

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 204**

21 Número de solicitud: 200931240

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C07K 14/345 (2006.01)

C04B 41/00 (2006.01)

C12R 1/08 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **22.12.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **12.03.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
12.03.2012

71 Solicitante/s:
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC)
SERRANO 117
28006 MADRID, ES**

72 Inventor/es:
**GONZALEZ GRAU, JUAN MIGUEL y
PORTILLO GUISADO, MARIA CARMEN**

74 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

54 Título: **MICROORGANISMO HETERÓTROFO TERMÓFILO DE LA ESPECIE BACTERIANA
BREVIBACILLUS THERMORUBER Y SU USO PARA LA PRODUCCION DE SULFATOS**

57 Resumen:

Microorganismo heterótrofo termófilo de la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* y su uso para la producción de sulfatos.

La presente invención se refiere a un microorganismo de la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* con número de acceso CECT7629. También se refiere al uso de un microorganismo que pertenece a la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* o de una población bacteriana que comprende un microorganismo de la especie *Brevibacillus thermoruber*, para la producción de sulfato, donde preferiblemente el sulfato forma un precipitado, o a un método concreto para la producción de sulfato. Asimismo, la presente invención se refiere al uso de dichos microorganismos para consolidar y/o remediar un material inerte mediante el sulfato precipitado y a un método concreto para la consolidación y/o remediación de dicho material inerte.

DESCRIPCIÓN

Microorganismo heterótrofo termófilo de la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* y su uso para la producción de sulfatos

5 La presente invención se refiere a un microorganismo de la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* con número de acceso CECT7629. También se refiere al uso de un microorganismo que pertenece a la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* o de una población bacteriana que comprende un microorganismo de la especie *Brevibacillus thermoruber*, para la producción de

10 sulfato, donde preferiblemente el sulfato forma un precipitado, o a un método concreto para la producción de sulfato. Asimismo, la presente invención se refiere al uso de dichos microorganismos para consolidar y/o remediar un material inerte mediante el sulfato precipitado y a un método concreto para la consolidación y/o remediación de dicho material inerte.

15

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Frente al deterioro de materiales rocosos, por ejemplo edificios y monumentos,

20 se ha propuesto que podrían ser útil diversos mecanismos de compactación de materiales disgregados (como por ejemplo, arenas o areniscas) o la impermeabilización de superficies construidas es de importancia para consolidar estructuras y materiales o evitar un progresivo deterioro de superficies y edificios. En este sentido, son conocidos diversos procedimientos

25 para la consolidación de piedras de construcción o superficies de materiales usando bacterias calcinogénicas productoras de CaCO_3 como es el caso de los géneros *Micrococcus* y *Bacillus* para el refuerzo de piedra por precipitación y formación de cristales de CaCO_3 (Tiano et al., 1999. Journal of Microbiological Methods, 36 [1-2]: 139-145), por biomineralización bacteriana usando bacterias

30 productoras de carbonatos, como *Myxococcus xanthus*, que producen la precipitación de carbonato cálcico en la piedra (Jiménez-López et al., 2007. Chemosphere, 68 [10]: 1929-1936) o un procedimiento de protección y/o tratamiento de superficies artificiales por revestimiento de la superficie,

preferiblemente roca calcárea, mediante la incrustación de carbonatos de calcio llevada a cabo por microorganismos, preferiblemente de los géneros *Bacillus* o *Pseudomonas* (ES2064673 T3).

5

Uno de los inconvenientes del uso de carbonatos es que la precipitación y disolución de los mismos depende del pH, por tanto, agua de lluvia (generalmente con un pH ácido, por debajo de 7) puede dar lugar a la disolución de esos precipitados. Esto es lo que ocurre en muchos monumentos y edificios debido al lavado o disolución de minerales. Además, las bacterias propuestas para la remediación de dichos materiales son capaces de crecer a temperaturas ambientales lo que podría originar consecuencias secundarias como resultado de su crecimiento posterior.

10

15 También es conocido el uso de especies del género *Pseudomonas* en procesos de restauración como frescos o monumentos (Ranalli et al., 2005. Journal of Applied Microbiology, 98: 73-83) o utilizando la enzima *Proteasa* purificada de dicha bacteria. En dicha publicación, Ranalli et al., propusieron eliminar compuestos orgánicos (pegamentos, por ejemplo, utilizando
20 *Pseudomonas*).

25

Por tanto, existe la necesidad de compactar materiales excesivamente porosos, remediar materiales que tras erosión o disolución hayan perdido parte de sus componentes minerales, así como impermeabilizar los substratos, superficies, o edificios, entre otras estructuras, por medio de un procedimiento biológico que solucione el problema planteado sin generar efectos derivados, es decir, evitando el crecimiento posterior de los microorganismos así como la disolución de los complejos precipitados.

30

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

- La presente invención se refiere a un microorganismo de la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* con número de acceso CECT7629. La presente invención también se refiere al uso de un microorganismo que pertenece a la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* o de una población bacteriana que comprende un microorganismo de la especie *Brevibacillus thermoruber*, para la producción de sulfato, donde preferiblemente el sulfato forma un precipitado o a un método concreto para la producción de sulfato. Asimismo, la presente invención se refiere al uso de dichos microorganismos para consolidar y/o remediar un material inerte mediante el sulfato precipitado y a un método concreto para la consolidación y/o remediación de dicho material inerte.
- La presente invención se refiere al uso de una cepa de la especie *Brevibacillus thermoruber* (bacteria heterótrofa termófila) capaz de producir sulfatos durante su crecimiento. Aunque los inventores han observado la existencia de especies bacterianas que presentan esas propiedades, han seleccionado la cepa *Brevibacillus thermoruber* CECT7629 porque produce cantidades de sulfatos en una concentración más alta que el resto de cepas ensayadas o conocidas en el estado de la técnica. Esta bacteria crece óptimamente entre 50 y 60°C, con temperaturas máximas de crecimiento de unos 75°C. El medio empleado para su crecimiento es caldo nutritivo (definido en el apartado de ejemplos). Para obtener sulfatos precipitados se puede complementar el medio con cloruro de calcio para obtener sulfato de calcio o yeso como producto final. Las bacterias propuestas producen sulfatos a partir del azufre presente en los nutrientes orgánicos del medio y este proceso no depende de compuestos inorgánicos de azufre en el medio.
- La cepa bacteriana propuesta produce concentraciones de sulfatos superiores a 1 mM en solución y esta cantidad se aumenta considerablemente al complementar el medio, por ejemplo, pero sin limitarse, con cloruro de calcio y precipitar los sulfatos en solución. El crecimiento de esta bacteria se produce

5 en un máximo de unos cinco días, dependiendo de las condiciones de temperatura y nutrientes a que se lleva a cabo dicho crecimiento. En condiciones óptimas, la bacteria termófila propuesta puede alcanzar su máximo crecimiento en uno o dos días. Tras el crecimiento, se puede llevar a cabo un lavado con agua de la suspensión de células y nutrientes proporcionados para eliminar en lo posible los restos del tratamiento.

10 La cepa seleccionada en la presente invención puede usarse, por ejemplo, en la conservación de materiales rocosos, por ejemplo edificios y monumentos, o en la compactación de materiales disgregados (como por ejemplo, arenas o areniscas) o en la impermeabilización de superficies construidas.

15 Un aspecto de la presente invención se refiere a un microorganismo de la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* con número de acceso CECT7629. Tal como se muestra en los ejemplos de la presente invención, la secuenciación de 903 nucleótidos del gen 16S rRNA dió como resultado un 99% de identidad con otras cepas de esta especie al comparar dicha secuencia con las secuencias disponibles de las bases de datos públicas.

20

La clasificación científica de la cepa CECT7629 de la presente invención es: Reino: *Bacteria* / División: *Firmicutes* / Clase: *Bacilli* / Orden: *Bacillales* / Familia: *Paenibacillaceae* / Género: *Brevibacillus* / Especie: *thermoruber*.

25 Dicho microorganismo ha sido depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) el 27 de noviembre de 2009 y le correspondió el nº de depósito CECT7629. La dirección de dicha Autoridad Internacional de depósito es: Universidad de Valencia / Edificio de investigación / Campus de Burjassot / 46100 Burjassot (Valencia).

30

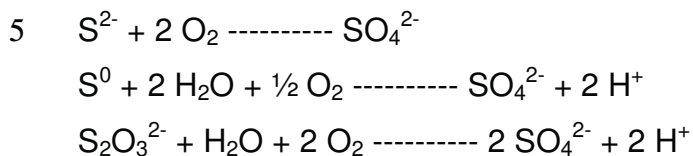
La cepa CECT7629 es capaz de crecer en caldo nutritivo (por litro: Extracto de Carne, 3,0 g; Peptona, 5,0 g; pH 6,8-7,0. Para medio sólido se añaden 20 g de

agar), a una temperatura óptima de crecimiento de 55°C. Las temperaturas mínima y máxima de crecimiento son 40°C y 75°C, respectivamente.

- 5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una población bacteriana que comprende el microorganismo con número de acceso CECT7629. La población bacteriana puede estar formada por otras cepas de microorganismos pertenecientes a la misma especie o a una especie distinta. La población bacteriana es un conjunto de al menos dos células en cualquier fase del estado
- 10 de desarrollo, entre las cuales al menos una es del microorganismo mencionado. El microorganismo de la presente invención puede formar esporas, por tanto, dicho microorganismo puede referirse tanto a una célula esporulada como no esporulada.
- 15 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un microorganismo que pertenece a la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber*, o al uso de una población bacteriana que comprende un microorganismo de la especie *Brevibacillus thermoruber*, para la producción de sulfato. Es decir, este aspecto de la invención se refiere al uso de cualquier cepa de la especie bacteriana
- 20 *Brevibacillus thermoruber* o a una población que comprenda cualquier cepa del microorganismo de la especie *Brevibacillus thermoruber*, para la producción de sulfato

- La bacteria de la presente invención es capaz de crecer a expensas de la
- 25 oxidación de compuestos orgánicos. Existen distintos compuestos orgánicos que contienen azufre, como por ejemplo, las proteínas (en los aminoácidos cisteína y metionina). Cofactores y coenzimas (como la coenzima A y sus derivados entre otros), vitaminas (biotina, vitamina B1, ácido lipoico), o una variedad de compuestos encontrados en la naturaleza como DMSO (sulfóxido de dimetilo) o ácidos húmicos entre otros muchos. En estudios previos, las
 - 30 bacterias que oxidan compuestos reducidos del azufre suelen oxidar comúnmente ácido sulfhídrico (H₂S), azufre elemental (S⁰) o tiosulfato (S₂O₃²⁻),

o cualquier otro compuesto inorgánico reducido del azufre, produciendo sulfato como producto final:



Los compuestos reducidos del azufre de la presente invención tienen origen orgánico ya que, como demuestran los inventores, sólo se observa producción de sulfatos cuando se añade un medio que comprende compuestos orgánicos que contengan azufre y no cuando se añaden compuestos inorgánicos que contienen azufre.

Por tanto, el sulfato producido por la bacteria de la presente invención es el ión sulfato (SO_4^{2-}).

Una realización preferida se refiere al uso del microorganismo que pertenece a la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* con número de acceso CECT7629, o a la población bacteriana que comprende la bacteria *Brevibacillus thermoruber* CECT7629, para la producción de sulfato.

Una realización más preferida de la presente invención se refiere al uso de cualquier microorganismo o de la población bacteriana de la invención, para la producción de un sulfato precipitado, es decir, para producir una sal insoluble de sulfato. El precipitado insoluble de la presente invención puede ser un anión sulfato (ión con dos cargas negativas) unido a cualquier metal divalente (catión con dos cargas positivas) como por ejemplo, pero sin limitarse Be, Mg, Ca, Sr, Ba, Ra, Zn, Cd, Al, Cu, Hg, Fe, Co, Ni, Sn, Pb, Pt, Cr o Mn, o unido a cualquier otro catión que produzca la insolubilización total o parcial del compuesto que se forma, como por ejemplo el Na^+ . Generalmente, el sulfato precipitado es sulfato de calcio, aunque otras opciones, pero sin limitarse, son el sulfato de bario (Ba) y el sulfato de estroncio (Sr). El término “insoluble” empleado en la presente

invención se refiere a que dicho sulfato precipitado no se disuelve en soluciones acuosas en condiciones de temperatura ambiente y a valores de pH entre 4 y 9 que comprende los valores más comunes de pH que suelen encontrarse en substratos naturales y en edificios o construcciones.

En la presente invención se usa el término “cualquier microorganismo de la presente invención” o “cualquier microorganismo de la invención” para referirse a cualquier cepa de la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* o a la cepa que pertenece a la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* con número de acceso CECT7629.

Asimismo, el término “población de la presente invención” o “población de la invención” se refiere a la población bacteriana que comprende cualquier cepa de la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* o se refiere a una población bacteriana que comprende a dicha especie y/o a la cepa que pertenece a la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* con número de acceso CECT7629.

Una realización aún más preferida se refiere al uso de cualquiera de los microorganismos o de la población bacteriana de la presente invención, para consolidar y/o remediar un material inerte por medio de la producción de sulfato precipitado. El término “material inerte” tal como se entiende en la presente invención se refiere a material compuesto en su mayor parte por minerales. El material inerte puede tener procedencia natural, es decir, puede ser cualquier tipo de roca, de cualquier composición mineral, textura o estructura, como por ejemplo, pero sin que sirva para limitarse, calcita, aragonito, o yesos. También puede ser un material inerte artificial, como por ejemplo un material inerte creado para la construcción. Según una realización más preferida el material inerte es un material de construcción. El material de construcción al que se hace referencia en la presente invención puede ser, pero sin limitarse, ladrillo, hormigón, mortero, arcilla, productos de alfarería (por ejemplo pero sin limitarse, teja, ladrillo, porcelana, loza)

El término “consolidar” tal como se entiende en la presente invención se refiere a dar firmeza y solidez a un material inerte. El término “remediar” se refiere a
 5 corregir, enmendar o poner remedio a un daño de un material inerte.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la producción de sulfato que comprende:

- 10 a) inocular un microorganismo que pertenece a la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber*, o de una población bacteriana que comprende un microorganismo de la especie *Brevibacillus thermoruber* en un medio de cultivo que comprende nutrientes orgánicos con azufre, e
 b) incubar el cultivo del paso (a) a una temperatura de entre 40°C y 75°C.

15 Una realización preferida de la invención se refiere al método para la producción de sulfato, donde el microorganismo que pertenece a la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* es la bacteria con número de acceso CECT7629, o la población bacteriana es la población que comprende la
 20 bacteria *Brevibacillus thermoruber* CECT7629.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método para la producción de sulfato, donde la incubación del paso (b) se lleva a cabo a una temperatura de entre 50°C y 60°C.

25 Otra realización más preferida se refiere al método para la producción de un sulfato precipitado que comprende los pasos de cualquier método anterior para la producción de sulfato, donde además el medio de cultivo comprende una sal cuyo catión se una al anión sulfato (SO_4^{2-}), formando un sulfato precipitado.

30 Otra realización aún más preferida de la presente invención se refiere a cualquier método anterior para la producción de sulfato, donde el catión de la sal es calcio, es decir, el sulfato precipitado es sulfato de calcio. Otras sales

preferidas son el sulfato de bario y el sulfato de estroncio ya que son insolubles en agua.

- 5 En adelante se podrá hacer referencia a cualquier método para la producción de sulfato mediante el término “método de producción de sulfatos de la presente invención” o “método de producción de sulfatos de la invención”,

- 10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para consolidar y/o remediar un material, que comprende los pasos del método de producción de sulfatos de la presente invención donde el medio de cultivo comprende una sal cuyo catión se una al anión sulfato (SO_4^{2-}), formando un sulfato precipitado en condiciones de temperatura ambiental, o el método donde la sal es cloruro de calcio, donde además el microorganismo o la población bacteriana de la
15 presente invención se pone en contacto con dicho material. El término “temperatura ambiental” tal como se entiende en la presente invención se refiere a la temperatura que se puede encontrar en cualquier momento del día, en cualquier mes del año, en el ambiente en el que se encuentre el material inerte al que se ha hecho referencia en la presente invención.. El sulfato de calcio es muy poco soluble a temperatura ambiental. Aunque la forma principal
20 cambia de yeso a anhidrita con un punto de inflexión alrededor de los 54°C. El sulfato de calcio tiene un comportamiento anormal en cuanto a su solubilidad y el efecto de la temperatura y pH. El pH, prácticamente no afecta su solubilidad a valores entre 4 y 9.

25

- Una realización preferida se refiere al método para consolidar y/o remediar un material, que además comprende eliminar el microorganismo y/o nutrientes del medio de cultivo, presentes en dicho material. La eliminación de los microorganismos y del medio de cultivo, o de los microorganismos o del medio
30 de cultivo, presentes en dicho material se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido en el estado de la técnica como por ejemplo, pero sin limitarse, mediante lavado de dicho material con una solución acuosa.

Además, el lavado de dicho material puede llevarse a cabo mediante una solución acuosa que puede comprender al menos un agente antimicrobiano.

- 5 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se
- 10 proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

- 15 Con la intención de complementar la descripción que se ha llevado a cabo, así como de ayudar a un mejor entendimiento de las características de la invención, de acuerdo con algunos ejemplos realizados, se muestran aquí, con carácter ilustrativo y no limitante, las siguientes figuras:

- 20 **FIG. 1. Muestra la producción de sulfatos por distintos géneros y cultivos bacterianos y la comparación de las bacterias termófilas que crecen a 50°C y mesófilas que crecen a 25°C.**

- 25 Las bacterias mostradas en dicha gráfica pertenecen a los siguientes géneros:
 1: *Paenibacillus* (Firmicutes) / 2: *Klebsiella* (Proteobacteria gamma) / 3: *Cellulomonas* (Actinobacteria) / 4: *Streptomyces* (Actinobacteria) / 5: *Neocosmopora* (Hongo) / 6: *Enterobacter* (Proteobacteria gamma) / 7: *Bacillus* (Firmicutes) / 8: *Geobacillus* (Firmicutes) / 9: *Geobacillus* (Firmicutes) / 10:
 30 *Brevibacillus* (Firmicutes) / 11: *Geobacillus* (Firmicutes).

FIG. 2. Muestra la producción de sulfatos (A) y crecimiento bacteriano (B) en relación con la concentración de nutrientes orgánicos (distintas concentraciones de caldo nutritivo) por distintos géneros y cultivos bacterianos termófilos que crecen a 50°C.

La concentración de caldo nutritivo mostrada hace referencia al caldo de cultivo cuya composición se ha mostrado en los ejemplos (1), a un caldo de cultivo con el doble de concentración de cada uno de los componentes que el medio 1 (2) y a un caldo de cultivo con una concentración 10 veces menor de cada uno de los componentes que el medio 1 (0,1).

Las bacterias mostradas en dicha gráfica pertenecen a los siguientes géneros: 7: *Bacillus* (Firmicutes) / 8: *Geobacillus* (Firmicutes) / 9: *Geobacillus* (Firmicutes) / 10: *Brevibacillus* (Firmicutes) / 11: *Geobacillus* (Firmicutes).

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos ilustrativos y de carácter no limitante, realizados por los inventores que describen el aislamiento e identificación de las cepas de la presente invención así como su capacidad para la producción de sulfatos.

EJEMPLO 1. Aislamiento e identificación de cepas productoras de sulfatos.

1.1. Aislamiento e identificación de cepas bacterianas termófilas.

Muestras de suelos de las provincias de Teruel y Sevilla se procesaron para el aislamiento de bacterias con capacidad de crecimiento bien a 25°C bien a 50°C, correspondiendo a los rangos de crecimiento de bacterias mesófilas y termófilas, respectivamente. Los cultivos se prepararon en agar nutritivo (3 g de

extracto de carne, 5 g de peptona y 20 g de agar llevado hasta un volumen de 1L con agua. Se ajustó el pH a 7.0 y se esterilizó en autoclave), se inocularon con la muestra natural e incubaron a la temperatura seleccionada.

5

Las colonias obtenidas se aislaron en placa y se identificaron por secuenciación de sus genes 16S rRNA siguiendo procedimientos estándar previamente descritos (González et al. 2003).

- 10 Para identificar las cepas bacterianas aisladas, éstas se cultivaron en caldo nutritivo (3 g de extracto de carne y 5 g de peptona llevado hasta un volumen de 1L con agua. Se ajustó el pH a 7.0 y se esterilizó en autoclave) se centrifugaron en un tubo eppendorf (1.5 ml) y se descartó el sobrenadante. Las células se lisaron y su ADN genómico se extrajo utilizando el kit de purificación
- 15 de ADN *NucleospinFood* (Mackerey-Nügel, Alemania). El ADN obtenido se utilizó directamente como ADN molde en una reacción de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para amplificar un fragmento del gen ARNr 16S. Los cebadores utilizados fueron el 616F (SEQ ID NO: 1) y 907R (SEQ ID NO: 2). Las condiciones de amplificación consisten en un paso a 95°C de 3 minutos,
- 20 seguido de 35 ciclos con pasos de 95°C 15 segundos, 55°C 15 segundos y 72°C 1 minuto, utilizando la ADN polimerasa ExTaq (Takara, Japón). Los productos de amplificación se purificaron con el kit de purificación de productos de PCR (JetQuick, Alemania) y se enviaron al servicio de secuenciación de la empresa Secugen (Madrid). Las secuencias obtenidas se editaron con el
- 25 software Chromas y la secuencia en formato fasta se envió para su comparación en las bases de datos de ADN con el programa Blastn en el National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>).

- 30 El fragmento obtenido mediante la reacción PCR descrita, perteneciente a la cepa CECT7629 de la presente invención, se secuenció, obteniendo una secuencia de 903 nucleótidos del gen que codifica para el 16S rRNA cuya secuencia se facilita en la lista de secuencias adjunta como SEQ ID NO: 3.

Dicho fragmento tiene un 99% identidad con otras cepas pertenecientes a la especie *Brevibacillus thermoruber*.

5 **1.2. Producción de sulfatos de las cepas bacterianas.**

Las bacterias aisladas se utilizaron en experimentos en los que se determinó la producción de sulfatos por cada uno de dichos cultivos. Las cepas aisladas se inocularon en matraces estériles con caldo nutritivo y se incubaron a su
10 temperatura óptima de crecimiento (25 o 50°C). A lo largo del tiempo de incubación, específicamente en las fases exponencial y estacionaria de crecimiento de cada cepa, se midió la concentración de sulfatos en el medio. El procedimiento para estimar la concentración de sulfatos es el descrito por Kolmet et al. (Kolmet et al., 2000. J. Microbiol. Meth., 41: 179-184). La
15 producción de sulfato se estimó como la diferencia entre la concentración calculada y su concentración inicial.

El rango de temperaturas que permite el crecimiento de las cepas aisladas se determinó incubando los cultivos correspondientes a distintas temperaturas en
20 incubadores termostatzados con agitación (150 rpm) y calculando la tasa de crecimiento a cada una de esas temperaturas basándose en medidas de absorbancia (a 600 nm) de las suspensiones celulares. Con objeto de verificar la producción de sulfato a distintas concentraciones de nutrientes, se realizaron experimentos como se ha descrito pero en cultivos con concentraciones de un
25 caldo nutritivo concentrado dos veces (2), a concentración estándar (1) y diluido diez veces (0,1) (FIG. 2). El nivel de crecimiento bacteriano en estos cultivos a distinta concentración de nutrientes se monitorizó determinando la cantidad de proteína bacteriana siguiendo el método de Bradford (*BioRad Protein Assay kit*). Las temperaturas se determinaron con un termómetro digital
30 equipado con un termopar-K (*Hanna Instruments, Ann Arbor, Michigan, USA*). Las diferencias entre tratamientos se determinaron con test ANOVA (Sokal y Rohlf, 1981. Biometry. Freeman WH & Co, New York).

Mientras que la producción de sulfato fue insignificante por parte de bacterias mesófilas, las bacterias termófilas han dado lugar a aumentos en la concentración de sulfatos durante su crecimiento. Estos resultados se muestran en la FIG.1. Las cepas ensayadas se muestran en la Tabla 1. Entre las bacterias termófilas productoras de sulfato destaca la cepa de la presente invención de la especie *Brevibacillus thermoruber* con nº de depósito CECT7629.

10 Tabla 1. Cepas utilizadas en la presente invención. Entre paréntesis se muestra la división bacteriana a la que pertenece cada una de las bacterias:

Nº	Afiliación taxonómica	Temperatura de crecimiento (°C)
1	<i>Paenibacillus</i> (Firmicutes)	25
2	<i>Klebsiella</i> (Proteobacteria gamma)	25
3	<i>Cellulomonas</i> (Actinobacteria)	25
4	<i>Streptomyces</i> (Actinobacteria)	25
5	<i>Neocosmopora</i> (Hongo)	25
6	<i>Enterobacter</i> (Proteobacteria gamma)	25
7	<i>Bacillus</i> (Firmicutes)	50
8	<i>Geobacillus</i> (Firmicutes)	50
9	<i>Geobacillus</i> (Firmicutes)	50
10	<i>Brevibacillus</i> (Firmicutes)	50
11	<i>Geobacillus</i> (Firmicutes)	50

15 Tal como fue demostrado por los inventores, el sulfato producido procedía del azufre contenido en compuestos orgánicos, tales como las proteínas y sus aminoácidos (Cisteína y Metionina), coenzimas (como la coenzima A y sus derivados), y vitaminas (biotina, tiamina, vitamina B1, ácido lipoico) entre otros compuestos. En ausencia de nutrientes orgánicos, las cepas estudiadas no mostraban crecimiento, por lo que su crecimiento es heterotrófico. La

producción de sulfato fue proporcional a la concentración de nutrientes orgánicos presentes en el cultivo tal y como se observa en la FIG. 2.

5 Tal como puede observarse en la FIG. 1, la cepa reseñada con el nº 10, es decir, la cepa seleccionada de la presente invención perteneciente a la especie *Brevibacillus thermoruber* con nº de depósito CECT7629 presenta una producción de sulfatos significativamente superior a la producción de sulfatos de cepas de bacterias mesófilas (cuya temperatura óptima de crecimiento es de 25°C) y, todavía más importante, cuya producción de sulfato es
10 significativamente superior a la de otras cepas de bacterias termófilas (cuya temperatura óptima de crecimiento está entre 50 y 60°C) pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Geobacillus*, pero que comparten el mismo “Filo” con la cepa de *Brevibacillus thermoruber*.

15

En la FIG. 2 se observa cómo la producción de sulfatos (A) y crecimiento bacteriano (B) en relación con la concentración de nutrientes orgánicos (distintas concentraciones de caldo nutritivo) es significativamente superior con la cepa *Brevibacillus thermoruber* con nº de depósito CECT7629 seleccionada
20 en la presente invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Microorganismo de la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* con número de acceso CECT7629.
2. Población bacteriana que comprende el microorganismo según la reivindicación 1.
- 10 3. Uso de un microorganismo que pertenece a la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* o de una población bacteriana que comprende un microorganismo de la especie *Brevibacillus thermoruber*, para la producción de sulfato.
- 15 4. Uso según la reivindicación 3, donde el microorganismo es la bacteria según la reivindicación 1, o la población bacteriana es la población según la reivindicación 2.
- 20 5. Uso del microorganismo o de la población según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, donde el sulfato forma un precipitado.
6. Uso del microorganismo o de la población según la reivindicación 5 para consolidar y/o remediar un material inerte.
- 25 7. Uso del microorganismo o de la población según la reivindicación 6, donde el material inerte es un material de construcción.
8. Método para la producción de sulfato que comprende:
 - 30 a) inocular un microorganismo que pertenece a la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber*, o de una población bacteriana que comprende un microorganismo de la especie

Brevibacillus thermoruber en un medio de cultivo que comprende nutrientes orgánicos con azufre, e

5 b) incubar el cultivo del paso (a) a una temperatura de entre 40°C y 75°C,

9. Método para la producción de sulfato según la reivindicación 8, donde el microorganismo es la bacteria según la reivindicación 1, o la población bacteriana es la población según la reivindicación 2.

10

10. Método para la producción de sulfato según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, donde la incubación del paso (b) se lleva a cabo a una temperatura de entre 50°C y 60°C.

15

11. Método para la producción de un sulfato precipitado que comprende los pasos del método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde además el medio de cultivo comprende una sal cuyo catión se une al anión sulfato, formando un sulfato precipitado.

20

12. Método para la producción de un sulfato precipitado según la reivindicación 11, donde el catión de la sal es calcio.

13. Método para consolidar y/o remediar un material inerte, que comprende los pasos del método según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, donde el microorganismo se pone en contacto con dicho material.

25

14. Método según la reivindicación 13, que además comprende eliminar el microorganismo y/o nutrientes del medio de cultivo, presentes en dicho material inerte.

30

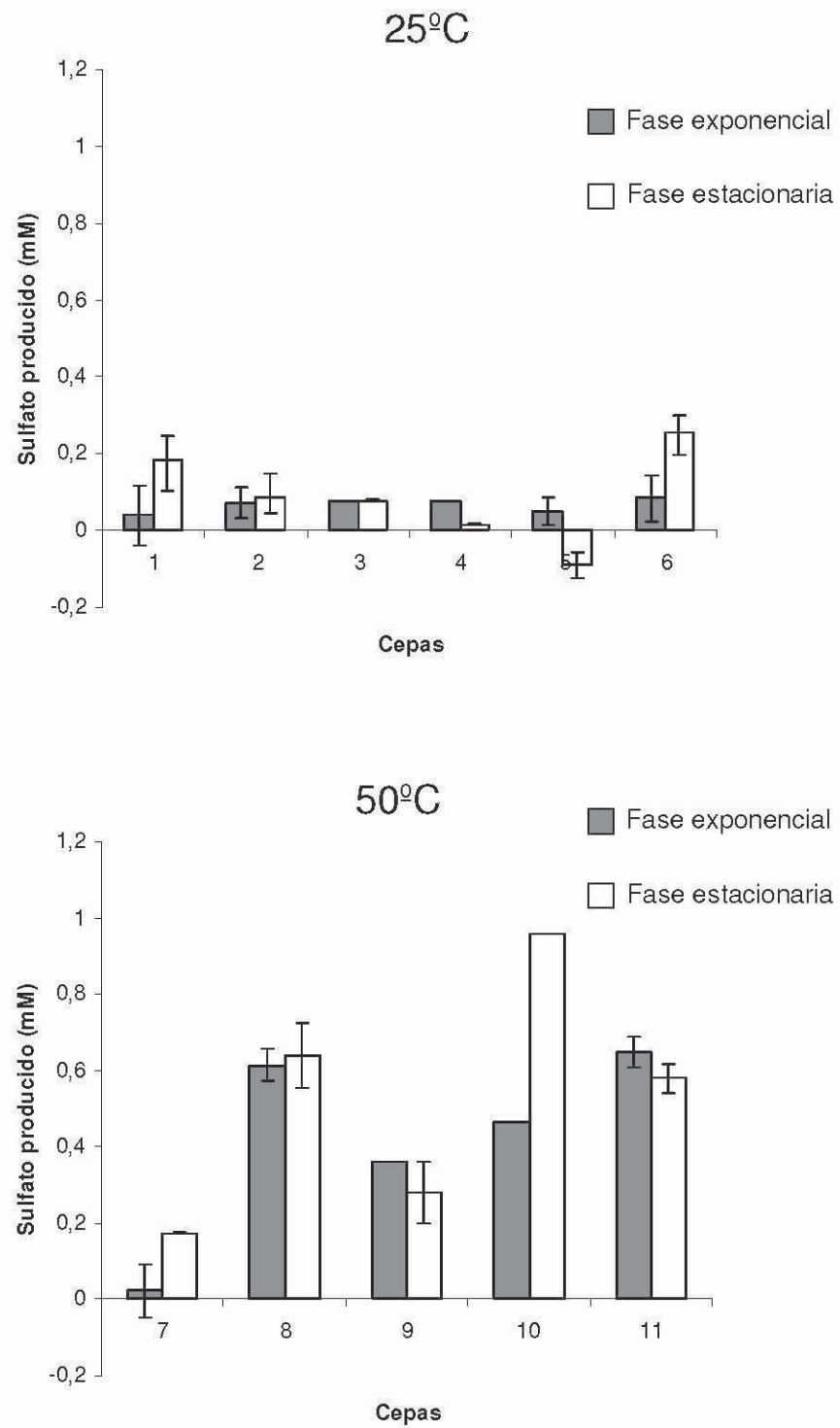


FIG. 1

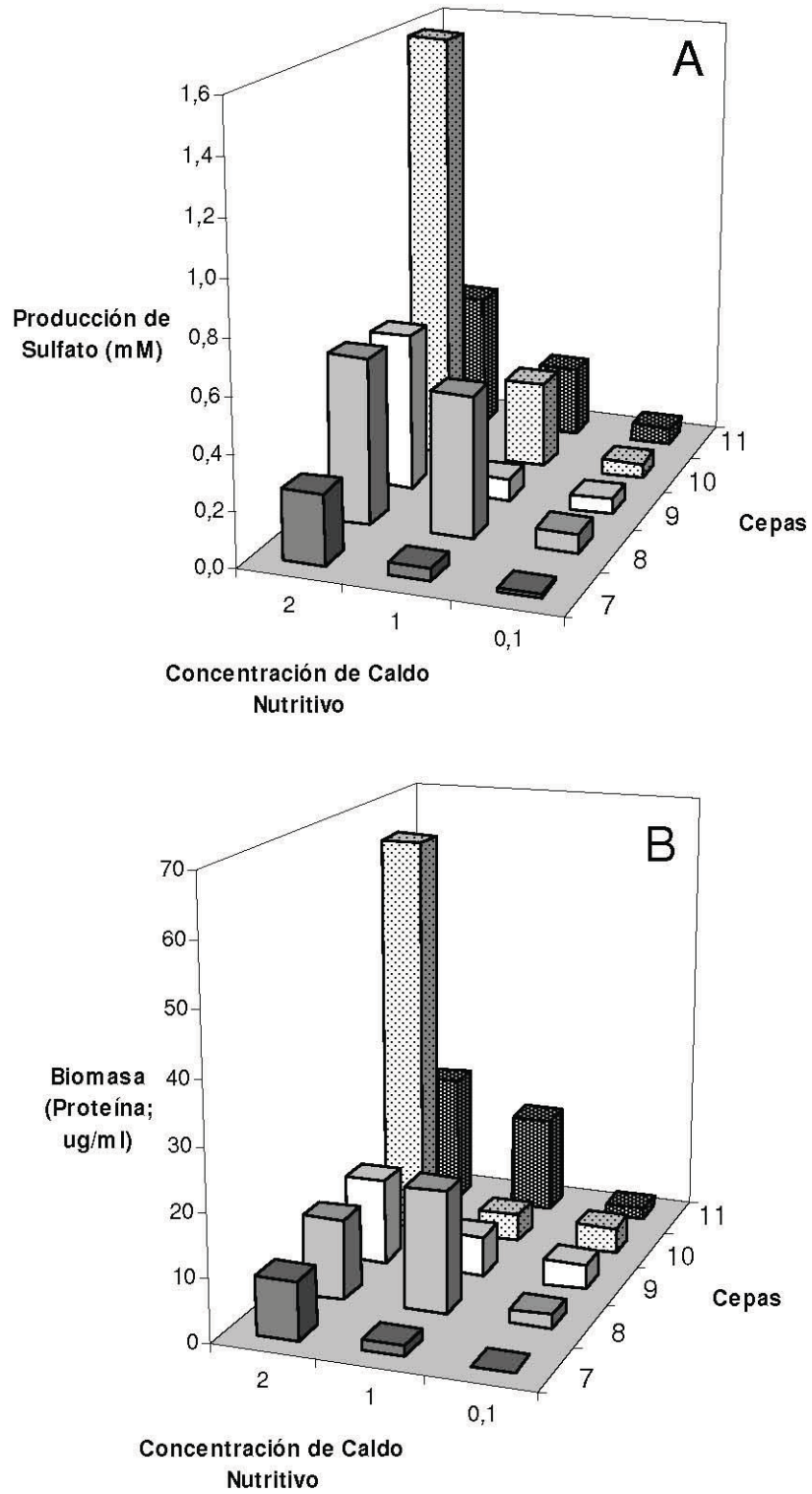


FIG. 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 200931240

22 Fecha de presentación de la solicitud: 22.12.2009

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

51 Int. Cl.: Ver hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2064673 T3 (UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE Paris VI) 19.09.1990, columna 1, líneas 13-21; reivindicaciones 1,3,9.	1-8,13-14
A	JIMENEZ- LOPEZ C. et al. Consolidation of degraded ornamental porous limestone stone by calcium carbonate precipitation induced by the microbiota inhabiting the stone. 08.2007. CHEMOSPHERE, Volumen 68, Issue 10, Páginas 1929-1936. Todo el documento.	1-6,13-14
A	TIANO P. et al. Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation. 01.05.1999. Journal of Microbiological Methods, Volumen 36, Issues 1-2, Páginas 139-145. Todo el documento.	1-6,13-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
08.10.2010

Examinador
I. Abad Gurumeta

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 1/20 (2006.01)**C07K 14/345** (2006.01)**C04B 41/00** (2006.01)**C12R 1/08** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C07K, C04B

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, EMBASE, EMBL ALL, WIPI, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.10.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SÍ NO
	Reivindicaciones _____	
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SÍ NO
	Reivindicaciones _____	

Se Considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2064673 T3 (Universite Pierre et Marie Curie Paris VI) 19.09.1990	19.09.1990
D02	JIMENEZ- LOPEZ C. et al . Consolidation of degraded ornamental porous limestone stone by calcium carbonate precipitation induced by the microbiota inhabiting the stone. CHEMOSPHERE, Volume 68, Issue 10, Pages 1929-1936.	08-2007
D03	TIANO P. et al. Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation . 01.05.1999. Journal of Microbiological Methods, Volume 36, Issues 1-2, Pages 139-145	01.05.1999

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la presente invención consiste en un microorganismo de la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* (ver reivindicación 1-2) y al uso del mismo o de su población bacteriana para la producción de sulfato (ver reivindicación 3-7) y a un método para la producción de sulfato (ver reivindicación 8-12). La presente invención consiste también en un método para consolidar y/o remediar un material inerte mediante el sulfato precipitado usando dicho microorganismo (ver reivindicación 13-14).

El documento D01 divulga un procedimiento de tratamiento biológico de una superficie artificial (ver reivindicación 1), en el que el microorganismo pertenece al género *Bacillus* (ver reivindicación 9) para remediar materiales de construcción calcáreos atacados por agentes externos (ver columna 1, línea 13-21). En este procedimiento el microorganismo mineralizador es puesto en contacto con la superficie artificial en un medio de cultivo (ver reivindicación 3).

El documento D02 divulga la consolidación de piedra caliza ornamental porosa por precipitación de carbonato cálcico por biomineralización bacteriana (ver todo el documento).

El documento D03 publica el método de conservación de piedras en monumentos usando microorganismos como el de género *Bacillus*, por la producción de las mismas de carbonato cálcico (ver todo el documento).

1. NOVEDAD (ART. 6.1 Ley 11/1986)

La invención según se recoge en las reivindicaciones 1-14 es nueva en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/1986.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (ART. 8.1 Ley 11/1986)

La invención según se recoge en las reivindicaciones 1-14 cumple el requisito de actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 de la Ley 11/1986.