



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 373 844**

21 Número de solicitud: 201031177

51 Int. Cl.:
C05F 11/08 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **28.07.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
09.02.2012

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 17
28006 Madrid, ES

72 Inventor/es: **González Grau, Juan Miguel y**
Portillo Guisado, María Carmen

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Procedimiento ecológico de tratamiento de suelos de cultivo.**

57 Resumen:

Procedimiento ecológico de tratamiento de suelos de cultivo.

La presente invención se refiere a un procedimiento de fertilización de suelos que comprende usar bacterias del género *Brevibacillus* y *Ureibacillus* y a una composición que comprende dichas bacterias para el tratamiento de suelos de cultivos, el fin de incrementar las concentraciones de amonio y sulfato disponibles para las plantas.

ES 2 373 844 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento ecológico de tratamiento de suelos de cultivo.

5 La presente invención se refiere a una un procedimiento de fertilización de suelos que comprende usar bacterias del género *Brevibacillus* y *Ureibacillus* y a una composición que comprende dichas bacterias para el tratamiento de suelos de cultivos, el fin de incrementar las concentraciones de amonio y sulfato disponibles para las plantas.

10 **Estado de la técnica anterior**

La necesidad de obtener cultivos con mayor rentabilidad para la alimentación unido al requerimiento por mantener nuestros recursos y evitar la contaminación de nuestro planeta implica el empleo de técnicas ecológicas para el desarrollo de la agricultura dentro de un marco de sostenibilidad que nos permita el mantenimiento de la producción y de nuestro entorno natural. Altas producciones agrícolas necesitan el empleo de fertilizantes para evitar la degradación del suelo y una reducción de su capacidad para el desarrollo vegetal. Sin embargo, el uso y abuso de fertilizantes químicos supone un coste elevado para la agricultura y lleva a la eutrofización de los recursos hídricos (ríos, lagos, etc.).

20 En los últimos años se ha recurrido a la biotecnología para sustituir el uso de sustancias químicas con gran impacto medioambiental, como por ejemplo usando bacterias capaces de enriquecer el suelo con sustancias procedentes de su metabolismo habitual. Existen productos comerciales que contienen hongos (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*) o bacterias (*Bacillus subtilis*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*) que liberan sustancias beneficiosas para el suelo mejorando así el crecimiento de los cultivos.

25 Por otro lado, en la patente EP0341756 se describe el uso de biomasa bacteriana procedente de un proceso de obtención de antibióticos, para la fertilización de prados montañosos.

30 Por tanto, existe una necesidad de ir sustituyendo progresivamente el uso de fertilizantes químicos contaminantes por alternativas biológicas que no dañen el medio ambiente.

Descripción de la invención

35 La presente invención describe procedimientos de fertilización naturales basados en potenciar el metabolismo de determinadas bacterias. Ello implica que es posible cumplir los dos requisitos de sostenibilidad, mantener la producción agrícola y evitar el impacto de productos químicos al medio ambiente.

40 En un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un microorganismo que pertenece al género *Ureibacillus* y/o *Brevibacillus* o de una población bacteriana que comprende microorganismos que pertenecen al género *Ureibacillus* y/o *Brevibacillus* para la fertilización de suelos de cultivo.

En una realización preferida, el microorganismo del género *Brevibacillus* es *Brevibacillus thermoruber*.

45 En otra realización preferida, el uso descrito además comprende microorganismos del género *Geobacillus*.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de fertilización de suelos de cultivo que comprende las siguientes etapas:

50 a) aplicación de un microorganismo que pertenece al género *Ureibacillus* y/o *Brevibacillus* o de una población bacteriana que comprende microorganismos que pertenecen al género *Ureibacillus* y/o *Brevibacillus* sobre el suelo de cultivo a tratar,

55 b) calentamiento de dicho suelo a una temperatura de entre 40 y 80°C.

En una realización preferida, el calentamiento se realiza con una fuente de calor artificial o natural, por ejemplo, con un calentamiento basado en radiación solar o el diseño de una estrategia para concentrar/aumentar la radiación solar.

60 Otro aspecto de la invención es una composición fertilizante que comprende un microorganismo que pertenece al género *Ureibacillus* y/o *Brevibacillus* o a una población bacteriana que comprende microorganismos que pertenecen al género *Ureibacillus* y/o *Brevibacillus*.

65 En una realización preferida, el microorganismo del género *Brevibacillus* es *Brevibacillus thermoruber*.

En otra realización preferida, la composición anteriormente descrita además comprende bacterias del género *Geobacillus*.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una composición según se ha descrito anteriormente para el tratamiento de suelos de cultivo, preferiblemente para el aumento de las cantidades de amonio y sulfatos presentes.

La técnica propuesta supone el uso de bacterias termófilas, entre las que se citan las bacterias termófilas clasificadas entre la División Firmicutes, como por ejemplo, aquellas relacionadas con géneros como *Ureibacillus*, *Brevibacillus* y *Geobacillus*. Estas son bacterias heterótrofas aerobias, es decir que consumen materia orgánica en presencia de oxígeno. Entre la materia orgánica que utilizan predominan las proteínas y aminoácidos. Como producto de este metabolismo, estas bacterias liberan al medio sulfato y amonio lo que da lugar a simular el empleo de fertilizantes químico, entre los que destaca el empleo de sulfato de amonio. El sulfato sirve de fuente de azufre para las plantas y para mantener el pH del suelo. El amonio es una fuente de nitrógeno para las plantas y otras bacterias naturales del suelo. Las bacterias mencionadas son termófilas lo que significa que funcionan a temperaturas elevadas, normalmente a temperaturas iguales o superiores a 40°C. Por ello, un calentamiento del suelo permitiendo la exposición del sol o un calentamiento artificial puede emplearse para activar el metabolismo de estas bacterias. El procedimiento puede fomentarse con un pequeño aporte de materia orgánica de origen natural (vegetal o animal), pero evitando que la acumulación de dicho material pueda impedir el calentamiento del suelo.

La técnica propuesta permitiría la fertilización de cultivos antes de su siembra, generalmente durante períodos calurosos o veraniegos, potenciando su calentamiento de forma natural (solar) o artificial (invernaderos o calefactores), sin necesidad de añadir productos químicos inorgánicos como fuentes de nitrógeno y azufre.

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. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig. 1. Concentración de amonio producido por las cepas *Brevibacillus thermoruber* y *Ureibacillus* sp. durante su crecimiento en caldo nutritivo a distintas concentraciones (desde 0,1x a 2x).

Fig. 2. Concentración de sulfato producido por las cepas 10 y 12 durante su crecimiento en caldo nutritivo a distintas concentraciones (desde 0,1x a 2x).

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de la composición de la presente invención.

Las cepas utilizadas en este estudio fueron *Brevibacillus thermoruber* y *Ureibacillus* sp. Estas cepas han sido depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con los números CECT7629 y CECT7628 respectivamente.

Las cepas se han crecido en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de caldo nutritivo y han sido incubadas a 50°C durante 24 horas (para amonio) o 6 días (para sulfato). Tras este período, el crecimiento bacteriano ha alcanzado el final de su fase exponencial de crecimiento y se ha determinado la concentración de sulfato y amonio en el medio. Estas medidas se han comparado con las mismas determinaciones llevadas a cabo al tiempo inicial (t=0 h) y con un control en el que no se ha inoculado ninguna bacteria. Las medidas de amonio se realizaron fotométricamente siguiendo el procedimiento recomendado (APHA, 1992). La concentración de sulfato se realizó según Kolmet *et al.* (2000). La composición del caldo nutritivo (1x) era (por litro): Extracto de carne 3 g y Peptona 5 g; Disolver, ajustar el pH a 7.0 y esterilizar en autoclave. Para demostrar que la producción de amonio y sulfatos era proporcional a los nutrientes orgánicos consumidos durante el crecimiento de estas bacterias termófilas, se han llevado a cabo experimentos a distintas concentraciones de caldo nutritivo: 0,1x, 0,25x, 0,5x, 0,75x, 1x, 1,5x y 2x.

No se observaron cambios en la concentración de sulfato y amonio en el control sin inocular. Las cantidades de amonio y sulfato producido se calcularon substrayendo las concentraciones iniciales (t=0 h) a las obtenidas tras el período de incubación.

Resultados

Como ejemplos de los resultados obtenidos se presentan las figuras 1 y 2. En la Figura 1 se muestra el amonio producido por las cepas *Brevibacillus thermoruber* y *Ureibacillus* sp. en función de la concentración de nutrientes (caldo nutritivo) en el cultivo. El amonio producido depende de la concentración de materia orgánica. Se observa que la concentración de amonio producido es más elevada al aumentar los nutrientes orgánicos y proporcional al consumo de nutrientes orgánicos. De modo similar la producción de sulfato depende de la concentración de materia orgánica disponible para el crecimiento de las dos cepas ensayadas. Se observa una mayor concentración de sulfato al aumentar

ES 2 373 844 A1

los nutrientes orgánicos con un máximo a 1.5x de caldo nutritivo ya que parece sufrir una pequeña inhibición a mayor concentración de caldo nutritivo (2x) y, al igual que para la producción de amonio, la producción de sulfatos (por debajo de concentraciones equivalentes a 1,5x de caldo nutritivo) es proporcional al consumo de nutrientes orgánicos.

5 Las concentraciones de amonio resultantes en estos experimentos con las cepas termófilas *Brevibacillus thermoruber* y *Ureibacillus* sp. están a un nivel de concentración de amonio similar o superior al alcanzado por cepas bacterianas mesófilas (con crecimiento a 24°C) denominadas superproductoras o hiperproductoras de amonio (Whitehead y Cotta, 2004).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un microorganismo termófilo que pertenece al género *Ureibacillus* y/o *Brevibacillus* o de una población bacteriana que comprende microorganismos termófilos que pertenecen al género *Ureibacillus* y/o *Brevibacillus* para la fertilización de suelos de cultivo.
2. Uso según la reivindicación 1 donde el microorganismo del género *Brevibacillus* es *Brevibacillus thermoruber*.
- 10 3. Uso según las reivindicaciones anteriores que además comprende microorganismos del género *Geobacillus*.
4. Procedimiento de fertilización de suelos de cultivo que comprende las siguientes etapas:
- 15 a. aplicación de un microorganismo que pertenece al género *Ureibacillus* y/o *Brevibacillus* o de una población bacteriana que comprende microorganismos que pertenecen al género *Ureibacillus* y/o *Brevibacillus* sobre el suelo de cultivo a tratar,
- b. calentamiento de dicho suelo a una temperatura de entre 40 y 80°C.
- 20 5. Procedimiento según la reivindicación 4 donde el calentamiento se realiza con una fuente de calor artificial o natural.
6. Composición fertilizante que comprende un microorganismo termófilo que pertenece al género *Ureibacillus* y/o *Brevibacillus* o de una población bacteriana que comprende microorganismos termófilos que pertenecen al género *Ureibacillus* y/o *Brevibacillus*.
- 25 7. Composición según la reivindicación 6 donde el microorganismo del género *Brevibacillus* es *Brevibacillus thermoruber*.
- 30 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7 que además comprende microorganismos del género *Geobacillus*.

35

40

45

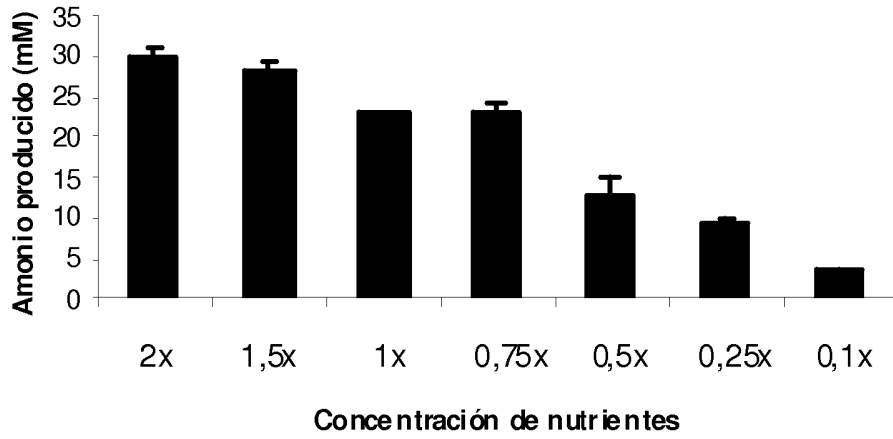
50

55

60

65

Cepa Brevibacillus thermoruber



Cepa Ureibacillus sp.

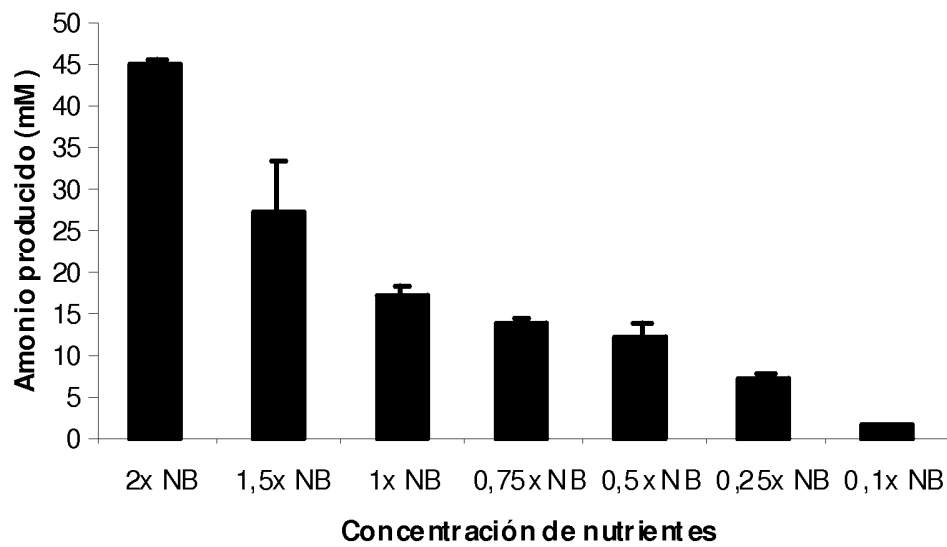


FIG. 1

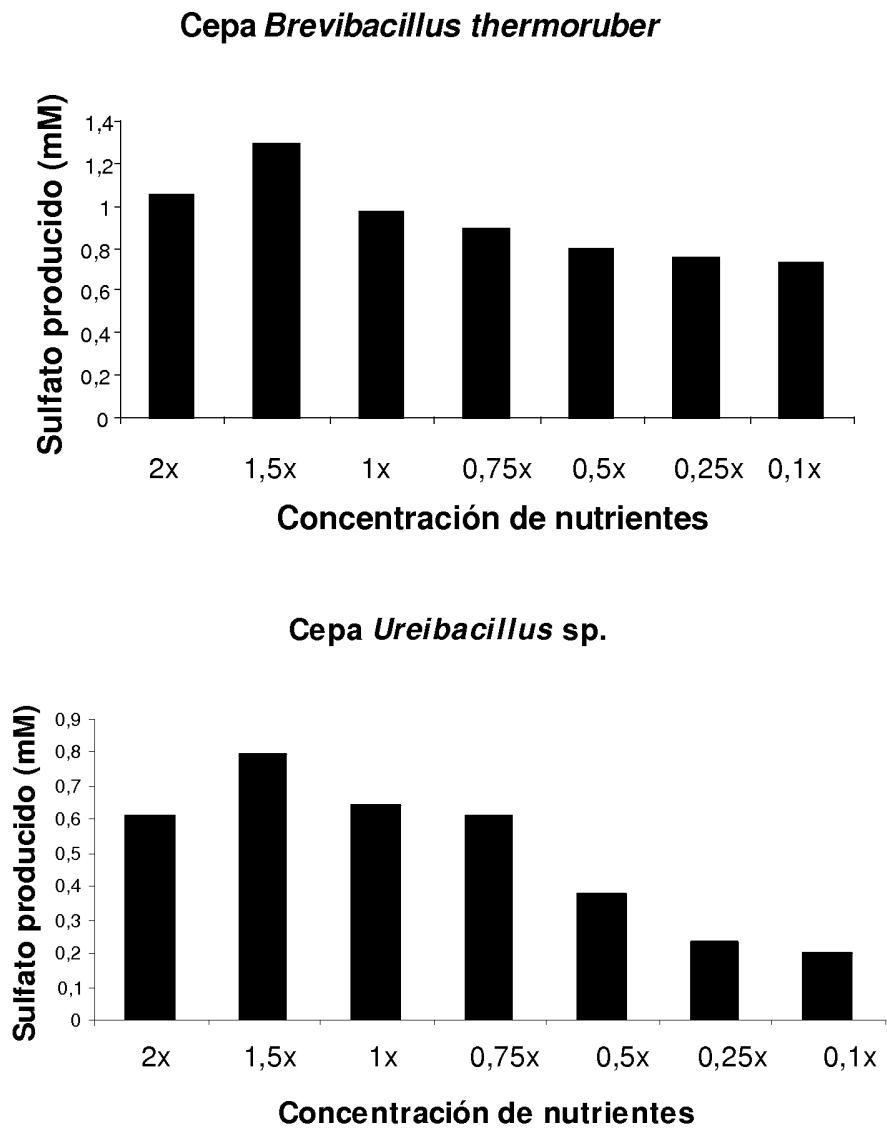


FIG 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201031177

②² Fecha de presentación de la solicitud: 28.07.2010

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl. : **C05F11/08** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2005093042 A1 (SATO NAOHIKO) 06.10.2005 (resumen). World Patents Index (bases de datos en línea). (Recuperado el 29.03.2011)	1,2,6,7
X	US 20080190158 A1 (UNLV) 14.08.2008	1,6
X	CN 101402932 A (INST. OF AGRICULTURAL RESOURCES) 08.04.2009 (resumen). World Patents Index (bases de datos en línea). (Recuperado el 29.03.2011)	1,6

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
30.03.2011

Examinador
I. Rueda Molins

Página
1/4

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

C05F

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.03.2011

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 3-5, 8
Reivindicaciones 1, 2, 6, 7

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 3-5, 8
Reivindicaciones 1, 2, 6, 7

SI
NO

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 se publica.

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	WO2005093042 A1 (SATO NAOHIKO) (resumen). World Patents Index (bases de datos en línea). (Recuperado el 29.03.2011)	06.10.2005
D02	US2008/0190158 A1 (UNLV)	14.08.2008
D03	CN101402932 A (INST. OF AGRICULTURAL RESOURCES) (resumen). World Patents Index (bases de datos en línea). (Recuperado el 29.03.2011)	08.04.2009

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:

La solicitud de patente divulga un procedimiento ecológico de tratamiento de suelos de cultivo.

El documento D01, muestra el uso de un microorganismo del género *Ureibacillus* para incrementar el rendimiento de los cultivos.

Los documentos D02 y D03 divulgan el uso de un microorganismo del género *Brevibacillus* como integrante de una composición fertilizante.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP 11/1986)

En las reivindicación 1 y 2 de la solicitud de patente se reivindica el uso de un microorganismo termófilo, que pertenece al género *Ureibacillus* (o de un microorganismo que pertenece al género *Brevibacillus*, más concretamente *B. thermoruber*) para la fertilización de suelos. También se reivindica una población bacteriana que comprende dicho microorganismo. En las reivindicaciones 6 y 7 se reivindica una composición fertilizante que comprende el citado microorganismo.

El documento D01 muestra (en el resumen que se encuentra en la base de datos en línea World Patents Index) el uso de un microorganismo termófilo del género *Ureibacillus* como fertilizante. Por tanto, las reivindicaciones 1, 2, 6 y 7 carecen de novedad y de actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP 11/1986.

Los documentos D02 y D03 divulgan (en las reivindicaciones 1 y 13 de la página 6 del documento D02 y en el resumen, que se encuentra en la base de datos en línea World Patents Index, del documento D03) el uso de un microorganismo del género *Brevibacillus* como integrante de una composición fertilizante. Por tanto, teniendo en cuenta la información que muestran estos documentos, las reivindicaciones 1 y 6 (que reivindican el uso de un microorganismo termófilo, que pertenece al género *Brevibacillus* o de un microorganismo que pertenece al género *Ureibacillus* para la fertilización de suelos así como una composición fertilizante que comprende el citado microorganismo) no presentan novedad ni actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP 11/1986.