

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 340 905**

21 Número de solicitud: 200803484

51 Int. Cl.:
C09K 17/16 (2006.01)
C05F 5/00 (2006.01)
C05F 11/08 (2006.01)
C05G 3/04 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **09.12.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **10.06.2010**

Fecha de la concesión: **17.05.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **27.05.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
27.05.2011

73 Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 70 %)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Università degli Studi di Milano-Bicocca (Titular al 30 %)

72 Inventor/es: **Benítez León, Emilio;**
Moreno Sánchez, Beatriz;
Gennaro, Patrizia di y
Nogales Vargas-Machuca, Rogelio

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Uso de vermicompost de alperujo para la descontaminación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos.**

57 Resumen:

Uso de vermicompost de alperujo para la descontaminación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos.

La presente invención se refiere al uso de vermicompost de alperujo como enmienda orgánica en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH). El vermicompost induce la expresión de genes implicados en la degradación de naftaleno (naftaleno-dioxigenasa, NDO) de comunidades bacterianas del suelo. En la presente invención, el naftaleno es utilizado como modelo químico para la degradación de PAH.

ES 2 340 905 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Uso de vermicompost de alperujo para la descontaminación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos.

La presente invención se refiere al uso de vermicompost de alperujo como enmienda orgánica en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH). El vermicompost induce la expresión de genes implicados en la degradación de naftaleno (naftaleno-dioxigenasa, NDO) de comunidades bacterianas del suelo. En la presente invención, el naftaleno es utilizado como modelo químico para la degradación de PAH.

Estado de la técnica anterior

Los hidrocarburos aromáticos son agentes contaminantes comúnmente encontrados en el suelo y las aguas subterráneas como resultado de la actividad industrial antrópica. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) son derivados aromáticos del benceno generados en erupciones volcánicas, incendios forestales o en la combustión de derivados del petróleo o del carbón. Los PAHs presentan un alto potencial de riesgo para la salud; siete de estos compuestos son conocidos agentes carcinógenos (Harvey (1996). *Polycyclic Aromatic Compounds* 9:1-23).

Los estudios de la degradación del naftaleno pueden ser de gran interés porque el naftaleno es un agente contaminante común que sirve como modelo químico para la degradación de PAHs.

El vermicompostaje es el proceso a través del cual las lombrices digieren desechos de materia orgánica produciendo el llamado vermicompost. El vermicompost de alperujo es el resultado de la digestión, por parte de las lombrices, de un subproducto de las almazaras producido como consecuencia de la extracción de aceite de oliva mediante un sistema de dos fases, constituido por una mezcla de aguas de vegetación o alpechines; partes sólidas de la aceituna, como el hueso, el mesocarpio y la piel; y restos grasos.

El vermicompost de alperujo favorece la retención de solventes clorados, plaguicidas y metales pesados en el suelo, lo que reduce la entrada de estos contaminantes a las aguas subterráneas y a los cultivos. Además, otra aplicación del producto obtenido por el procesamiento de residuos mediante las lombrices, consiste en su uso como biofungicidas (Melgar *et al.* (2003). Potencialidad del compostaje y vermicompost de alperujo para reducir la infección de semillas de guisante por *Pythium ultimum*: Resultados preliminares. Feria Internacional del aceite de oliva, Expoliva 2003).

Explicación de la invención

La presente invención se refiere al uso de vermicompost de alperujo como enmienda orgánica en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH). El vermicompost induce la expresión de genes implicados en la degradación de naftaleno (naftaleno-dioxigenasa, NDO) de comunidades bacterianas del suelo. En la presente invención el naftaleno es utilizado como modelo químico para la degradación de PAH. Para ello, se siguieron dos aproximaciones: La primera fue evaluar el efecto de la adición de vermicompost de alperujo sobre un suelo históricamente contaminado por PAH procedente de un área industrial de Nápoles. En la segunda, se evaluó la respuesta de la población bacteriana originaria del vermicompost a diferentes concentraciones de naftaleno.

En la presente invención se demuestra la biosíntesis de enzimas implicadas en la degradación del naftaleno debido a la adición de vermicompost. Cuando el vermicompost se contamina artificialmente, todo el naftaleno también se degrada. El gen que codifica para la enzima naftaleno dioxigenasa (NDO) se expresa después de un mes de incubación en todos los tratamientos y además, en el suelo enmendado, la adición de vermicompost aumenta la expresión de dicha enzima con una biodegradación concomitante del naftaleno. En el vermicompost contaminado, la expresión es más alta a niveles más bajos de contaminación de naftaleno (10 $\mu\text{g/g}$) mientras que a niveles más elevados (100 $\mu\text{g/g}$) se produce un efecto tóxico sobre la comunidad bacteriana.

La biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos mediante el uso de enmiendas orgánicas de vermicompost de alperujo resultaría una reutilización de un residuo y la descontaminación de PAH de suelos históricamente contaminados.

En este sentido, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de vermicompost de alperujo para aumentar la expresión de enzimas bacterianas que degradan hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH).

La enzima que degrada hidrocarburos policíclicos aromáticos se selecciona, pero sin limitarse, de la lista que comprende naftaleno 1,2-dioxigenasa (NDO), 1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno dehidrogenasa, 1,2-dihidroxinaftaleno dioxigenasa, 2-hidroxicromeno-2-carboxilato isomerasa, trans-o-hidroxibenzilidenopiruvato hidratasa-aldolasa, salicilaldehído deshidrogenasa salicilato 5-hidroxilasa o salicilato hidroxilasa.

Los PAH son derivados poliméricos del benceno que se forman cuando la materia orgánica se somete a una temperatura alta durante un tiempo suficiente. Los PAH son contaminantes o xenobióticos que persisten en suelos, sedimentos o material particulado suspendido en el aire. Son compuestos liposolubles que se forman como productos de la combustión del petróleo y residuos del procesamiento del carbón. Los PAH tienen propiedades tóxicas, mutagénicas o cancerígenas. El PAH de la presente invención se selecciona de la lista que comprende naftaleno, 1-metilnaftale-

ES 2 340 905 B1

no, 2-metilnaftaleno, fenantreno, antraceno, benzo(a)pireno, benzo(e)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, dibenzo(a,h)antraceno, o benzo(g,h,i)perileno, indeno(1,2,3-c,d)pireno.

Una realización preferida es el uso de vermicompost de alperujo donde la enzima es naftaleno dioxigenasa (NDO), también es conocida como (naftaleno 1,2-dioxigenasa). La reacción inicial en la degradación de naftaleno mediada por NDO, es catalizada por un sistema enzimático multicomponente que agrega dos átomos de oxígeno al anillo aromático para formar cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno. Este sistema enzimático consiste en una reductasa, una ferredoxina y un componente catalítico oxigenasa. El componente catalítico, llamado naftaleno 1,2-dioxigenasa (NDO), es un hexámero $\alpha_3\beta_3$. La subunidad α de la NDO (NDO α), contiene el sitio activo y la subunidad β más pequeña quizás tenga solamente un rol estructural. La enzima NDO consta de múltiples subunidades: una polipéptido-reductasa (Rd, peso molecular de aproximadamente 37 KD); una polipéptido-ferredoxina hierro-azufre (Fd, peso molecular de aproximadamente 13 kD); y una proteína hierro-azufre-oxigenasa (ISP) terminal. La propia ISP consta de cuatro subunidades. Es conocido que la ISP se une al naftaleno, y que en presencia de NADH, Rd, Fd y oxígeno lo reduce a cis-naftaleno-dihidrodiol. La Fd es el polipéptido que limita la proporción en esta catálisis de oxidación del naftaleno.

Según otra realización preferida, el vermicompost de alperujo se usa para la descontaminación de suelos contaminados con PAH.

El término “suelo” tal como se entiende en la presente invención hace referencia al sistema estructurado, biológicamente activo, que tiende a desarrollarse en la superficie de las tierras emergidas por la influencia de la intemperie y de los seres vivos. El término suelo comprende cualquier tipo de horizonte seleccionado de la lista que comprende horizonte de tipo A, B, C o D. Preferentemente se selecciona un suelo procedente del horizonte A (horizonte donde enraíza la materia orgánica o rizosfera). Además, en la presente invención el tipo de suelo se selecciona de la lista que comprende suelos clasificados climáticamente, genéticamente o analíticamente. Preferentemente el tipo de suelo se selecciona de entre cualquier tipo de suelo clasificado climáticamente, es decir, el suelo se selecciona de la lista que comprende, sin limitarse, acrisol, alisol, andosol, anthrosol, arenosol, calcisol, cambisol, chernozem, ferralsol, fluvisol, gleysol, greyzem, gypsisol, histosol, kastanozem, leptosol, lixisol, luvisol, nitisol, phaeozem, planosol, plintisol, podsoluvisol, podzol, regosol, slonchak, solonetz o vertisol.

Otra realización preferida es el uso de vermicompost de alperujo donde el PAH es naftaleno, o cualquiera de sus derivados, o cualquiera de sus sales. El naftaleno (C₁₀H₈), conocido como naftalina, alquitrán blanco o alcanfor blanco. Este producto se usa habitualmente en la fabricación, entre otros, de plástico de cloruro de polivinilo (PVC) o bolas o escamas para ahuyentar las polillas. Esta realización preferida se refiere a naftaleno. El derivado de naftaleno es, sin limitarse, metilnaftaleno, como por ejemplo, 1-metilnaftaleno ó 2-metilnaftaleno.

Una realización preferida más es el uso donde el vermicompost de alperujo se adiciona en un porcentaje de entre 10 y 30% del peso seco total del suelo contaminado. Es decir, en un supuesto práctico, cada 10 Kg de peso seco contaminado se mezclan con una cantidad de entre 1 a 3 Kg de vermicompost de alperujo.

Según otra realización más preferida, el vermicompost de alperujo se adiciona en un porcentaje de entre 15 y 25%.

En otra realización preferida la concentración de naftaleno del suelo contaminado es menor o igual a 200 microgramos de naftaleno por gramo de suelo. En una realización más preferida la concentración de naftaleno del suelo contaminado es menor o igual a 100 microgramos de naftaleno por gramo de suelo.

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

Descripción de las figuras

Fig. 1. Muestra los perfiles de RNA-DGGE del vermicompost (VC), vermicompost contaminado (VC10 y VC100) y suelo enmendado con vermicompost (S) a 0, 7 y 30 días de incubación.

1=VC T₀; 2=VC10 T₀; 3=VC100 T₀; 4=S T₀; 5=VC T₇; 6=VC10 T₇; 7=VC100 T₇; 8=S T₇; 9=VC T₃₀; 10=VC10 T₃₀; 11=VC100 T₃₀; 12=S T₃₀

VC10 está contaminado con 10 $\mu\text{g/g}$ de naftaleno y VC100 está contaminado con 100 $\mu\text{g/g}$ de naftaleno.

Fig. 2. Muestra el índice de diversidad de Shannon (eje Y) para los perfiles RNA-DGGE del vermicompost (VC), vermicompost contaminado (VC10 y VC100) y en suelo enmendado con vermicompost (S) a 0, 7 y 30 días de incubación (eje X).

Fig. 3. Muestra el análisis clúster basado en el índice de similaridad de Raup y Crick (S) para los perfiles RNA-DGGE del vermicompost (VC), vermicompost contaminado (VC10 y VC100) y en suelo enmendado con vermicompost (S) a 0, 7 y 30 días de incubación.

ES 2 340 905 B1

Ejemplos

5 A continuación se ilustrará la invención mediante un ejemplo realizado por los inventores que describe el uso de vermicompost de alperujo para la descontaminación de suelos contaminados con NAH y el análisis de la expresión de la enzima naftaleno dioxigenasa.

Etapa 1

Proceso de Vermicompostaje

10

El proceso vermicompostaje, así como las características del alperujo y del vermicompost de alperujo se describen en Benítez *et al.*, (2004). *Soil Biol. Biochem.* 36. 1615-1623.

15

	Alperujo	Vermicompost
Carbono orgánico total (g kg ⁻¹)	521	392
Nitrógeno total (g kg ⁻¹)	8.1	15
C/N	64	27
20 Ácidos húmicos (g kg ⁻¹)	6.0	9.9
pH	5.1	8.6
Actividad deshidrogenasa (μg INTF g ⁻¹ h ⁻¹)	11	262
Actividad β-glucosidasa (μg PNP g ⁻¹ h ⁻¹)	2127	10964
25 Actividad fosfatasa (μg PNP g ⁻¹ h ⁻¹)	34525	9838
Actividad ureasa (μg NH ₃ g ⁻¹ h ⁻¹)	21	375
Polifenoles extractables (g kg ⁻¹)	20	3.0

30

Etapa 2

Diseño experimental

35

El suelo, históricamente contaminado, fue tomado del área industrial de Bagnoli (Nápoles, Italia). Las actividades industriales desarrolladas durante más de 50 años generaron un problema serio de contaminación en este sitio. En 1994, las actividades fueron paralizadas y un plan de recuperación de suelo comenzó a gestarse.

Fueron preparados dos sistemas de muestras:

40

a) Suelo contaminado por PAH enmendado con el 20% (peso seco) de vermicompost de alperujo (S). Muestras de suelo sin enmendar fueron utilizadas como control.

45

b) Vermicompost contaminado artificialmente con dos niveles diferentes de naftaleno, 10 μg g⁻¹ (VC10) y 1000 μg g⁻¹ (VC100). El vermicompost sin contaminar fue utilizado como control (VC).

50

Tres réplicas de cada sistema de muestras fueron transferidas a potes de cristal y el contenido en agua fue llevado hasta el 80% de la capacidad de retención de agua del suelo. Las muestras fueron incubadas durante un mes a 25°C. Durante el tiempo de incubación, submuestras fueron tomadas a tiempo 0, siete días y un mes, y congeladas inmediatamente durante 2 minutos en Nitrógeno líquido y después almacenadas a -80°C hasta su análisis. Para la determinación de las pérdidas de naftaleno debido a la evaporación, 10 g de vermicompost y 50 g de suelo enmendado fueron esterilizados por tinalización (100°C, 1 h, 3 días). Luego, las muestras fueron irrigadas con agua desionizada para alcanzar la capacidad de campo del 80%, y además, las del vermicompost fueron contaminadas con 0.0122 g de naftaleno. Las muestras fueron incubadas durante un mes en tarros de vidrio esterilizados, los cuales fueron abiertos dos veces por semana bajo condiciones estériles.

55

Etapa 3

Determinación de naftaleno

60

El naftaleno fue extraído del suelo y del vermicompost por el método de extracción asistida por microondas con un sistema MarsX (CEM, Matthews, NC, los E.E.U.U.), funcionando a 200 psi y 130°C durante 7 minutos, usando una mezcla de hexano:acetona (1:1). Luego, los frascos cerrados fueron guardados en hielo durante 30 minutos y después abiertos. Los extractos fueron filtrados con *Whatman 0.45 μm PTFE Membrane Polypropylene Housing*. Posteriormente se le agregó sulfato de sodio anhidro y fueron agitados durante 60 segundos.

65

Dichos extractos fueron analizados usando un cromatógrafo de gases *Trace GC Ultra (Thermo-Finnigan)*, con un inyector automático CTC y conectado a espectrómetro de masas *Trace DSQ (Thermo-Finnigan)*. Columna capilar:

ES 2 340 905 B1

Columna capilar DB-5 (*J&W Scientific*) (30 m, 0,25 milímetros i.d., 0,25 milímetros de espesor); temperatura inicial 45°C; isoterma durante 2 minutos; temperatura 20°C/min; temperatura final 270°C; isoterma durante 3 minutos; inyector (modo *splitless*) 260°C. La temperatura de la línea de transferencia y de la fuente iónica fueron 280 y 250°C, respectivamente. El nitrógeno fue utilizado como gas portador, con un flujo 1 ml/min. Fue inyectado al cromatógrafo un 1 µL de volumen de cada muestra.

Etapa 4

10 *Extracción de ARN*

El ARN total fue extraído, de submuestras de 300 mg del suelo o 250 mg de vermicompost, con el kit total del aislamiento del ARN de *PowerSoil de MoBio (MoBio Laboratories Inc., Solana Beach, CA, USA)* siguiendo las instrucciones del fabricante con dos modificaciones importantes. La primera consistió en agregar 1 ml de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1) después del paso 8 indicado por el fabricante, agitar durante 2 minutos y centrifugar a 2500 g durante 4 minutos. La fase superior fue transferida a un tubo limpio y se continuó con el paso 9 de las instrucciones. La segunda modificación se realizó después del paso 15. El *pellet* fue resuspendido en 5 ml de agua estéril, 500 µl d NaCl 5M, y 5.5 ml de isopropanol 100%, incubado a -20°C durante 15 minutos y después centrifugado a 2500 g durante 15 minutos. Esto redujo el tamaño del *pellet* y la cantidad de remanente que se utiliza en la columna. El ADN residual fue eliminado agregando ADNasa I usando la *RNase-Free DNase Set (Roche Applied Science, Penzberg, Germany)*, según las instrucciones del fabricante. El ARN fue disuelto en 20 µl de agua libre de ARNasa. Las muestras de ARN libre de ADNasa fueron cuantificadas en concentración y calidad usando el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (*NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware; USA*).

El ADN complementario (ADNcp) fue sintetizado a partir de 0.5 µg del ARN libre de ADNasa. La síntesis fue realizada a 50°C durante 30 minutos usando el kit *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Penzberg, Germany)* siguiendo las instrucciones del fabricante, después de lo cual las soluciones de ADNcp fueron almacenadas a -20°C.

30

Etapa 5

Expresión de naftaleno dioxigenasa (NDO). PCR cuantitativa en tiempo real

Para analizar la expresión de los genes que codifican la NDO, el ADNcp de las diversas muestras fue amplificado usando los cebadores específicos nahAc-7F y nahAc-7R que se describen en Park y Crowley (2006). *Applied Microbiology and Biotechnology* 72: 1322-1329. Las reacciones de PCR a tiempo real fueron realizadas con un *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (PE Applied Biosystems)*. La amplificación fue realizada en un volumen total de 21 µl que contenía 10.5 µl 2x SYBR green PCR master mix (*PE Applied Biosystems*), 500 nM de cada cebador y 1 µl de ADNcp. Para cada ADNcp, los experimentos de PCR a tiempo real fueron realizados tres veces determinando el ciclo del umbral (CT) en triplicado. Las condiciones del ciclo de temperaturas fueron las siguientes: 2 minutos a 50°C para la prevención del remanente, 10 minutos a 95°C para la activación de la enzima, seguido de 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 45 segundos a 72°C, cuando la señal de la fluorescencia fue medida. Una curva de melt fue medida al final de los 35 ciclos para comprobar la presencia de un único producto de la reacción de la polimerización en cadena.

Se llevaron a cabo reacciones de control sin ADNcp para asegurar la ausencia de dímeros de cebador no específicos. Para la normalización del ADNcp se eligió el gen de Eubacteria 16S rRNA, cebadores 27f y 519r que se describen en Hutter *et al.* (2003). *Microbiology*, 149, 67-75. Los cambios relativos en la expresión del gen de NDO fueron calculados usando un método descrito (Livak y Schmittgen (2001). *Methods* 25: 402-408).

Etapa 6

55 *Análisis de PCR-DGGE*

La PCR fue realizada en muestras del ADNcp con las cebadores universales de DGGE (TIB®MOLBIOL, Berlín, Alemania) P1, P2, y P3 para amplificar la región hipervariable V3 de genes del rDNA 16S (Muyzer *et al.* (1993). *Appl. Environ. Microbiol* 59, 695-700). Dos amplificaciones sucesivas fueron realizadas de acuerdo con Muyzer *et al.*, (1993) con las modificaciones descritas (Moreno *et al.* (2008). *Environ. Sci. Poll. Res. Int.* DOI 10.1007/s11356-008-0035-y). Los análisis de DGGE fueron conducidos usando 20 µl de producto de PCR cargado en un gel de la urea-formamida-poliacrilamida de 30 a del 70%. Un *INGENYphorU System (Ingeny International BV, The Netherlands)* fue usado a 75 V durante 17 horas a 58°C para separar los fragmentos. Los gels fueron teñidos con *Bio-Rad Silver Stain* según el protocolo de coloración estándar de ADN, fotografiados bajo luz UV a λ=254 nm y evaluados mediante un sistema de documentación de gels de UVitec (*UVitec Limited, Cambridge, UK*).

ES 2 340 905 B1

Etapa 7

Análisis de datos

5 Los datos de naftaleno y de la polimerización en cadena en tiempo real representan el promedio de tres extracciones de suelo diferentes. Los datos fueron tratados por análisis de la varianza usando el programa STATISTICA StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) y la prueba múltiple de Duncan fue utilizada para separar las medias con un nivel de significación total de 0.05. Los bandos de DGGE en diversos carriles fueron comparados con el software de análisis de UVImap (UVitec Limited, Cambridge, UK). Los carriles fueron normalizados para contener la misma cantidad de
10 señal total después de la corrección de fondo y las imágenes del gel fueron enderezadas y alineadas para dar una curva densitométrica. Los datos de las bandas de DGGE fueron utilizados para estimar dos índices de diversidad tratando cada banda como unidad taxonómica operacional individual. Para estos análisis, se presumió que cada banda representaba la capacidad de una especie bacteriana de ser amplificada (Ibekwe y Grieve (2004) *FEMS Microbiol. Ecol.* 48: 239-248) y la intensidad de las bandas fue reflejada como alturas de pico en la curva densitométrica.

15 El índice de Shannon de diversidad general H' (Shannon y Weaver (1963). The mathematical theory of communication. *The University of Illinois Press*, Urbana, Illinois) fue calculado según la siguiente ecuación:

$$20 \quad H' = - \sum (P_i \log P_i)$$

donde $P_i = n_i/N$; n_i = altura de pico, N = sumatorias de todas las altura de picos de banda.

25 Para comprobar si las semejanzas observadas en muestras y entre muestras fueron diferentes a lo esperado, se aplicó el índice de similaridad de Raup y Crick SRC (Raup y Crick (1979) *J. Paleontol.* 53: 1213-1227). El SRC es la probabilidad de que una semejanza seleccionada al azar sea mayor o igual a la semejanza observada, y los valores de SRC mayores de 0.95 o menores de 0.05 significan semejanza o desemejanza, respectivamente, que no son distribuciones al azar de la misma especie. SRC y el análisis cluster fueron calculados mediante el programa PAST (*Palaeontological statistics*, versión 1.82b).

30

Etapa 8

Resultados

35

La evaporación de naftaleno en el vermicompost artificialmente contaminado fue de alrededor del 60% en un mes, mientras que no se detectó ninguna evaporación de naftaleno en el suelo enmendado. En el vermicompost artificialmente contaminado, los niveles de recuperación fueron del 75% y no se detectó naftaleno después de un mes de incubación (Tabla 1). En los suelos enmendados, cerca del 12% del naftaleno desaparecieron después de 30 días de
40 incubación.

TABLA 1

45 *Niveles de naftaleno en el vermicompost contaminado con 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ (VC10) y 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ (VC100), y en el suelo enmendado con vermicompost (S). Valores corresponden a la media de tres repeticiones \pm error estándar. Las letras indican diferencia significativa (S) o no significativa entre los valores iniciales y finales (NS) ($p < 0.05$)*

50

	0 días	30 días	p<0.05
VC10	6,73±0,12	0,22±0,03	S
VC100	78,0±4,04	0,39±0,01	S
S	7,24±0,08	6,12±0,08	S

55

No se detectó expresión de la enzima naftaleno dioxigenasa (NDO) en ninguno de los tratamientos a tiempo cero y 7 días de incubación (Tabla 2). Sin embargo, la NDO se expresó después de un mes de incubación en todos los tratamientos. En el vermicompost contaminado, la expresión era mayor en los niveles inferiores de la contaminación (10 $\mu\text{g g}^{-1}$), disminuyendo cuando el vermicompost fue contaminado con los niveles de 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ de naftaleno. De forma similar, en el suelo enmendado el vermicompost realizó la expresión de la enzima NDO después de solamente un mes de incubación.

65

ES 2 340 905 B1

TABLA 2

Expresión del gen NDO normalizada por el estándar interno (16S rRNA) en vermicompost (VC), vermicompost contaminado (VC10 y VC100) y en suelo enmendado con vermicompost (S) a 0, 7 y 30 días de incubación. NDO normalizada relativa al tiempo 0. Los valores corresponden a la media de tres repeticiones \pm error estándar

Tratamiento	NDO C_T	16S rRNA C_T	ΔC_T (NDO C_T - 16S rRNA C_T)	$\Delta \Delta C_T$ ($\Delta C_{T,TimeX} - \Delta C_{T,Time0}$)	NDO normalizada relativa al tiempo 0 ($2^{-\frac{\Delta \Delta C_T}{\Delta \Delta C_T}}$)
VC T ₀	32,55	22,53	10,02 \pm 0,04	0,00 \pm 0,04	1,00 \pm 0,03
VC T ₇	32,60	22,62	9,98 \pm 0,04	-0,04 \pm 0,04	1,03 \pm 0,03
VC T ₃₀	32,52	22,57	9,95 \pm 0,02	-0,07 \pm 0,02	1,05 \pm 0,02
VC10 T ₀	33,30	7,67	25,62 \pm 0,03	0,00 \pm 0,03	1,00 \pm 0,02
VC10 T ₇	33,37	7,88	25,49 \pm 0,04	-0,13 \pm 0,04	1,10 \pm 0,03
VC10 T ₃₀	24,12	8,70	15,42 \pm 0,05	-10,21 \pm 0,05	1182 \pm 37,1
VC100 T ₀	34,26	8,63	25,62 \pm 0,01	0,00 \pm 0,01	1,00 \pm 0,01
VC100 T ₇	34,33	8,79	25,54 \pm 0,02	-0,08 \pm 0,02	1,06 \pm 0,02
VC100 T ₃₀	25,53	8,53	17,00 \pm 0,05	-8,62 \pm 0,05	394 \pm 14,0
S T ₀	32,42	6,96	25,46 \pm 0,03	0,00 \pm 0,03	1,00 \pm 0,02
S T ₇	32,40	7,02	25,38 \pm 0,04	-0,08 \pm 0,04	1,06 \pm 0,03
S T ₃₀	25,14	7,54	17,60 \pm 0,05	-7,86 \pm 0,05	232 \pm 8,18

La comparación de las comunidades bacterianas metabólicamente activas en los vermicomposts contaminados y en los suelos enmendados mostró perfiles marcadamente diversos a través del gel de RNA-DGGE dependiendo del tiempo de incubación (Fig. 1).

La diversidad estructural de la comunidad bacteriana fue examinada por el índice de diversidad de Shannon (H') (Fig. 2). En todos los casos, H' aumentó levemente después de 7 días de incubación y disminuyó luego a los 30 días.

Los valores de SRC encontrados comparando los vermicomposts contaminados con naftaleno se resumen en la Tabla 3. No se detectó semejanza significativa entre los diferentes vermicompost (SRC<0,05), mientras que muestras incubadas durante el mismo tiempo fueron significativamente iguales (SRC>0,95). Para el resto de los perfiles comparados de DGGE, la semejanza no fue mayor que la esperada por casualidad (0,95> SRC>0,05). La Fig. 3 muestra el dendrograma generado por los análisis cluster Raup y Crick. Una vez más fueron evidenciados tres grupos claros de muestras, las cuales compartieron tiempo de incubación.

TABLA 3

Similaridad (SRC) para los perfiles RNA-DGGE del vermicompost (VC) y vermicompost contaminado (VC10 y VC100) a 0, 7 y 30 días de incubación

	VC T ₀	VC10 T ₀	VC100 T ₀	VC T ₇	VC10 T ₇	VC100 T ₇	VC T ₃₀	VC10 T ₃₀
VC10 T ₀	1							
VC100 T ₀	0.990	1						
VC T ₇	0.540	0.707	0.175	1				
VC10 T ₇	0.825	0.397	0.082		1			
VC100 T ₇	0.907	0.660	0.245	0.977	0.997	1		
VC T ₃₀	0.177	0.652	0.380	0.412	0.092	0.292	1	
VC10 T ₃₀	0.310	0.362	0.627	0.112	0.037	0.052	0.995	1
VC100 T ₃₀	0.322	0.075	0.507	0.475	0.037	0.197	0.985	1

ES 2 340 905 B1

Por el contrario, una desemejanza significativa ($SRC < 0.05$) se observó entre el suelo enmendado pasados 30 días de incubación y los otros dos tratamientos que incluyeron suelo contaminado. El dendrograma generado por el análisis cluster Raup y Crick muestra como dichos suelos fueron agrupados (Fig. 3).

5

TABLA 4

Similaridad (SRC) para los perfiles RNA-DGGE del suelo enmendado con vermicompost a 0, 7 y 30 días de incubación

10

	S T0	S T7	S T30
S T0	1		
S T7	0.227	1	
S T30	0.030	0	1

15

20

El efecto de la adición de vermicompost a los suelos contaminados con PAH fue inducir los mecanismos genéticos de degradación en la comunidad bacteriana autóctona e incorporar nuevas especies bacterianas capaces de degradar el naftaleno. De hecho, el vermicompost cambió la estructura de la comunidad bacteriana metabólicamente activa en el suelo contaminado, y una selección de especies bacteriana fue evidenciada en los geles de DGGE después de un mes de incubación. La especialización de la comunidad bacteriana pareció ocurrir durante el período de incubación de 30 días. La diversidad bacteriana aumentó durante los primeros 7 días y disminuyó luego en el vermicompost no contaminado. El efecto de la incubación fue, por tanto, estimular la comunidad bacteriana metabólicamente activa hasta que los nutrientes disponibles fueron consumidos. La tendencia fue similar cuando el vermicompost fue contaminado artificialmente o utilizado como enmienda del suelo contaminado, revelando que el efecto del vermicompost predominó sobre el grado de contaminación del naftaleno. De hecho, el vermicompost fue el factor principal en la agrupación filogenética de los suelos enmendados, y éstos fueron agrupados con el vermicompost según el tiempo de incubación (Fig. 3).

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 340 905 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de vermicompost de alperujo para aumentar la expresión de la enzima bacteriana naftaleno dioxigenasa (NDO).
2. Uso de vermicompost de alperujo según la reivindicación 1 para la descontaminación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH).
- 10 3. Uso de vermicompost de alperujo según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde el PAH es naftaleno, o cualquiera de sus derivados, o cualquiera de sus sales.
4. Uso de vermicompost de alperujo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el vermicompost de alperujo se adiciona en un porcentaje de entre 10 y 30% del peso seco total del suelo contaminado.
- 15 5. Uso según la reivindicación 4 donde el vermicompost de alperujo se adiciona en un porcentaje de entre 15 y 25%.
- 20 6. Uso de vermicompost de alperujo según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 donde la concentración de naftaleno del suelo contaminado es menor o igual a 200 microgramos de naftaleno por gramo de suelo.
7. Uso de vermicompost de alperujo según la reivindicación 6 donde la concentración de naftaleno del suelo contaminado es menor o igual a 100 microgramos de naftaleno por gramo de suelo.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

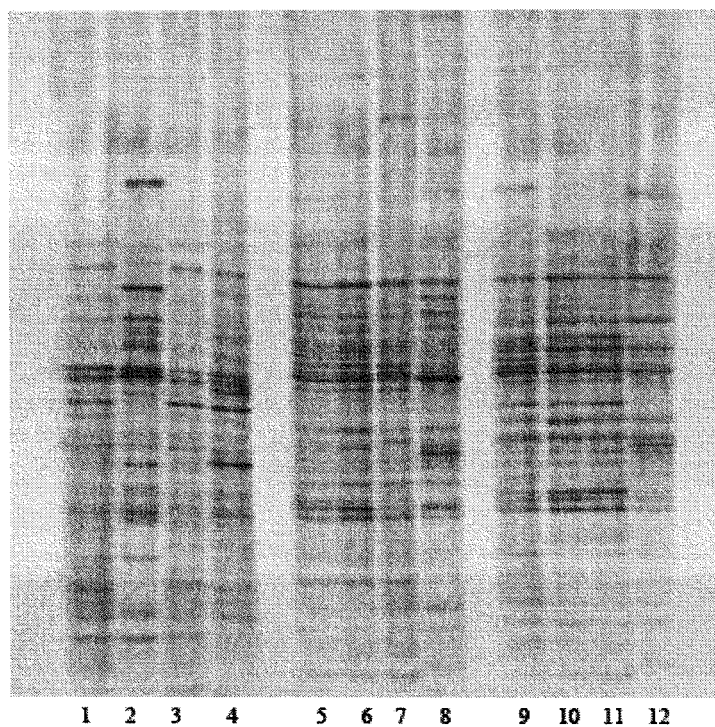


FIG. 1

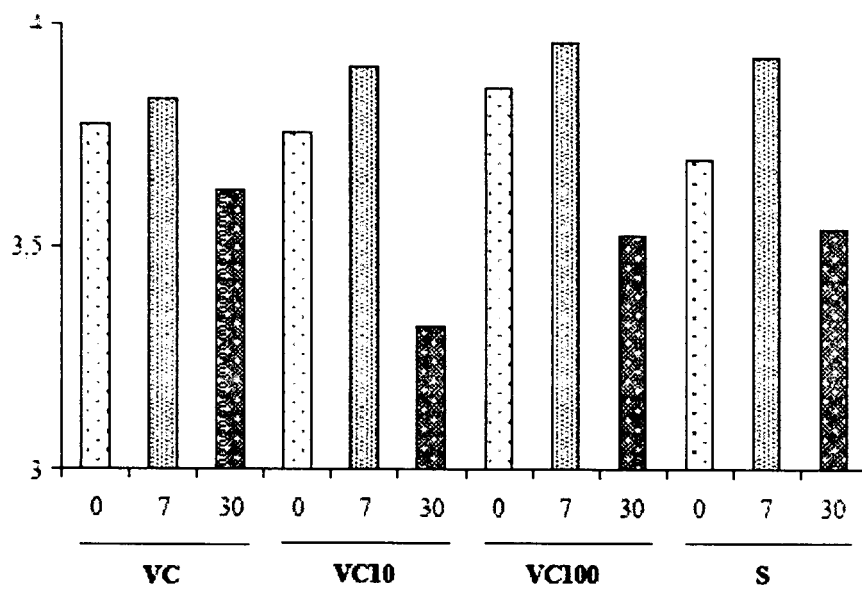


FIG. 2

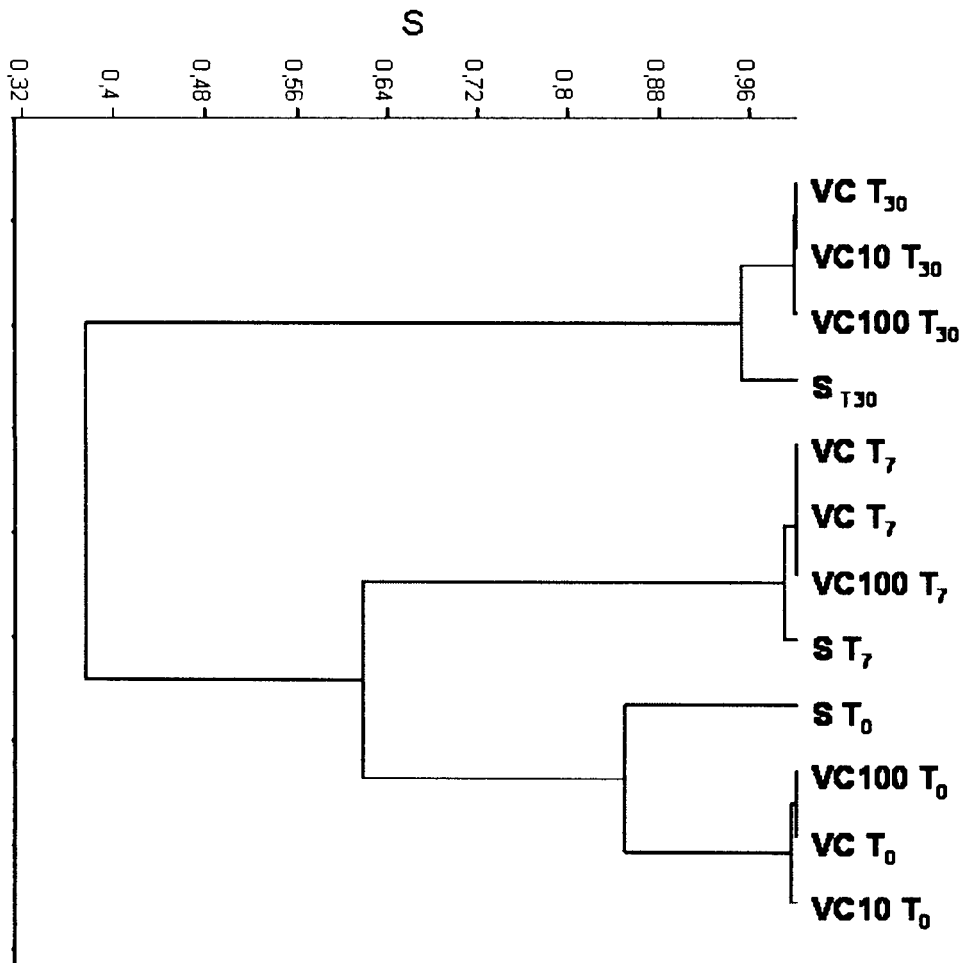


FIG. 3



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 340 905

② N° de solicitud: 200803484

③ Fecha de presentación de la solicitud: 09.12.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	HICKMAN, Z.A., et al. (a) The co-application of earthworms (<i>Dendrobaena veneta</i>) and compost to increase hydrocarbon losses from diesel contaminated soils. <i>Environment international</i> . Oct-2008. Vol. 34, n° 7, páginas 1016-1022. ISSN 0160-4120. Ver todo el documento.	1-7
Y	DELGADO-MORENO, L., et al. Organic amendments from olive cake as a strategy to modify the degradation of sulfonylurea herbicides in soil. <i>Journal of agricultural and food chemistry</i> . 25.07.2007. Vol. 55, n° 15, páginas 6213-6218. ISSN 0021-8561. Ver todo el documento, especialmente resumen, materiales y métodos (primer párrafo), último apartado de resultados y discusión, y conclusiones.	1-7
Y	CONTRERAS-RAMOS, S.M., et al. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil amended with biosolid or vermicompost in the presence of earthworms (<i>Eisenia fetida</i>). <i>Soil Biology & Biochemistry</i> . Jul-2008. Vol. 40, n° 7, páginas 1954-1959. ISSN 0038-0717. Ver todo el documento.	1-7
Y	BENÍTEZ, E., et al. Estimating soil resilience to a toxic organic waste by measuring enzyme activities. <i>Soil Biology & Biochemistry</i> . Oct-2004. Vol. 36, n° 40, páginas 1615-1623. ISSN 0038-0717. Ver todo el documento, especialmente resumen, apartados 2.2, 3 y 4.	1-7
Y	ÁLVAREZ-BERNAL, D., et al. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil added with manure or vermicompost. <i>Chemosphere</i> . Nov-2006. Vol. 65, n° 9, páginas 1642-1651. ISSN 0045-6535. Ver todo el documento.	1-7

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

20.05.2010

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

1/6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 340 905

② Nº de solicitud: 200803484

③ Fecha de presentación de la solicitud: 09.12.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	MORENO, B., et al. Restoring biochemical activity and bacterial diversity in a trichloroethylene-contaminated soil: the reclamation effect of vermicomposted olive wastes. Environmental science and pollution research international. 27-08-2008 (on line). Vol. 16, nº 3, páginas 253-264. ISSN 1614-7499 (Electrónico). Ver todo el documento.	1-7
A	ANASTASI, A., et al. Bioremediation potential of basidiomycetes isolated from compost. Bioresource Technology. Sept-2008. Vol. 99, nº 14, páginas 6626-6630. ISSN 0960-8524. Ver todo el documento.	
A	HICKMAN, Z.A., et al. (b) Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants. Environment international. Oct-2008. Vol. 34, nº 7, páginas 1072-1081. ISSN 0160-4120. Ver todo el documento.	

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

20.05.2010

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

2/6

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C09K 17/16 (2006.01)

C05F 5/00 (2006.01)

C05F 11/08 (2006.01)

C05G 3/04 (2006.01)

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

C09K, C05F, C05G

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, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.05.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-7	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 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	HICKMAN, Z.A., et al. (a)	Oct-08
D02	DELGADO-MORENO, L., et al.	25-07-07
D03	CONTRERAS-RAMOS, S.M., et al.	Jul-08
D04	BENÍTEZ, E., et al.	Oct-04
D05	ÁLVAREZ-BERNAL, D., et al.	Nov-06
D06	MORENO, B., et al.	27-08-08
D07	ANASTASI, A., et al.	Sept-08
D08	HICKMAN, Z.A., et al. (b)	Oct-08

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 presente solicitud de patente describe y reivindica el uso de vermicompost de alperujo para aumentar la expresión de la enzima naftaleno dioxigenasa (NDO) y, de este modo, descontaminar suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH), y, más concretamente, con naftaleno.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue el empleo del vermicompost de alperujo para aumentar la expresión de la enzima NDO, por lo que las reivindicaciones de la presente solicitud son nuevas según el artículo 6 de la Ley de Patentes.

No se considera, sin embargo, que la solicitud cumpla el requisito de actividad inventiva del artículo 8 de la Ley de Patentes, dado que hay varios documentos del estado de la técnica que describen la utilidad del vermicompost de alperujo para descontaminar suelos, y la capacidad que tienen distintos tipos de vermicompost para degradar PAHs, incluyendo el naftaleno. Aunque en ningún caso se menciona su efecto sobre la expresión de la enzima NDO, resulta evidente, y, de hecho, así se explica en la descripción de la presente solicitud, que la degradación de los PAHs se produzca mediante la activación de la enzima naftaleno dioxigenasa. Por tanto, no supondría un esfuerzo inventivo para el experto en la materia estudiar el efecto del vermicompost sobre la mencionada enzima, y emplearlo con la finalidad descontaminante que se reivindica en la solicitud.

Respecto a las concentraciones concretas de vermicompost que se reivindican, aunque no coinciden exactamente con las publicadas en los documentos del estado de la técnica, tampoco se estima que confieran actividad inventiva a las reivindicaciones 4 y 5, pues en los documentos consultados hay una gran variación de concentraciones, todas ellas efectivas en la descontaminación, y no parece que ese parámetro sea crítico para la acción descontaminante.

Por último, en cuanto a las concentraciones de naftaleno reivindicadas, no en todos los documentos citados coinciden con las de las reivindicaciones 6 y 7, sino que, en general, son más elevadas las divulgadas anteriormente que las reivindicadas en la solicitud. Resulta evidente que si un vermicompost puede degradar una determinada concentración de naftaleno, podrá hacerlo igualmente si la concentración del contaminante es menor, por lo que las reivindicaciones 6 y 7 tampoco cumplen el requisito de actividad inventiva.

A continuación se resumen los documentos seleccionados del estado de la técnica que afectan la actividad inventiva de la solicitud, y se explican las razones de tal conclusión.

En el documento D01 se describe el uso de vermicompost para el tratamiento de suelos contaminados con gasoil. El vermicompost, en este caso, está formado a partir de materia vegetal a la que se añaden lombrices, y se estudia su efecto en las concentraciones de PAHs, concretamente de naftaleno, fenantreno, pireno y benzopireno (ver, por ejemplo, la figura 4). Se observa la utilidad del vermicompost para degradar estos hidrocarburos, con un efecto especialmente evidente sobre el naftaleno. Por tanto, la diferencia entre D01 y la presente solicitud sería que se emplean diferentes tipos de vermicompost.

El documento D02 pone de manifiesto la capacidad del vermicompost de alperujo para degradar PAHs, aunque en este caso, sean compuestos diferentes a los reivindicados en la solicitud, puesto que se trata de herbicidas derivados de sulfonilurea.

Hoja adicional

A la luz de lo divulgado en D01 y D02, resultaría evidente para el experto en la materia combinar la información contenida en estos dos documentos, y utilizar de este modo el vermicompost de alperujo para degradar PAHs del grupo del naftaleno y sus derivados, con lo que la solicitud no tendría actividad inventiva.

En el documento D03 se emplea también un vermicompost para degradar fenantreno, antraceno y benzopireno. Aunque este documento no menciona la capacidad de degradación de naftaleno, es obvio que se puede ampliar a este compuesto, pues es del mismo grupo que los anteriores, pero de estructura más sencilla. La evidente combinación de este documento con el documento D04 (en el que se emplea vermicompost de alperujo para degradar polifenoles) llevaría al experto en la materia a dar al vermicompost el mismo uso que el que se reivindica en la presente solicitud, y, por consiguiente, ésta no cumpliría el requisito de actividad inventiva.

Del mismo modo, resulta evidente la combinación de los documentos D05 y D06, pues en el primer documento se describe el uso de vermicompost para bioremediar suelos contaminados con PAHs (fenantreno y antraceno, en este caso), y el segundo documento describe que el vermicompost de alperujo es capaz de restaurar suelos contaminados con tricloroetileno. Por tanto, la información divulgada en D05 y D06 afectaría la actividad inventiva de la solicitud.

Por último, se citan dos documentos que, si bien no afectan la novedad ni la actividad inventiva de la presente solicitud, contienen información general del estado de la técnica que está relacionada con ella. Así, el documento D07 trata sobre el potencial de hongos basidiomicetos aislados de compost para degradar hidrocarburos policíclicos aromáticos, centrándose específicamente en la degradación de naftaleno. El documento D08 es una revisión de la utilidad de las lombrices (y, por tanto, del vermicompost) en la bioremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos, y dedica el apartado 3.3 a los PAHs.