1



20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/071273

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	C12N1/20	C12N9/06
	C05F11/08	C05C11/00
	C12R1/125	C12R1/11
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12N C12R C05F C05G C05C		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAKANO MICHIO M. ET AL: "Nitrogen and Oxygen Regulation of Bacillus subtilis nasDEF Encoding NADH-Dependent Nitrite Reductase by TnrA and ResDE", JOURNAL OF BACTERIOLOGY (PRINT) vol. 180, no. 20 15 October 1998 (1998-10-15), pages 5344-5350, XP055872726, US ISSN: 0021-9193, DOI: 10.1128/JB.180.20.5344-5350.1998 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC107582/pdf/jb005344.pdf the whole document ----- --/--	1-7, 9-12
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		
"&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
19 October 2022		26/10/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Oderwald, Harald

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/071273

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 103 725 654 A (UNIV SHANGHAI JIAOTONG) 16 April 2014 (2014-04-16) the whole document	1, 2, 4-7, 9-15
A	----- YIHUA SUN ET AL: "Nitrous oxide emission by the non-denitrifying, nitrate ammonifier", BMC GENOMICS, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 17, no. 1, 19 January 2016 (2016-01-19), pages 1-11, XP021231269, DOI: 10.1186/S12864-016-2382-2 page 8	3
A	----- SUN BO ET AL: "Bacillus subtilis biofertilizer mitigating agricultural ammonia emission and shifting soil nitrogen cycling microbiomes", ENVIRONMENT INTERNATIONAL, PERGAMON PRESS, US, vol. 144, 30 July 2020 (2020-07-30), XP086288371, ISSN: 0160-4120, DOI: 10.1016/J.ENVINT.2020.105989 [retrieved on 2020-07-30] the whole document	1-17
A	----- WO 2020/205912 A1 (VALENT BIOSCIENCES LLC [US]) 8 October 2020 (2020-10-08) the whole document	1-17

2

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/071273

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN 103725654	A	16-04-2014	NONE
WO 2020205912	A1	08-10-2020	AU 2020256175 A1 28-10-2021
			CA 3131955 A1 08-10-2020
			CR 20210502 A 02-02-2022
			EC SP21073017 A 25-02-2022
			EP 3947323 A1 09-02-2022
			US 2020308073 A1 01-10-2020
			WO 2020205912 A1 08-10-2020
			ZA 202107381 B 31-08-2022

10

20

30

40

50

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,J
M,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY
,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,T
H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 カルビンテロ サルヴォ ホセ マヌエル
スペイン国 28036 マドリード アグスティン デ フォクサ 27 プランタ 11
- (72)発明者 ブラニャス ラサラ ハビエル
スペイン国 28036 マドリード アグスティン デ フォクサ 27 プランタ 11
- (72)発明者 ラウレアノ マリーノ アナ マリア
スペイン国 28036 マドリード カジェ アグスティン デ フォクサ 27 プランタ 11 フ
エルティベリア, エセ.アー.

Fターム(参考) 4B065 AA17X AA19X AC14 BA22 CA16 CA49
4H061 AA01 AA04 BB01 BB21 BB51 DD16 EE02 EE66 FF02 FF06