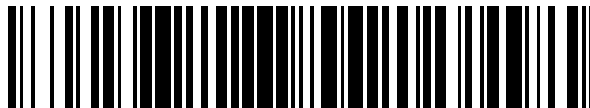


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 822**

51 Int. Cl.:
C09K 17/00 (2006.01)
C04B 41/00 (2006.01)
E02D 3/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08708468 .7**
96 Fecha de presentación: **30.01.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2118236**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.11.2009**

54 Título: **Procedimiento de calcificación con bacterias calcificantes**

30 Prioridad:
30.01.2007 FR 0752968

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.04.2012

73 Titular/es:
**SOLETANCHE FREYSSINET
133 BOULEVARD NATIONAL
92500 RUEIL MALMAISON, FR**

72 Inventor/es:
**DARSON-BALLEUR, Sabine y
GIRINSKI, Olivier**

74 Agente/Representante:
García-Cabrerizo y del Santo, Pedro

ES 2 377 822 T3

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

Procedimiento de calcificación con bacterias calcificantes.

La invención se refiere a un método de mejora de la resistencia de un material poroso o permeable, o de la calcificación bacteriana.

- 5 La invención se refiere en particular a un método de mejora de la resistencia de un material poroso o permeable mediante bio-calcificación, ventajosamente conservando el crecimiento y/o la actividad enzimática de las bacterias utilizadas. Esta invención está destinada más particularmente a la consolidación de un suelo, o de un soporte mineral u orgánico, particularmente tal como arena, un soporte silíceo y/o calcáreo, a la renovación o la protección de fachadas, al refuerzo de suelos o a la estabilización de pendientes, particularmente en el marco de la lucha
10 contra siniestros de los edificios en caso de seísmos.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La precipitación de carbonatos de calcio por vía bacteriana es un fenómeno natural bien conocido: Algunas bacterias, metabolizando un sustrato carbonado, producen un aumento de iones de carbonato y bicarbonato en el medio circundante que, combinados con iones de calcio, conllevan la precipitación de carbonatos de calcio.

- 15 Este fenómeno ya se ha utilizado a nivel industrial para la renovación o la protección de fachadas, (Universidad de París VI - CA 2012444), el refuerzo de suelo o la estabilización de pendientes (Universidad Murdoch y Calcite Technology Pty Ltd-WO2006066326) o también la consolidación de suelos licuables (patente de la Compagnie du Sol-FR2873725).

- 20 La utilización de bacterias en procedimientos industriales, particularmente para calcificar soportes minerales, se realiza mediante fases acuosas. La mayor parte del tiempo, una vez colocadas las bacterias, se pulverizan o se inyectan soluciones nutritivas y/o reactivas (calcificantes) para que el procedimiento pueda llevarse a cabo. Es importante, por lo tanto, que las bacterias estén suficientemente bien fijadas al soporte a tratar para que las fases aplicadas posteriormente no las desplacen o no las eliminen. Esta fijación debe ir a la par con el mantenimiento de la actividad enzimática de las bacterias.

- 25 Las aplicaciones industriales se enfrentan, por lo tanto, a un problema fundamental que es la reducida adhesión de las bacterias sobre el soporte a tratar. Este problema tiene como consecuencia una disminución de la tasa y un aumento del tiempo de calcificación, lo que induce una pérdida de competitividad del método con respecto a técnicas convencionales de renovación o de refuerzo.

- 30 Diferentes técnicas se proponen ya resolver este problema utilizando polímeros de tipo celulósico o acrílico (solicitud de patente de Seikatsu Bunkasha KK JP2004215561, y patentes de UBE industries JP55015703, y patente de Merck GmbH US3959080), o iones divalentes (Universidad Murdoch-WO2006066326). Los inconvenientes de estas técnicas son, respectivamente, la viscosificación de los medios mediante desarrollo de largas cadenas de polímeros, lo que es incompatible con la buena penetración de los productos en los procedimientos de inyección en suelo, y el empleo de volúmenes de productos suplementarios que hacen al procedimiento aún menos interesante desde el
35 punto de vista económico.

OBJETIVOS DE LA INVENCION

La invención tiene como objetivo principal resolver el problema técnico que consiste en proporcionar un método para mejorar los procedimientos de bio-calcificación.

- 40 La invención también tiene como objetivo resolver el problema técnico que consiste en proporcionar un método para mejorar la resistencia de un material poroso o permeable.

La invención también tiene como objetivo resolver el nuevo problema técnico que consiste en proporcionar un método para mejorar la adhesión bacteriana sobre un material poroso o permeable, y particularmente sobre un soporte mineral u orgánico poroso o permeable, y particularmente sobre un suelo, tal como arena silícea, como por ejemplo arena de Fontainebleau, un soporte silíceo y/o calcáreo.

- 45 La invención tiene particularmente como objetivo resolver el problema técnico que consiste en la mejora de la consolidación de un suelo, o de un soporte mineral u orgánico, particularmente tal como arena, un soporte silíceo y/o calcáreo, la mejora de la renovación y/o la protección de fachadas, o la mejora del refuerzo de suelos o de la estabilización de pendientes.

- 50 La invención tiene particularmente como objetivo aumentar la adhesión de las bacterias sobre el material o soporte a tratar particularmente para mejorar la calcificación bacteriana, en particular con los objetivos mencionados anteriormente.

La invención tiene como objetivo resolver los diferentes problemas técnicos mencionados anteriormente preferentemente manteniendo el crecimiento y/o la actividad enzimática bacteriana. En particular la invención tiene como objetivo aumentar la actividad enzimática de bacterias calcificantes, y/o el crecimiento de estas bacterias.

5 La invención tiene particularmente como objetivo resolver los problemas técnicos mencionados anteriormente proporcionando un procedimiento o método mejorado de calcificación bacteriana sin etapa suplementaria, y/o sin aumento de la cantidad o del volumen, y/o sin aumento de la viscosidad de los fluidos utilizados.

Por otro lado, la invención también tiene como objetivo proporcionar un método o un procedimiento que permita aumentar la tasa de calcificación y/o disminuir el tiempo de calcificación.

10 La invención tiene como objetivo resolver estos problemas técnicos en el marco de la inyección de bacterias en el suelo para mejorar su cohesión y/o su resistencia.

Estos problemas técnicos deben resolverse de manera reproducible, industrial, con los menores costes, ventajosamente sin toxicidad medioambiental, y preferentemente mejorando la resistencia a la erosión y a la contaminación, mientras se mantiene una estructura natural de la roca y/o del material reforzado o consolidado.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

15 De este modo, la presente invención describe un método o procedimiento para mejorar la resistencia de un material poroso o permeable, preferentemente un soporte poroso o permeable como un soporte mineral y/u orgánico poroso o permeable, tal como un suelo, una roca o un material de construcción, que comprende:

- la puesta en contacto de al menos un tipo de bacterias calcificantes con un material poroso o permeable,
- 20 - la puesta en contacto de las bacterias calcificantes con un medio calcificante, comprendiendo dicho método o procedimiento:
- la puesta en contacto de las bacterias calcificantes con un agente de adhesión y la asimilación por parte de las bacterias calcificantes del agente de adhesión, particularmente para mejorar la resistencia del material poroso o permeable.

25 En la presente invención, se entiende por mejora de la resistencia del material poroso o permeable: el refuerzo o la consolidación de un material poroso o permeable, la mejora o el aumento de la cohesión entre las partículas de un material poroso o permeable, o la mejora o el aumento de la resistencia a la compresión de este material. Se prefiere utilizar el método de acuerdo con la Norma sobre los ensayos de compresión simple (NF EN 12390-3) para verificar la mejora de la resistencia del material poroso o permeable.

30 De acuerdo con una primera realización ventajosa, el agente de adhesión se añade al medio de cultivo de las bacterias, y/o en el inóculo, antes o durante la puesta en contacto de las bacterias calcificantes con el material poroso o permeable.

De acuerdo con una segunda realización ventajosa, el agente de adhesión se añade al medio calcificante antes o durante la puesta en contacto de las bacterias calcificantes con el medio calcificante.

35 De acuerdo con una tercera realización ventajosa, el agente de adhesión se añade al medio de cultivo y al medio calcificante.

Una bacteria calcificante es, ventajosamente, una bacteria que permite un aumento de los iones de carbonato y bicarbonato en el medio circundante, particularmente metabolizando un sustrato carbonado, para obtener la precipitación de carbonatos de calcio en presencia de calcio.

Las bacterias preferidas son las que utilizan inulina entre las fuentes de carbono asimilables.

40 Ventajosamente, la bacteria calcificante es *Sporosarcina pasteurii*.

El agente de adhesión, permite a las bacterias mejorar la resistencia del material poroso o permeable, particularmente mejorando la adhesión de las bacterias al material a tratar. Lógicamente, esta propiedad se debe a la producción de un mayor número de exopolisacáridos por parte de las bacterias calcificantes que asimilan el agente de adhesión. Esta solución tiene la ventaja de no complicar el procedimiento industrial, y de no hacerle ni más largo, ni más costoso, al tiempo que aporta una mejora de la calcificación y de la adhesión al soporte.

45 Preferentemente, el agente de adhesión no modifica las características físicas de las soluciones utilizadas, particularmente la viscosidad.

El agente de adhesión se selecciona preferentemente para que no disminuya la actividad enzimática de las bacterias calcificantes y para que no tenga preferentemente ninguna toxicidad medioambiental.

Preferentemente el agente de adhesión es asimilado por la bacteria sin inhibir la síntesis de ureasa.

Un agente de adhesión muy interesante es la inulina.

5 Ventajosamente, el agente de adhesión se selecciona entre el grupo constituido por la batata de caña, la patata dulce, el salsifí, el puerro, la achicoria, la alcachofa, la cebolla, el ajo, la chalota, el helenio (*Inula helenium*) y una cualquiera de sus mezclas, siendo estos compuestos ricos en inulina.

También puede utilizarse un extracto vegetal cualquiera que contenga inulina, obtenido particularmente a partir de todos o parte de los vegetales mencionados.

10 Se prefiere utilizar la achicoria (*Cichorium intybus*) en la medida en que la proporción de inulina es importante y que esta materia prima está fácilmente disponible en gran cantidad para utilizarla a escala industrial, particularmente para las presentes aplicaciones.

La inulina obtenida a partir de vegetales puede purificarse o fraccionarse para obtener fracciones con mayor o menor concentración de inulina.

El agente de adhesión puede utilizarse en solitario o en una composición llamada composición de adhesión.

15 El agente de adhesión puede añadirse en varias veces. Pueden cultivarse, por ejemplo, las bacterias calcificantes en presencia del agente de adhesión y a continuación añadirse de nuevo el agente de adhesión en el momento o justo antes de la puesta en contacto de las bacterias calcificantes con el medio poroso o permeable.

De este modo, la presente invención también se refiere a un medio de adhesión que comprende un agente de adhesión y un medio de cultivo y/o un medio de calcificación de al menos un tipo de bacteria calcificante, como por ejemplo *Sporosarcina pasteurii*.

20 Ventajosamente, este medio comprende una concentración eficaz de al menos un agente de adhesión para favorecer la síntesis de exopolisacáridos por parte de una bacteria calcificante que asimile el agente de adhesión, como por ejemplo *Sporosarcina pasteurii*.

25 Ventajosamente, el medio de adhesión comprende una concentración eficaz de inulina superior a 0 e inferior a 10 g/l, y preferentemente comprendida entre 1 y 10 g/l en el medio de cultivo o en el inóculo, y preferentemente comprendida entre 250 y 1000 mg/l en el medio de calcificación.

Ventajosamente, se ha descubierto de manera sorprendente que la adición combinada del agente de adhesión y de al menos una sal de ión divalente permite obtener una muy buena adhesión de las bacterias. Esta adición combinada puede realizarse de manera simultánea, o sucesiva, es decir añadir la sal de ión divalente al medio de cultivo, y/o al inóculo, y/o al medio calcificante antes y/o después de la adición del agente de adhesión.

30 El ión divalente se selecciona ventajosamente entre iones de calcio, magnesio, níquel, zinc y una cualquiera de sus combinaciones.

Los iones de calcio se añaden preferentemente en forma de de nitrato de calcio, de cloruro de calcio o de otra sal de calcio.

35 Preferentemente, esta sal es soluble en el medio al que se añade. Pueden combinarse sales de iones divalentes y, en particular, de calcio, para beneficiarse de un efecto ventajoso.

Ventajosamente, la concentración de iones divalentes y, en particular, de calcio o de magnesio, está comprendida entre 1 y 50 mM. Típicamente pueden añadirse al medio de 2 a 20mM, como por ejemplo 10 mM de sal de calcio o de magnesio.

40 De este modo, el método para mejorar la resistencia de un material poroso o permeable comprende ventajosamente la puesta en contacto de las bacterias calcificantes con al menos una sal de iones divalentes y, en particular, de calcio o de magnesio.

Del mismo modo, el medio de adhesión en la presente invención puede comprender al menos una sal de iones divalentes y, en particular, de calcio o de magnesio.

45 De acuerdo con una realización preferida, se cultivan las bacterias calcificantes en presencia de un agente de adhesión, que comprende preferentemente inulina, como la achicoria (por ejemplo 1,5 g/l de achicoria), y se le añade el medio de cultivo el agente de adhesión, que contiene preferentemente inulina, como la achicoria (por ejemplo entre 0,5 y 8 g/l, y típicamente 2 g/l), y una sal de calcio o de magnesio (por ejemplo de 1 a 50 mM, y típicamente 10 mM), en el momento de la puesta en contacto de las bacterias calcificantes con un material poroso o permeable, o un poco antes.

Se les aportan a las bacterias calcificantes los nutrientes necesarios para asegurar su supervivencia. Las soluciones nutritivas son soluciones convencionales, bien conocidas por el experto en la materia. Éstas aportan a las bacterias calcificantes una fuente de carbono orgánico, de nitrógeno y de otros elementos indispensables para su función fisiológica. Se entiende bien que, si se utilizan varios tipos de bacterias calcificantes, puede ser necesario utilizar soluciones nutritivas diferentes, que respondan a las necesidades de cada tipo de bacterias.

A título indicativo, un ejemplo de medio de cultivo para las bacterias calcificantes es un medio que contiene fuentes de carbono complejas tal como el medio Columbia o un medio que contiene extracto de levadura.

Se entiende por "medio calcificante", un medio que permita generar CaCO_3 en presencia de bacterias calcificantes. A título indicativo, un medio calcificante para las bacterias calcificantes es un medio que contiene urea y calcio.

La invención también se refiere a la utilización de al menos un agente de adhesión asimilable por una bacteria calcificante, eventualmente en combinación con al menos una sal de iones divalentes, seleccionados preferentemente entre iones de calcio, magnesio, níquel, zinc y una cualquiera de sus combinaciones, y más preferentemente seleccionados entre iones de calcio o de magnesio, para mejorar la calcificación de un soporte mineral u orgánico poroso o permeable, tal como un suelo, por ejemplo arena silíceo tal como arena de Fontainebleau, o un soporte silíceo y/o calcáreo, por vía biotecnológica, utilizando preferentemente *Sporosarcina pasteurii*.

La presente invención también se refiere a una composición para la consolidación de suelos que comprende al menos un tipo de bacterias calcificantes y que comprende una concentración eficaz de al menos un agente de adhesión para su asimilación por parte de dichas bacterias calcificantes, como por ejemplo *Sporosarcina pasteurii*, comprendiendo dicha composición eventualmente un medio de cultivo de las bacterias calcificantes, y/o eventualmente al menos una sal de iones divalentes, seleccionados preferentemente entre los iones de calcio, magnesio, níquel, zinc y una cualquiera de sus combinaciones, y seleccionados más preferentemente entre los iones de calcio o de magnesio. Las diferentes variantes de realización se han mencionado anteriormente.

La presente invención se refiere a un método para el refuerzo de un suelo, en particular la consolidación de suelos licuables, la estabilización de pendientes, particularmente en el marco de la lucha contra los siniestros de los edificios en caso de sismos, la calcificación de soportes minerales u orgánicos porosos o permeables, o la renovación o la protección de fachadas, empleando dicho método, el método o el procedimiento descrito anteriormente.

Ventajosamente, el soporte tiene una granulometría comprendida esencialmente entre 10 μm y 2 mm. Esta granulometría corresponde al tamaño de las partículas que no pasan por un tamiz que tiene un tamaño de malla inferior a 10 micrómetros, con la exclusión de las partículas que no pasan por un tamiz que tiene un tamaño de malla inferior a 2 mm. Preferentemente, el soporte comprende el 80% de dichas partículas y, más preferentemente, el conjunto de las partículas cumplen esta granulometría. Se prefiere utilizar, por ejemplo, una arena silíceo tal como arena de Fontainebleau que tiene partículas de un tamaño comprendido entre 50 y 500 micrómetros (μm) (análisis mediante tamizado).

Ventajosamente, un primer método de refuerzo del suelo comprende:

- la inyección, en un material poroso o permeable, de una fase acuosa que comprende al menos un tipo de bacterias calcificantes, y preferentemente *Sporosarcina pasteurii*, habiéndose cultivado dichas bacterias calcificantes eventualmente en presencia de un agente de adhesión asimilable por las bacterias calcificantes, y preferentemente en presencia de inulina,
- la activación de la calcificación mediante la puesta en contacto de las bacterias calcificantes con una fase acuosa calcificante que comprende al menos un agente de adhesión asimilable por las bacterias calcificantes, y preferentemente inulina, y eventualmente al menos una sal de iones divalentes, preferentemente seleccionados entre iones de calcio, magnesio, níquel, zinc y una cualquiera de sus combinaciones, y más preferentemente seleccionados entre iones de calcio o de magnesio.

Ventajosamente, otro método de refuerzo del suelo comprende:

- la inyección, en un material poroso o permeable, de una fase acuosa que comprende al menos un tipo de bacterias calcificantes, y preferentemente *Sporosarcina pasteurii*, habiéndose cultivado dichas bacterias calcificantes en presencia de un agente de adhesión asimilable por las bacterias calcificantes, y preferentemente en presencia de inulina, y eventualmente al menos una sal de iones divalentes, preferentemente seleccionados entre iones de calcio, magnesio, níquel, zinc y una cualquiera de sus combinaciones, y más preferentemente seleccionados entre iones de calcio o de magnesio;
- la activación de la calcificación mediante la puesta en contacto de las bacterias calcificantes con una fase acuosa calcificante que comprende eventualmente al menos un agente de adhesión asimilable por las bacterias calcificantes, y preferentemente inulina, y eventualmente al menos una sal de iones divalentes,

preferentemente seleccionados entre iones de calcio, magnesio, níquel, zinc y una cualquiera de sus combinaciones, y más preferentemente seleccionados entre iones de calcio o de magnesio.

5 El método de refuerzo de suelos permite particularmente el refuerzo de suelos finos o licuables que tienen una permeabilidad muy reducida, del orden de 10^{-5} m/s. La consolidación o la estanqueidad de dichos suelos implica la inyección de solución de bacterias calcificantes que puedan penetrar profundamente en el suelo mediante el medio de cultivo.

10 Por ejemplo, las bacterias calcificantes se inyectan en el suelo, mediante gravedad o a presión, por medio de perforaciones de alimentación. Ventajosamente, el método de refuerzo comprende una alimentación mediante circulación de las bacterias calcificantes en solución acuosa. Esta circulación puede asegurarse por medio de perforaciones de alimentación, de perforaciones de bombeo o de captación. Estos procedimientos comprenden ventajosamente medios de control de la evolución del tratamiento para adaptar el tratamiento. Estas técnicas se describen particularmente en la patente FR 2 873 725 B1 (de la Compagnie du sol).

En las figuras:

La figura 1 representa la estructura de la inulina;

15 La figura 2 representa la evolución del crecimiento de *Sporosarcina pasteurii* en un medio de cultivo con o sin achicoria;

La figura 3 compara la DO (Densidad óptica) acumulada en la entrada y en la salida de la columna en función del volumen inyectado de un medio de cultivo sin achicoria de acuerdo con el ejemplo 3;

20 La figura 4 compara la DO acumulada en la entrada y en la salida de la columna en función del volumen inyectado de un medio de cultivo con 4 g/l de achicoria de acuerdo con el ejemplo 3;

La figura 5 representa un gráfico de la estimación de la tasa de fijación mediante adición de achicoria y de una fuente de calcio de acuerdo con el ejemplo 4;

La figura 6 representa la resistencia a la compresión de columnas de arena de Fontainebleau inoculadas con *Sporosarcina pasteurii* después de la reacción con el medio calcificante que contiene o no inulina;

25 La figura 7 es una imagen de MEB de una arena bio-calcificada en ausencia de inulina en los medios de cultivo y de calcificación;

La figura 8 es una imagen de MEB de una arena bio-calcificada en presencia de inulina en el medio de calcificación.

30 Otros objetivos, características y ventajas de la invención serán evidentes claramente para el experto en la materia después de la lectura de la descripción explicativa que hace referencia a ejemplos que se dan solamente a título de ilustración y que no pretenderían limitar, de ninguna manera, el alcance de la invención.

Los ejemplos forman parte integrante de la presente invención y cualquier característica que parezca nueva con respecto a un estado cualquiera de la técnica anterior a partir de la descripción tomada en su conjunto, incluyendo los ejemplos, forma parte integrante de la invención en su función y en su generalidad.

35 De este modo, cada ejemplo tiene un alcance general.

Por otro lado, en los ejemplos, todos los porcentajes se dan en peso, a no ser que se indique lo contrario, y la temperatura se expresa en grados Celsius a no ser que se indique lo contrario, y la presión es la presión atmosférica, a no ser que se indique lo contrario.

EJEMPLOS

40 Ejemplo 1: Cribado de azúcares asimilables por una bacteria calcificante

Para provocar la fijación de las bacterias sobre un soporte, pueden estimularse ciertas rutas bioquímicas para sintetizar exopolisacáridos (EPS). Los EPS son polímeros de azúcares, cuyo papel principal es facilitar la adhesión de las bacterias disminuyendo las fuerzas de interacciones entre el microorganismo y su entorno inmediato (ejemplo: soporte sólido de tipo arena de Fontainebleau).

45 La primera etapa fue realizar un cribado de los diferentes azúcares que existen para identificar aquel o aquellos que son asimilables y que estimulan la síntesis de los EPS en *Sporosarcina pasteurii*, preferentemente sin inhibir la síntesis de ureasa.

Para ello se utilizaron dos tipos de tiras de API: API 20 E y API 50CH. Estos ensayos se presentan en forma de micro-tubos que contienen sustratos deshidratados y que se inoculan con una suspensión bacteriana. Las

reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color espontáneos o revelados por la adición de los reactivos. Los resultados se presentan en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Identificación de los azúcares asimilables por *S. pasteurii* (CIP 66.21 Pasteur) con ayuda de tiras de API. Lo que se indica como positivo (+) corresponde a un cambio de color en la cúpula debido a una producción de ácido en anaerobiosis o a una asimilación que se traduce en un crecimiento del microorganismo.

5

Ensayos	Componentes	resultados
ONPG	2-NITROFENILBETAdD GALACTOPIRANÓSIDO para beta galactosidasa	-
ADH	L-arginina/ARGININA DIHIDROLASA	-
LDC	I-lisina /LISINA DESCARBOXILASA	-
oçdc	I-ornitina/ORNITINA DESCARBOXILASA	-
CIT	Citrato/UTILIZACIÓN DE CITRATO	-
H2S	Tiosulfato sódico/PRODUCCIÓN DE H2S	-
UREA TDA	UREASA TRIPTÓFANO DESAMINASA	+
IND	PRODUCCIÓN DE INDOL	-
VP	Piruvato de Na/producción de acetoína	-
GEL	Gelatinasa (gelatina)	-
GLU	D glucosa/fermentación oxidación	-
MAN	D-manitol/fermentación oxidación	-
INO	inositol//fermentación-oxidación	-
SOR	D-sorbitol/fermentación-oxidación	-
RHA	L-ramnosa/fermentación-oxidación	-
SAC	D-Sacarosa/fermentación-oxidación	-
MEL	Amigdalina/fermentación-oxidación	-

ES 2 377 822 T3

ARA	L-arabinosa/fermentación-oxidación	-
ox	Citocromo-oxidasa	-
GLY	Glicerol	
ERY	Reitritol	-
DARA	D arabinosa	-
LARA	L-arabinosa	-
RIB	D-ribosa	-
DXYL	D-xilosa	-
LXYL	L-xilosa	-
ADO	D-adonitol	-
MDX	Metil beta d-xilopiranosido	-
GAL	D-galactosa	-
FRU	D-fructosa	-
MNE	D-Manosa	-
SBE	L-sorosa	-
RHA	L-Ramnosa	-
DUL	Dulcitol	-
MDM	Metil alfa d-manopiranosido	-
MDG	Metil alfa d-glucopiranosido	-
NAG	n-acetilglucosamina	-

ES 2 377 822 T3

ARB	Arbutina	-
ESC	Esculina citrato de hierro	-
SAL	Salcina	-
CEL	D-celobiosa	-
MAL	D-maltosa	-
LAC	D-lactosa	-
MEL	D-melibiosa	-
TRE	D-trehalosa	-
INU	Inulina	+
MLZ	D-melezitosa	
RAF	D-rafinosa	-
AMD	Almidón	-
GLYG	Glucógeno	-
XLT	Xilitol	-
GEN	Gentiobiosa	-
TUR	D-turanosa	-
LYX	D-lixosa	-
TAG	D-tagatosa	-
LFUC	L-fucosa	-
DARL	D-arabitol	-

LARL	L-arabitol	-
GNT	Gluconato de potasio	-
2KG	Cetogluconato de potasio 2	-
5KG	Cetogluconato de potasio 5	-

5 Este análisis permitió identificar la inulina (La estructura se da en la figura 1) como fuente de carbono asimilable por *Sporosarcina pasteurii*. Por otro lado, los primeros ensayos realizados con inulina demostraron la adhesión de las bacterias a los artículos de vidrio de laboratorio mediante el desarrollo de EPS. La inulina está presente de forma natural en las plantas y sobre todo en la achicoria (raíces) que la contiene en un 78%. Por esto se utilizará la achicoria en los siguientes experimentos.

10 **Ejemplo 2: Mejora del crecimiento de bacterias calcificantes, y de la síntesis de EPS en presencia de inulina en el medio de cultivo**

10 Para determinar la cantidad de inulina necesaria para actuar sobre la síntesis de ureasa y sobre la producción de EPS en *Sporosarcina pasteurii*, una parte de la fuente de carbono nitrogenada (extracto de levadura) se sustituyó por achicoria.

15 Tanto en el inóculo (20 g de extracto de levadura + 20 g de urea, por 1 l de inóculo) como en el medio de cultivo (10 g de extracto de levadura + 2,4 g de urea + 10 μ M de NiCl₂ + 3 g de NaCl, por 1 l de medio de cultivo), la sustitución de 1/3 a 1/2 (en masa) del extracto de levadura por achicoria mejoró la fijación a los artículos de vidrio de las bacterias mientras se conservaba o se aumentaba su actividad enzimática específica.

Se observa que la adición de inulina en las proporciones mencionadas anteriormente permitió un crecimiento más rápido de las bacterias (figura 2).

La dosificación de inulina recomendada en los medios de cultivo está comprendida, por lo tanto, entre 0 y 10 g/l.

20 **Ejemplo 3: Mejora de la adhesión de bacterias calcificantes en presencia de inulina en el medio de cultivo**

20 La inulina, en forma de achicoria, se introdujo en los medios de cultivo para determinar su influencia sobre la adhesión de las bacterias con respecto al soporte a tratar. La achicoria utilizada es el polvo de extracto de achicoria liofilizado obtenido de la raíz de *Cichorium Intibus* y comercializada con el nombre comercial de "Achicoria soluble Leroux". Para ello, se realizaron dos ensayos por paralelo en columnas:

25 Las columnas estaban constituidas por un tubo de PVC de 63 mm de diámetro y 200 mm de altura situado entre dos bases de PVC. Un centímetro de arena de filtro se colocaba en los dos extremos y el conjunto de la columna se completaba con arena de Fontainebleau apisonada bajo el agua con ayuda de golpecitos. La arena de Fontainebleau es la arena de calidad NE34 de SIFRACO. Las inyecciones se realizan de arriba hacia abajo.

30 Las bacterias (*Sporosarcina pasteurii* - CIP 66.21 Pasteur) se cultivaron en dos medios de cultivo (1 l de agua de laboratorio) diferentes que contienen 10 g de extracto de levadura, 2,4 g de urea, 10 μ M de NiCl₂ y 3 g de NaCl, conteniendo uno de los medios además 4 g/l de achicoria. Cuando las bacterias están en fase exponencial (DO > 2,5), un volumen de porosidad de este medio se inyecta en los columnas con una velocidad de percolación de 20 cm/h y a continuación se le deja reaccionar durante 3 horas. El líquido intersticial se disipa a continuación y se sustituye por 2 volúmenes de porosidad de agua desmineralizada a una velocidad de percolación de 20 cm/h. El conjunto de los experimentos se realizó a 16°C.

35 El seguimiento de la DO en la salida de la columna permite conocer la tasa de unión de las bacterias en la arena de Fontainebleau. Una medición de DO patrón se realiza previamente en cada uno de los medios a los que se les extrajeron las bacterias para librarse de las diferencias de lectura vinculadas al propio medio. La diferencia de las DO de entrada entre los medios con y sin achicoria se explica por que el crecimiento bacteriano es mayor en presencia de inulina.

40 Siendo el volumen de la porosidad de la columna de 250 ml, la detección de las primeras bacterias en la salida de la columna se realiza después de haber inyectado 250 ml de medio de cultivo. La representación gráfica de la acumulación de DO en la entrada y en la salida de la columna permite visualizar fácilmente la tasa de unión de las bacterias sobre el soporte granular. De este modo, una DO de entrada de 2, medida cada minuto, da una DO de

entrada acumulada de 120 al cabo de una hora de inyección (figura 4). La medición de las DO de salida se realiza también cada minuto. La tasa de fijación se calcula de la siguiente manera: Tasa de fijación = (DO de entrada final acumulada - DO de salida final acumulada) / DO de entrada final acumulada.

5 Las figuras 3 y 4 comparan la acumulación de las mediciones de DO de entrada y de salida de las columnas respectivamente sin y con achicoria en el medio de cultivo. El ensayo sin achicoria muestra una tasa de fijación de las bacterias del 30% mientras que la presencia de achicoria en el medio de cultivo permite una fijación del 46% de las bacterias.

Ejemplo 4: Mejora de la adhesión de bacterias calcificantes en presencia de inulina y de sal de calcio en el medio de cultivo

10 La acción de la inulina sobre la adhesión bacteriana, añadida el medio de cultivo en forma de achicoria (véase el ejemplo 3), puede reforzarse mediante la presencia de iones divalentes.

4.1. iones de calcio:

Las columnas se prepararon de acuerdo con el ejemplo 3.

15 Las bacterias (*Sporosarcina pasteurii* - CIP 66.21 Pasteur) se cultivaron en un medio de cultivo (1 l de agua de laboratorio) que contenía 10 g de extracto de levadura, 3 g de NaCl, 2,4 g de urea, 0,1 g de MgCl₂, 0,0128 g de NiCl₂. Cuando las bacterias están al final de la fase exponencial, se le añadió al medio de cultivo:

- una fuente de calcio (10 mM de Ca(NO₃)₂);
- o achicoria a razón de 4 u 8 g/l;
- o una fuente de calcio (10 mM de Ca(NO₃)₂) y achicoria a razón de 4 u 8 g/l.

20 El conjunto se dejó en agitación una hora antes de su inyección en las columnas.

Las condiciones de inyección son idénticas a las del ejemplo 3. El conjunto de los experimentos se realizó a 20°C.

25 Las acumulaciones de DO de entrada y de salida de las columnas se comparan y se expresan en forma de porcentaje de pérdida de DO, lo que representa la tasa de fijación de las bacterias en la columna. La figura 5 representa las tasas de fijación de las bacterias estimuladas mediante la adición de achicoria, de sal de calcio o de ambas en el medio de cultivo antes de la inyección.

Los resultados se resumen en la tabla 2 y la figura 5:

Tabla 2

	10 mM de Ca(NO ₃) ₂ + 4g de achicoria	10 mM de Ca(NO ₃) ₂ + 8 g de achicoria	10 mM de Ca(NO ₃) ₂	4 g de achicoria	8 g de achicoria	Control
Tasa de fijación (%)	60	64,3	49,5	43	53	39

30 El control sin adición de sal de calcio ni de achicoria suplementaria en el medio de cultivo tiene una tasa de fijación del 39%. La adición de achicoria permite aumentar esta tasa, pero la adición de achicoria acoplada con nitrato de calcio permite aumentar significativamente los valores de fijación celular con respecto a un procedimiento sin adición de un agente de adhesión cualquiera. En este caso se identifica bien un efecto de sinergia entre la achicoria y la sal de calcio.

4.2. iones de magnesio :

35 El protocolo es idéntico al del ejemplo 4.1 sustituyendo los iones de calcio (Ca(NO₃)₂) por iones de magnesio (Mg(NO₃)₂).

Los resultados obtenidos muestran una sinergia similar a la obtenida con los iones de calcio, en presencia de inulina.

Ejemplo 5: Mejora de la calcificación en presencia de inulina en el medio calcificante

Se introdujo inulina en forma de achicoria en los medios de calcificación para determinar su acción sobre el proceso de calcificación. Para ello, se realizaron dos columnas:

5 Las columnas estaban constituidas por un tubo de PVC de 63 mm de diámetro y 200 mm de altura colocado entre dos bases de PVC. Un centímetro de arena de filtro se colocaba en los dos extremos y el conjunto de la columna se completaba con arena de Fontainebleau apisonada bajo el agua con ayuda de golpecitos. La arena de Fontainebleau es la arena de calidad NE34 de SIFRACO. Las inyecciones se realizaban de arriba hacia abajo.

10 Las bacterias (*Sporosarcina pasteurii* - CIP 66.21 *Pasteur*) se cultivaron en un medio de cultivo (1 l de agua de laboratorio) que contenía 10 g de extracto de levadura y 2,4 g de urea. Cuando estaban al final de la fase exponencial (DO > 2,5), un volumen de porosidad de este medio se inyectó en las columnas con un caudal de 85 ml/h o una velocidad de percolación de 6,6 cm/h.

Cinco volúmenes de porosidad de medio calcificante (CaCl₂ y urea equimolar a 0,5 M) se inyectaron a continuación con un caudal de 60 ml/h para activar la calcificación. En una de las columnas, al medio calcificante se le añadió 1 g/l de achicoria.

15 Los aplastamientos de estas dos columnas muestran una resistencia a la compresión dos veces superior para la muestra que contiene achicoria con respecto a la muestra de control (figura 6). Es preciso observar que, en la curva correspondiente al medio con adición de inulina, la resistencia de la arena de Fontainebleau es mayor, lo que indica una mejor calcificación bacteriana. Las rupturas de pendiente son típicas de la adhesión de las bacterias al soporte. La medición de la resistencia a la compresión se realizó de acuerdo con el protocolo de la norma NF EN 12390-3.

20 Las imágenes tomadas con MEB (Microscopio Electrónico de Barrido) muestran que los cristales de calcita neo-formados tienen tamaños de aproximadamente 10 μm en ausencia de inulina en los medios de cultivo y de calcificación (figura 7), mientras que este tamaño pasa a aproximadamente 50 μm cuando el medio de calcificación contiene inulina (figura 8). Esta diferencia de tamaño de calcita neo-formada podría explicar las diferencias de valores de resistencia a la compresión.

25

REIVINDICACIONES

1. Método para mejorar la resistencia de un material poroso o permeable, preferentemente un soporte poroso o permeable como un soporte mineral y/u orgánico poroso o permeable, tal como un suelo, una roca, o un material de construcción, que comprende:
- 5 - la puesta en contacto de al menos un tipo de bacterias calcificantes con un material poroso o permeable;
- la puesta en contacto de las bacterias calcificantes con un medio calcificante, **caracterizado porque** dicho método comprende:
- la puesta en contacto de las bacterias calcificantes con un agente de adhesión y la asimilación, por parte de las bacterias calcificantes, del agente de adhesión.
- 10 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el agente de adhesión se añade al medio de cultivo de las bacterias, y/o al inóculo, antes o durante la puesta en contacto de las bacterias calcificantes, con el material poroso o permeable, o se añade al medio calcificante antes o durante la puesta en contacto de las bacterias calcificantes con el medio calcificante, o se añade al medio de cultivo y al medio calcificante.
- 15 3. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado porque** la bacteria calcificante es *Sporosarcina pasteurii*.
4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el agente de adhesión se selecciona entre el grupo constituido por inulina o sus derivados, la batata de caña, la patata dulce, el salsifí, el puerro, la achicoria, la alcachofa, la cebolla, el ajo, la chalota, el helenio (*Inula helenium*) y una cualquiera de sus mezclas.
- 20 5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** el método comprende la puesta en contacto de las bacterias calcificantes con al menos una sal de iones divalentes.
6. Método de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** comprende, como ión divalente, una sal de calcio en forma de cloruro de calcio, de nitrato de calcio o de una combinación de ambos.
- 25 7. Método para el refuerzo del suelo, en particular para la consolidación de suelo licuable, la estabilización de pendientes, la calcificación de soportes minerales u orgánicos porosos o permeables, o la renovación o la protección de fachadas, comprendiendo dicho método la implementación de un método tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el método es un método de refuerzo del suelo que comprende:
- 30 - la inyección, en un suelo, de una fase acuosa que comprende al menos un tipo de bacterias calcificantes, y preferentemente *Sporosarcina pasteurii*, habiéndose cultivado dichas bacterias calcificantes eventualmente en presencia de un agente de adhesión asimilable por las bacterias calcificantes, y preferentemente en presencia de inulina,
- 35 - la activación de la calcificación mediante la puesta en contacto de las bacterias calcificantes con una fase acuosa calcificante que comprende al menos un agente de adhesión asimilable por las bacterias calcificantes, y preferentemente inulina, y eventualmente al menos una sal de ión divalente.
9. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el método es un método de refuerzo del suelo que comprende:
- 40 - la inyección, en un suelo, de una fase acuosa que comprende al menos un tipo de bacterias calcificantes, y preferentemente *Sporosarcina pasteurii*, habiéndose cultivado dichas bacterias calcificantes en presencia de un agente de adhesión asimilable por las bacterias calcificantes, y preferentemente en presencia de inulina,
- 45 - la activación de la calcificación mediante la puesta en contacto de las bacterias calcificantes con una fase acuosa calcificante que comprende eventualmente al menos un agente de adhesión asimilable por las bacterias calcificantes, y preferentemente inulina, y eventualmente al menos una sal de ión divalente.
10. Composición para la consolidación de suelos que comprende al menos un tipo de bacterias calcificantes, como por ejemplo *Sporosarcina pasteurii*, comprendiendo además dicha composición un medio de cultivo y/o un medio de calcificación para al menos dicho tipo de bacterias calcificantes, y una concentración de inulina superior a 0 e inferior a 10 g/l en el medio de cultivo o en el inóculo o en el medio de calcificación.

11. Composición para la consolidación de suelos de acuerdo con reivindicación 10, **caracterizada porque** comprende también al menos una sal de ión divalente.

5 12. Utilización de al menos un agente de adhesión asimilable por una bacteria calcificante, eventualmente en combinación con al menos una sal de ión divalente, para mejorar la calcificación de un soporte mineral u orgánico poroso o permeable, tal como un soporte silíceo y/o calcáreo, o un suelo, por vía biotecnológica, preferentemente utilizando *Sporosarcina pasteurii*.

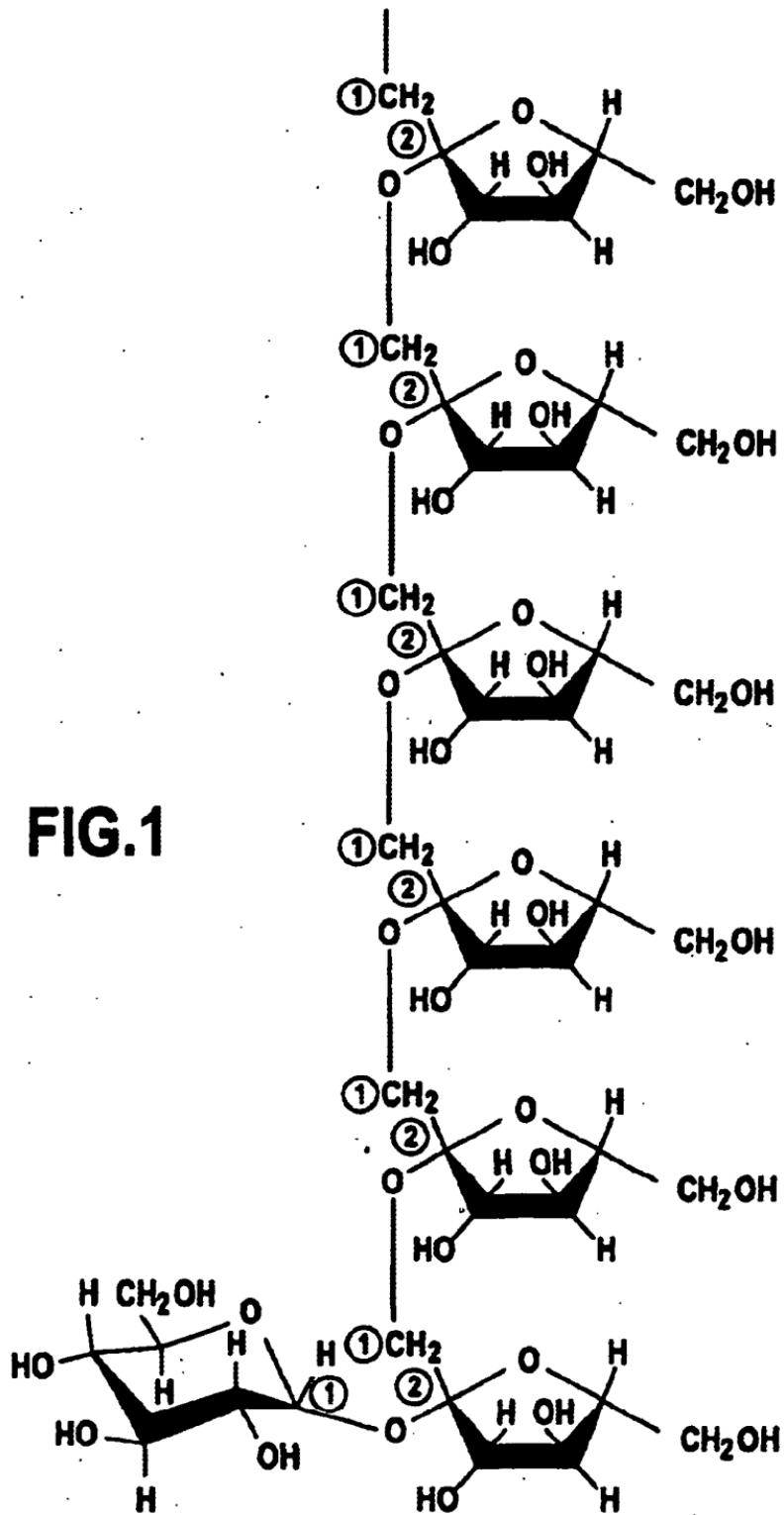
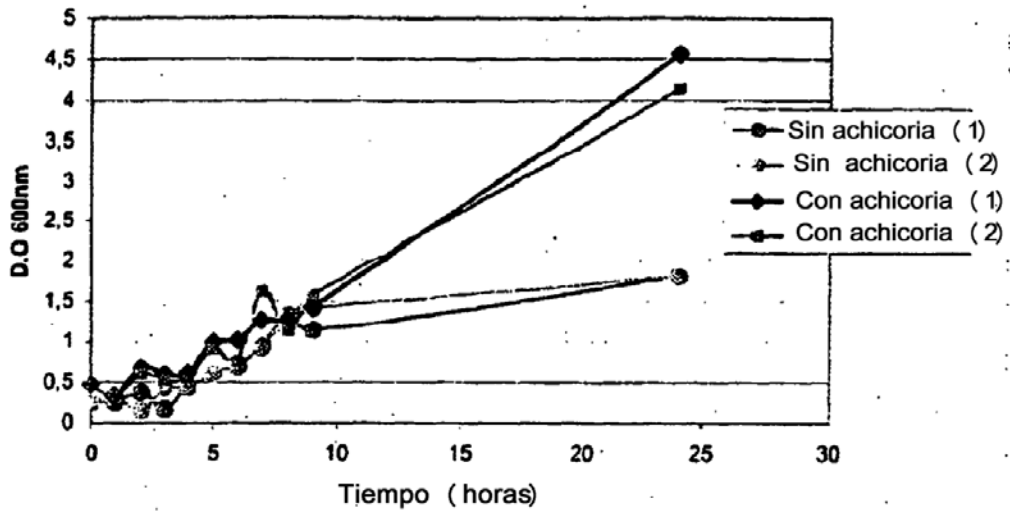


FIG.1

ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA INULINA

FIG.2

Comparación de las curvas de crecimiento de *S. pasteurii* entre un medio de cultivo con o sin achicoria



Comparación entre la acumulación de la DO de entrada y la DO de salida en función del volumen de inyección

Medio sin achicoria

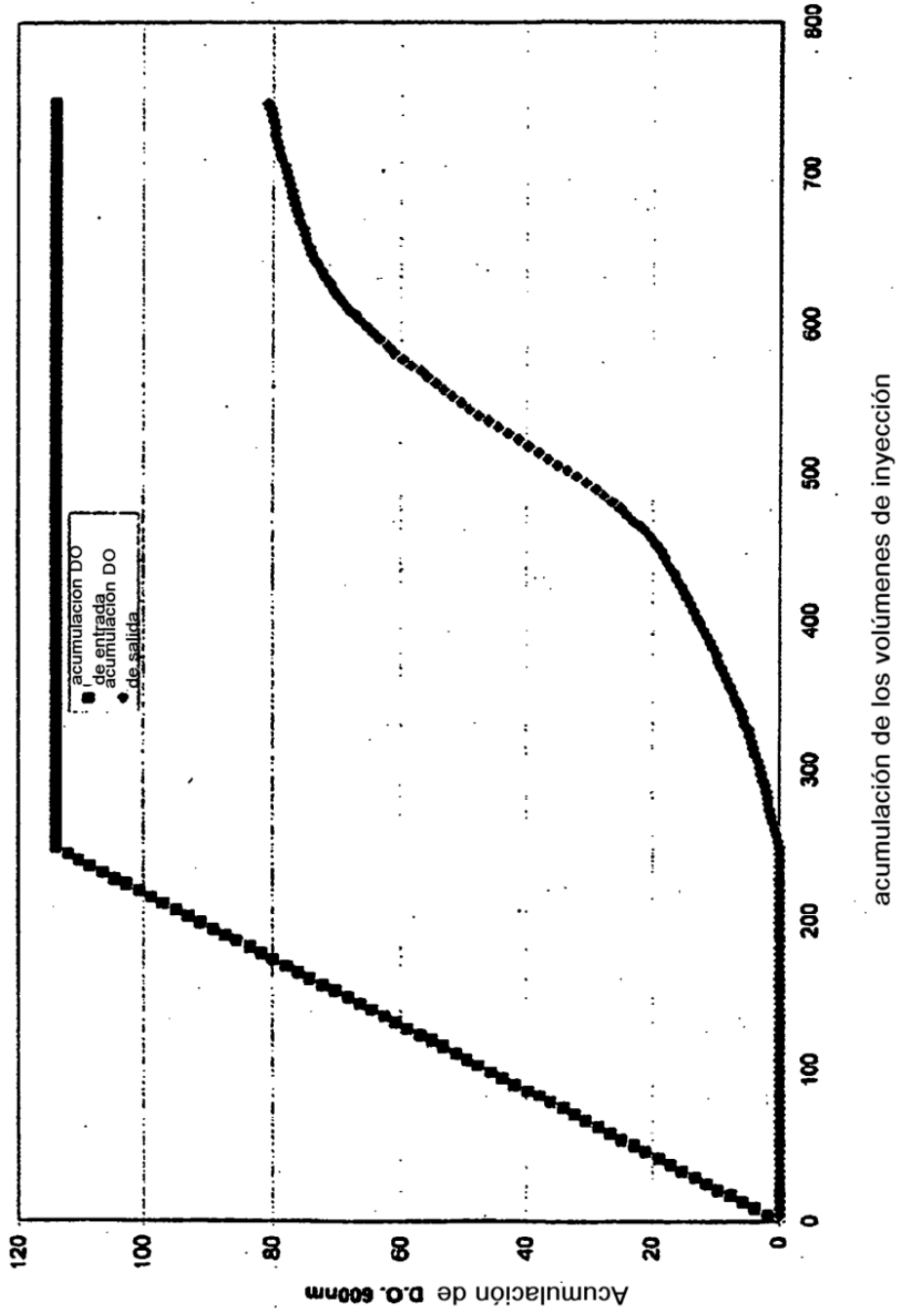


FIG.3

Comparación entre la acumulación de la DO de entrada y la DO de salida en función del volumen de inyección
Medio con 4 g/l de achicoria

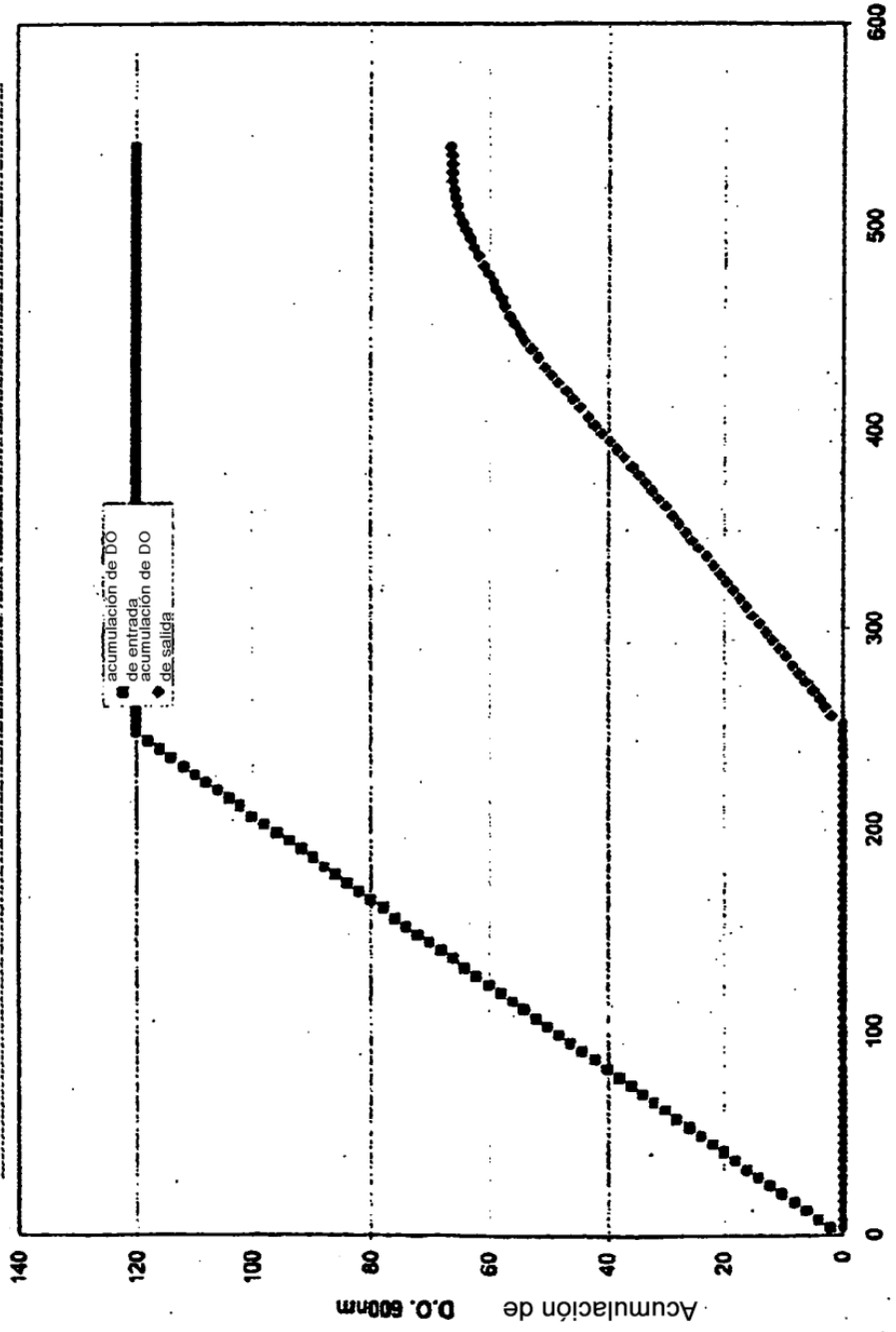


FIG.4

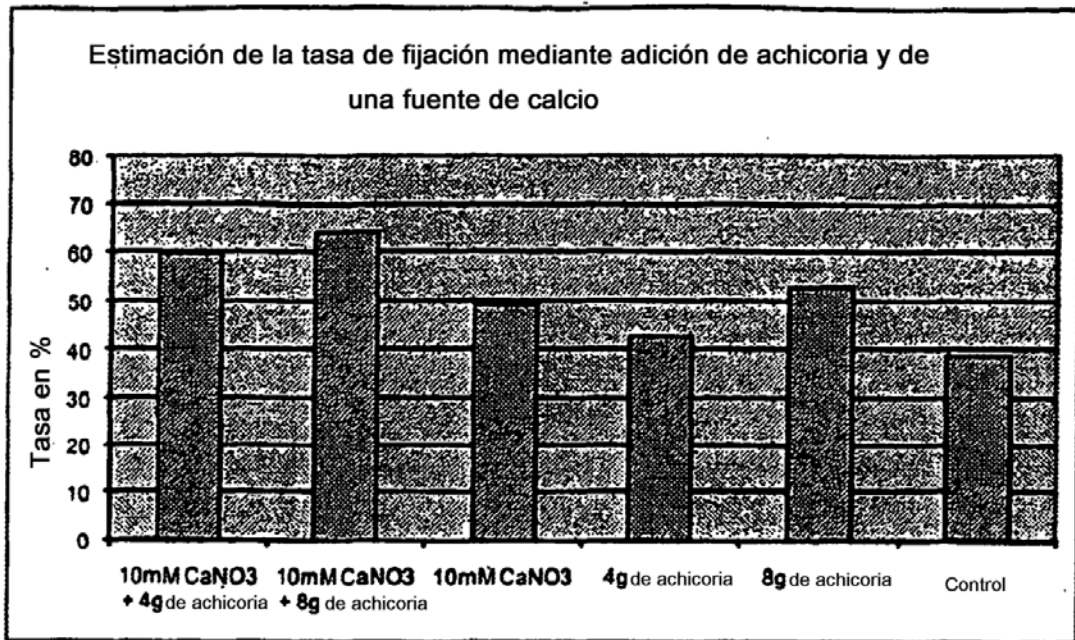


FIG.5

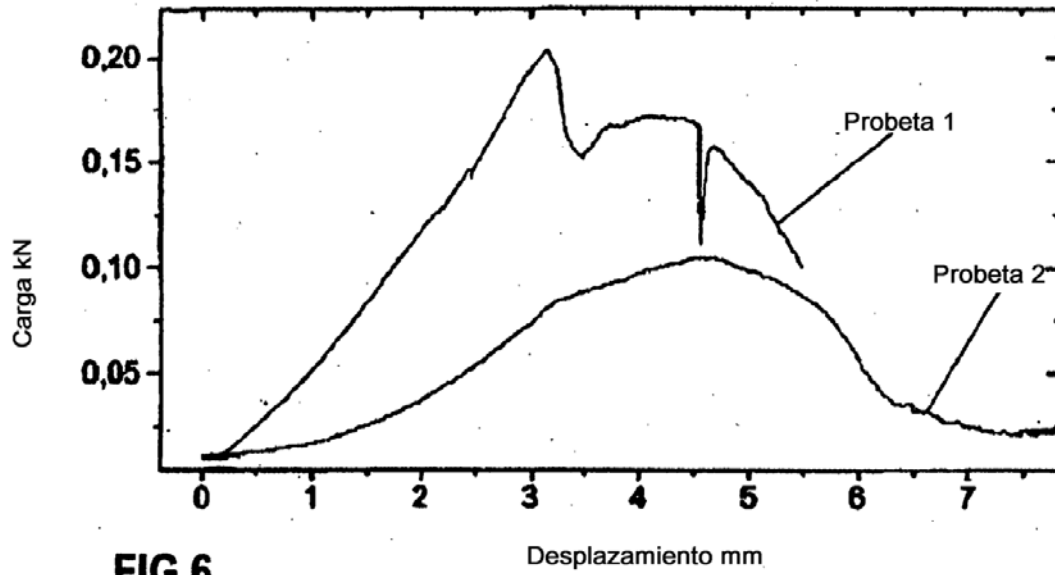


FIG.6

			Carga máxima (kN)	Tensión máxima (MPa)	Módulo de Young (MPa)	Pendiente (N/mm)
10cm	Probeta 1	41	0,105	0,037	2,865	81,000
10cm	Probeta 2	40	0,204	0,072	2,932	82,912



FIG.7

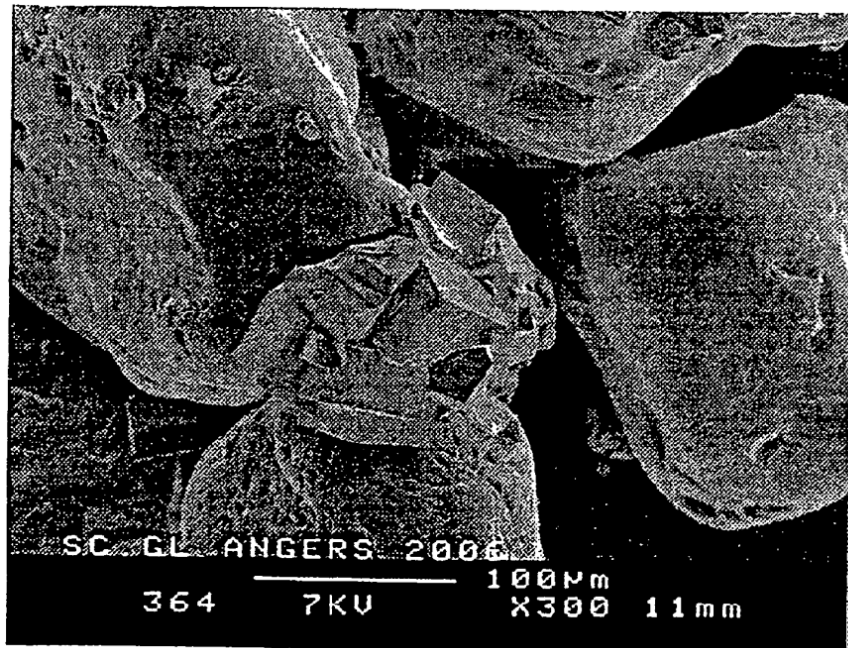


FIG.8