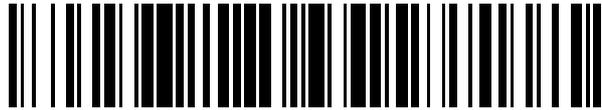


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 356 950**

21 Número de solicitud: 200901935

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/26 (2006.01)

C02F 3/32 (2006.01)

C12M 1/40 (2006.01)

C12R 1/89 (2006.01)

C02F 101/32 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **01.10.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2011**

Fecha de la concesión: **15.02.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **27.02.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
27.02.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
AVDA. SÉNECA 2
28040 MADRID, ES**

72 Inventor/es:
**COSTAS COSTAS, EDUARDO;
LOPEZ RODAS, VICTORIA;
CARRERA MARTINEZ, DANIEL;
MATEOS SANZ, M. ARANZAZU y
SALGADO VELA, EVA MARIA**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS PROCEDENTES DE PETRÓLEO MEDIANTE
SCENEDESMUS OBTUSUS.**

57 Resumen:

Degradación de hidrocarburos procedentes de petróleo mediante Scenedesmus obtusus. La presente invención se refiere a una cepa de microalga de la especie Scenedesmus obtusus, que degrada hidrocarburos como los procedentes del crudo de petróleo y sus derivados. Un clon de dicha cepa se ha depositado en el Banco Nacional de Algas con número de acceso BNA D33_09, y se ha denominado So3P. También es objeto de la presente invención, un dispositivo para la degradación de hidrocarburos petrolíferos que comprende al menos una cepa de S. obtusus que degrada hidrocarburos petrolíferos, confinada en un espacio o soporte físico. Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para la biorremediación de medios contaminados por petróleo y sus derivados, basado en el empleo de una cepa S. obtusus que degrada hidrocarburos petrolíferos.

ES 2 356 950 B1

DESCRIPCIÓN

Degradación de hidrocarburos procedentes de petróleo mediante *Scenedesmus obtusius*.

5 Sector de la invención

La invención se encuadra en el sector de las tecnologías ambientales para el control, tratamiento y prevención de la contaminación, y más concretamente en el sector de la biorremediación y la degradación biológica de hidrocarburos y derivados del crudo de petróleo.

10

Antecedentes de la invención

Uno de los problemas medioambientales más preocupantes en la actualidad es la contaminación del agua marina y continental causada por el vertido incontrolado o accidental de crudo de petróleo, y derivados o refinados del petróleo como la gasolina, keroseno, gasoil, fuel, etc. De forma genérica, el crudo de petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos saturados, hidrocarburos aromáticos, asfaltos, resinas, y otros constituyentes, entre los que se incluyen diversos compuestos químicos nocivos para el medioambiente y los organismos vivos debido a su toxicidad y difícil degradación.

15

Por ejemplo, los hidrocarburos aromáticos del tipo benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX), son componentes del petróleo especialmente preocupantes desde el punto de vista ambiental y toxicológico debido a su empleo masivo como disolventes en la industria química mundial, y a su elevada toxicidad; considerándose peligrosos agentes mutagénicos y cancerígenos. De hecho, los BTEX se encuentran en la lista de los 50 compuestos químicos de mayor producción en EEUU y en todas las listas de contaminantes prioritarios de las principales agencias e instituciones ambientales mundiales (USEPA, 2007. Ecotox Release 4.0. <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>; EU, 2006. REACH: Regulation (EC) No 1907/2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals).

25

En los últimos años se han desarrollado tecnologías que emplean microorganismos para la eliminación de contaminantes en el medio ambiente. Estas tecnologías, englobadas en el campo de la biorremediación, buscan preferentemente la degradación completa de los contaminantes, bien mediante la estimulación de las cepas de microorganismos presentes en medio receptor del vertido, o bien mediante el inoculo de cepas de microorganismos con capacidad para biodegradar los contaminantes. Los microorganismos, ya sean aislados directamente de la naturaleza, u obtenidos mediante biotecnología, juegan un papel central en la biorremediación de los contaminantes, y por ello existe un gran interés en disponer de nuevos microorganismos con capacidad para eliminar y degradar los contaminantes del petróleo y sus derivados.

30

La biodegradación de contaminantes mediante microorganismos se aplica tanto en procesos *in situ*, donde se produce el vertido incontrolado, como en procesos industriales, donde se realiza un tratamiento confinado de los medios contaminados, como pueden ser, por ejemplo, las depuradoras de aguas y los efluentes industriales residuales. De hecho, el tratamiento de mezclas complejas de hidrocarburos mediante microorganismos contenidos en reactores biológicos, o inmovilizados en soportes para biofiltros, es una alternativa que ha adquirido un enorme interés para el sector del tratamiento de los contaminantes. En el caso de la industria química, resultan de especial interés los biofiltros para compuestos orgánicos volátiles como los BTEX.

40

La selección y desarrollo de microorganismos capaces de tolerar y degradar petróleo está teniendo un creciente interés científico. Una gran mayoría de estudios científicos se han concentrado en bacterias y hongos (Van Hamme *et al.*, 2003. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67: 503-549). Algunos de estos microorganismos se encuentran disponibles comercialmente para su empleo en biorremediación (Korda *et al.*, 1997. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48: 677-686). Sin embargo, microorganismos fotosintéticos como las microalgas apenas han sido probados para la degradación de hidrocarburos procedentes del petróleo. Estos organismos presentan la ventaja de su ubicuidad tanto en aguas dulces como marinas, y juegan un papel central como productores primarios iniciando las cadenas tróficas en el agua.

45

Uno de los primeros trabajos que describen la capacidad de degradar petróleo por microalgas fue publicado por Walker *et al.*, en 1974 (Nature 254: 423-424). En este estudio se aisló una cepa de la microalga *Prototheca zopfii*, capaz de degradar un 41,4% de los hidrocarburos totales de una mezcla de crudo de petróleo al 1% v/v, y hasta un 10,7% de los hidrocarburos en muestras refinadas de petróleo al 1% v/v. Posteriormente otros estudios han mostrado que las algas son capaces de degradar hidrocarburos y derivados del petróleo (Atlas *et al.*, 1981. Microbiological Reviews 45: 180-209; Semple *et al.*, 1999. FEMS Microbiol. Lett. 170: 291-300). Entre las especies estudiadas se encuentran representantes de los géneros *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Ulva*, *Cylindrotheca*, *Amphora*, *Porphyridium*, *Petalonia*, *Scenedesmus*, *Selenastrum*, etc. (Cerniglia *et al.*, 1980. J Gen Microbiol 116: 495-500; Semple *et al.*, 1999. FEMS Microbiol. Lett. 170: 291-300; Lei *et al.*, 2006. Biores. Technol. 98: 273-280).

55

Los últimos estudios indican que algunas especies de *Scenedesmus* son eficaces para la eliminación de hidrocarburos procedentes del petróleo. En este sentido Lei y colaboradores observaron niveles de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) típicos del petróleo inferiores al 12% y 3% del total inicial en el medio tras 7 días de exposición de *S platydiscus* y *S quadricauda* (Lei *et al.*, 2006. Biores. Technol. 98: 273-280). Por su parte, Gamila e Ibrahim encontraron niveles de desaparición de PAHs y alcanos superiores al 85% del total inicial tras 6 semanas de exposición de *S. obliquus* con petróleo al 0.1% (v:v) en agua (Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2004. 73: 883-889).

60

Sin embargo el grado de eliminación de los hidrocarburos procedentes del petróleo depende de la especie de microalga seleccionada. Por ejemplo, Warshawsky y colaboradores demostraron que la eliminación de benzopireno y dihidrodiol es casi completa en *S. acutus*, mientras que otros géneros como *Chlamydomonas* no degradan benzopirenos (Chemo-Biological Interactions 1995. 97: 131-148). Este hecho pone de relieve el interés de disponer de cepas microalgales específicas que tengan una mayor capacidad para degradar los hidrocarburos procedentes del petróleo.

Sin embargo, la biodegradación de hidrocarburos, aún se encuentra con dificultades y limitaciones para su aplicación comercial, por la ausencia de cepas de microorganismos capaces de tolerar y degradar mezclas complejas de hidrocarburos que son las que se encuentran habitualmente en vertidos de petróleo o en vertidos industriales. Otra limitación para la biorremediación de crudo de petróleo y sus derivados, es la ausencia de microorganismos que degraden eficazmente contaminantes tóxicos del petróleo como pueden ser los hidrocarburos aromáticos. Igualmente importante es el hecho de que muchos de los microorganismos descritos hasta el momento están altamente especializados y son extremadamente difíciles de cultivar, o con unos requerimientos ambientales y nutricionales altamente exigentes, lo que complica sobremanera su empleo en condiciones habituales de vertido.

La presente invención proporciona una cepa microalgal, aislada en la naturaleza y biológicamente pura, capaz de eliminar mezclas complejas de hidrocarburos procedentes del petróleo y sus derivados. Dicha cepa degrada de manera eficaz, entre otros, hidrocarburos altamente tóxicos procedentes del petróleo como los hidrocarburos aromáticos tipo BTEX. También es objeto de la presente invención, proporcionar un procedimiento de biorremediación para la degradación del crudo de petróleo, de los hidrocarburos presentes en éste y sus derivados en el agua, basado en el empleo de dicha cepa microalgal. La presente invención, por tanto, contribuye a solucionar los problemas derivados de la contaminación por hidrocarburos causada por un vertido de petróleo o cualquier otro motivo, superando los inconvenientes descritos en el estado de la técnica.

Descripción de la invención

La presente invención contribuye a paliar los problemas medioambientales asociados con el vertido incontrolado o accidental de petróleo y el tratamiento de efluentes de plantas industriales que contienen hidrocarburos, principalmente en medios acuosos, mediante la utilización de una cepa microalgal que elimina hidrocarburos procedentes de petróleo, superando los inconvenientes de los procedimientos del estado de la técnica.

Esta invención se basa en el hallazgo inesperado de un peculiar afloramiento natural de crudo de petróleo, que permanece inalterado al menos desde el año 1915. Se da la circunstancia de que dicho afloramiento se ha mantenido hasta fechas recientes vertiendo continuamente crudo sobre un pequeño arroyo llamado Arroyo Minero. Los inventores observaron que dicho arroyo presentaba una singular capacidad de autodepuración, de forma que en cuestión de unos 250 metros, la totalidad del crudo vertido en el punto de entrada al arroyo había desaparecido. Los inventores piensan que la autodepuración natural que ocurre en el Arroyo Minero tiene un origen biológico, mediado por microorganismos, concretamente microalgas, que pudieran aplicarse en la biorremediación de contaminantes tales como los vertidos de petróleo en aguas y suelos o los vertidos industriales.

La presente invención se refiere a una nueva cepa de microalga, perteneciente al género *Scenedesmus*, y concretamente de la especie *Scenedesmus obtusus* (Fig. 1), denominada So3P, y caracterizada por una elevada capacidad de tolerancia y degradación de petróleo y los hidrocarburos presentes en el mismo y sus derivados (Fig. 2 y Fig. 3), Dicha cepa de microalga supone un importante avance respecto a los microorganismos degradadores de petróleo conocidos y, por tanto, una considerable mejora técnica para la biorremediación de crudo de petróleo e hidrocarburos principalmente en medios acuáticos. Las microalgas del género *Scenedesmus* son organismos fotoautótrofos facultativos, con características ventajosas típicas de este género como son: su ubicuidad, versatilidad metabólica, elevada capacidad adaptativa y, sobre todo, su facilidad de cultivo. Por otro lado, la cepa So3P de *S. obtusus* presenta algunas características adicionales muy interesantes en relación con su capacidad de biorremediación de hidrocarburos, como su capacidad para crecer, tolerar y degradar petróleo en condiciones heterotróficas utilizando los hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono, y su capacidad para degradar hidrocarburos petrolíferos completamente has CO₂.

Un clon biológicamente puro y genéticamente idéntico de la cepa So3P de *S. obtusus* se encuentra depositado en el Banco Nacional de Algas (fecha de aceptación, 16 de abril de 2009), con número de acceso BNA D33_09. Un aspecto particular de la presente invención se refiere a cualquier mutante o cepa mejorada genéticamente obtenida a partir de la cepa So3P de *S. obtusus*. También es objeto de la presente invención el dispositivo para la eliminación de los hidrocarburos presentes en vertidos de petróleo, o en efluentes industriales, que contiene un inóculo de la cepa So3P de *S. obtusus* confinado en un espacio o soporte físico, como puede ser un reactor, un filtro o una membrana. También es objeto de la presente invención un procedimiento de degradación de crudo de petróleo, derivados del petróleo y los hidrocarburos presentes en el petróleo y sus derivados, basado en el empleo de la cepa So3P de *S. obtusus*.

Descripción detallada de la presente invención

En el contexto de la presente invención se entiende por hidrocarburos petrolíferos una mezcla heterogénea de compuestos orgánicos que constituyen el crudo de petróleo y sus derivados, tales como la gasolina, queroseno, gasoil, etc. Mayoritariamente son hidrocarburos insolubles en agua, formados únicamente por carbono e hidrógeno con distinto grado de saturación y conformación (lineal o cíclica), aunque también incluye una fracción de hidrocarburos con oxígeno, azufre, nitrógeno y otros elementos. En el contexto de la presente invención se entiende por BTEX la mezcla de hidrocarburos petrolíferos que comprende principalmente benceno, tolueno, etilbenceno y xileno.

Por biorremediación se entiende un conjunto de técnicas basadas en el empleo de organismos vivos para la eliminación de contaminantes. En el contexto de la presente invención, la biorremediación se refiere al empleo de microorganismos acuáticos como las microalgas, mientras que la eliminación de contaminantes está dirigida preferentemente a la degradación de los hidrocarburos petrolíferos. En el sector de la técnica, una muestra de crudo de petróleo o de cualquiera de los derivados del petróleo se caracteriza por su contenido en hidrocarburos totales, siendo éste el parámetro que habitualmente se determina para monitorizar la biorremediación de vertidos y efluentes contaminados por petróleo y sus derivados.

En el contexto de la presente invención se entiende por cepa o clon, un conjunto de microalgas genéticamente idénticas obtenidos como resultado de reproducción asexual; y por inoculo, un pequeño conjunto de células de un clon, empleadas para fundar un cultivo mayor.

La presente invención se refiere a una cepa de microalga para la biorremediación de medios contaminados por hidrocarburos procedentes de crudo de petróleo y sus derivados, caracterizada porque pertenece a la especie *Scenedesmus obtusus* (Fig. 1), y porque presenta la capacidad de degradar hidrocarburos presentes en el petróleo y sus derivados (Fig. 2 y Fig. 3). Un aspecto particular de la presente invención se refiere a un clon biológicamente puro y genéticamente idéntico de la cepa de *S. obtusus*, que se encuentra depositada en el Banco Nacional de Algas con número de acceso BNA D33_09, fecha de aceptación de 16 de abril de 2009, y bajo la denominación de cepa So3P. Otro aspecto particular de la presente invención se refiere a cualquier mutante o cepa mejorada genéticamente obtenida a partir de un clon de la cepa So3P de *S. obtusus*.

El principal aspecto caracterizador de la cepa So3P de *S. obtusus* es su capacidad para tolerar y degradar petróleo en amplios rangos de concentración en el medio. En condiciones de laboratorio, So3P de *S. obtusus* es capaz de degradar petróleo en porcentaje superior al 30% v/v de la muestra. En un medio con un 5% v/v de petróleo, So3P de *S. obtusus* es capaz de degradar más del 50% del petróleo en 13 días (Fig. 2). También es característica de la cepa So3P de *S. obtusus* su capacidad para tolerar y degradar amplias concentraciones de BTEX. En un medio con un 5% v/v de BTEX, So3P de *S. obtusus* es capaz de degradar más del 50% del petróleo en 10 días. (Fig. 3). En general, la cepa So3P de *S. obtusus* puede emplearse para degradar hidrocarburos procedentes del petróleo y derivados del petróleo tales como gases licuados, naftas, disolventes tipo "White Spirit", supercarburante, gasolina, carburante de reactores, queroseno, fuel-oil doméstico, gasóleo de motor, parafinas, fueles pesados, aceites base, ceras y asfaltos. Tanto el petróleo como los mencionados derivados contienen mezclas de hidrocarburos con distinto número de átomos de carbono que puede variar desde 1 átomo de carbono hasta más de 60 átomos de carbono.

Biológicamente aislada, una cepa de *S. obtusus* que degrada petróleo, como por ejemplo, la cepa So3P, se caracteriza morfológicamente por la formación de cenobios de 2, 4 u 8 células conectadas entre sí a distancias cortas y formando fascículos (Fig. 1). Los núcleos de las células no coinciden con el eje del cenobio, y algunas células están ligeramente desplazadas en los fascículos. Son células ovaladas con diámetros mayores de 7,5 μm y diámetros menores de hasta 6,5 μm , usualmente de 4 μm . En condiciones idóneas de cultivo, dicha cepa se caracteriza por velocidades de crecimiento de hasta 1 división por día. Dicha cepa también se caracteriza por su facilidad de cultivo, siendo cultivable en una gran variedad de medios líquidos que contengan un aporte mínimo de nutrientes, y por su tolerancia a amplios rangos de pH (entre 4 y 9), temperatura (entre 10 y 30°C) e iluminación (entre 30 y 700 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), siendo las condiciones más adecuadas para su crecimiento una temperatura de 22°C, un pH de 8.2, y una intensidad luminosa de 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.

Un clon de *S. obtusus* se ha obtenido por un procedimiento de aislamiento que comprende:

- Dilución de una muestra recogida en un medio acuático que durante un tiempo prolongado ha recibido un vertido continuo de petróleo;
- Aislamiento de células seleccionadas una a una, mediante aspiración con un micromanipulador-microinyector;
- Crecimiento activo de estas células en un medio con un 10% v/v de petróleo en medio BG-11 hasta constituir una serie de cultivos clónicos;
- Selección del clon más eficiente en cuanto a degradación de petróleo y capacidad de crecimiento.

Por dicho procedimiento se ha obtenido un clon puro de la cepa So3P objeto de patente. También es objeto de la presente invención un dispositivo para la degradación de petróleo, o alguno de los hidrocarburos presentes en el petróleo, o en efluentes industriales, que contenga un inoculo de la cepa So3P de *S. obtusus* confinado en un espacio o soporte físico. En una realización particular de la presente invención, el inoculo se encuentra inmovilizado en dicho soporte físico. En una realización aún más particular de la presente invención, dicho soporte físico comprende al menos un material silíceo, celulósico, plástico, material sintético o material orgánico. En una realización aún más particular de la presente invención, dicho material comprende al menos un compuesto de entre silicona, poliuretano, poliéster, polisulfonato, polivinilo, poliamida, acetato de celulosa, resinas epoxy, carrágeno, agar, alginato, carraginato o colágeno.

También es objeto de la presente invención un procedimiento de biorremediación de petróleo e hidrocarburos petrolíferos mediante el empleo de la cepa So3P de *S. obtusus*. Un aspecto particular de la presente invención se refiere a un procedimiento de biorremediación de BTEX mediante el empleo de la cepa So3P de *S. obtusus*. Un aspecto particular de la presente invención se refiere a un procedimiento de degradación de petróleo e hidrocarburos procedentes del petróleo mediante el empleo de un clon biológicamente puro y genéticamente idéntico de la cepa de *S. obtusus* que se encuentra depositada en el Banco Nacional de Algas con número de acceso BNA D33_09, fecha de aceptación de 16 de abril de 2009, y bajo la denominación de cepa So3P. Otro aspecto particular de la presente invención se refiere a un procedimiento de biorremediación de petróleo e hidrocarburos petrolíferos mediante el empleo de cualquier mutante o cepa mejorada genéticamente obtenida a partir de un clon de la cepa So3P de *S. obtusus*.

En una realización particular de la presente invención, el procedimiento de degradación de petróleo e hidrocarburos procedentes del petróleo mediante el empleo de la cepa So3P de *S. obtusus* comprende las etapas de:

- a) Neutralización y acondicionamiento del medio a tratar para ajustar las condiciones ambientales del medio a los intervalos favorables de crecimiento de dicha cepa;
- b) Inoculación del medio con clones de dicha cepa;
- c) Cultivo de dichos clones y,
- d) Monitorización de la degradación de los hidrocarburos procedentes del petróleo.

En una realización particular de la presente invención el medio a tratar no se inocula directamente, si no que se pone en contacto con un dispositivo que contiene un inóculo de la cepa So3P de *S. obtusus* confinado en un espacio o soporte físico. En una realización particular de la presente invención, la etapa de neutralización y acondicionamiento del medio a tratar en el procedimiento de degradación de petróleo e hidrocarburos petrolíferos mediante el empleo de la cepa So3P de *S. obtusus*, comprende uno o varios parámetros de entre el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto, la presión de flujo o la velocidad de flujo. En una realización particular, dicha etapa comprende el ajuste del pH en un rango entre 7 y 8,5, y preferentemente 8,2, la temperatura entre 10 y 30°C, y preferentemente 22, y la iluminación entre 30 y 700 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, y preferentemente 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. En una realización particular de la presente invención, el inóculo de la cepa So3P de *S. obtusus* en el procedimiento de degradación de petróleo e hidrocarburos petrolíferos mediante el empleo de dicha cepa, contiene al menos 10³ células por mililitro. En una realización aún más particular de dicha invención, dicho inóculo contiene al menos 10⁶ células de So3P por mililitro.

En una realización preferente de la presente invención, el cultivo de los clones inoculados en el procedimiento de degradación de petróleo e hidrocarburos petrolíferos mediante el empleo de la cepa So3P de *S. obtusus*, incluye uno o varios ciclos consistentes en la retirada de la biomasa microalgal generada en el cultivo y la inoculación de nuevos clones de dicha cepa. De esta forma se puede mantener el cultivo de la cepa en crecimiento exponencial durante el procedimiento de degradación.

El medio a tratar en el procedimiento de degradación de petróleo e hidrocarburos derivados del petróleo mediante el empleo de la cepa So3P de *S. obtusus*, comprende preferentemente un medio acuoso como por ejemplo, un río, un embalse de agua, un pantano, un lago, un acuífero, un medio marino, etc. También comprende el medio acuoso contenido en cualquier depósito o receptáculo destinado a almacenar líquido como por ejemplo un tanque de almacenamiento de agua de abastecimiento humano, un tanque o depósito de una depuradora de agua potable, o un depósito, receptáculo o conducto de tratamiento de agua en una depuradora de aguas residuales. También comprende el medio líquido o parcialmente líquido que es tratado en un reactor en el que se dispone de un depósito o receptáculo similar a una cubeta, arqueta para tratamiento de vertidos, efluentes industriales, aguas sucias y residuales, etc. También comprende suelos y otros medios sólidos en los que puede aplicarse un inóculo de la cepa So3P de *S. obtusus*.

Como fácilmente podrá observar un experto en la materia, la presente invención proporciona una cepa microalgal de gran interés en el campo de la biorremediación y de la degradación biológica de petróleo e hidrocarburos. La cepa So3P de *S. obtusus* objeto de la presente invención presenta una enorme tolerancia y una gran capacidad de degradación de hidrocarburos tales como los presentes en el petróleo o efluentes industriales contaminados con petróleo. Por ello, esta cepa puede ser de enorme interés comercial para su aplicación industrial, ya que pueden obtenerse y dispensarse inóculos de clones de la cepa para su empleo directamente sobre entornos naturales contaminados por un vertido incontrolado o accidental de crudo de petróleo y cualquiera de sus derivados, o para su empleo en dispositivos tales como biorreactores o biofiltros en los que la cepa queda confinada en un espacio o soporte por el que se hace fluir el medio o efluente contaminado con hidrocarburos.

Descripción de las figuras

Para facilitar la comprensión de las características de la invención y formando parte de la memoria descriptiva, se incluyen las siguientes figuras:

Figura 1: Imagen de la cepa So3P de *S. obtusus* vista mediante un microscopio invertido.

Figura 2. Porcentaje de petróleo total (Fluka Analytical Petroleum Special; Fluka Chemie AG, Buchs, Swizerland; ref: 77370) biodegradado por las microalgas después de 13 días a partir de una mezcla de petróleo al 5% v/v en medio BG-11. Sobre la marca “biodegradación” se representa el petróleo biodegradado por la cepa So3P de *S. obtusus*. Al lado se representa el porcentaje de petróleo eliminado espontáneamente durante el experimento (degradación espontánea, evaporación, pérdidas durante la manipulación...). Las barras sobre cada columna representan el error estándar de 4 réplicas del experimento.

Figura 3. Porcentaje de BTEX (BTEX-Standard (Fluka Chemie AG, Buchs, Swizerland; ref: 43728) degradado por las microalgas durante 10 días a partir de una mezcla de BTEX al 5% v/v en medio BG-11. La biodegradación de BTEX en función del tiempo (en días) ajusta significativamente a una regresión lineal ($p \leq .0001$ ****) con un coeficiente de determinación $R^2 = 0.9987$; la pendiente de la recta de regresión es de 4.2 a 4.7 para un intervalo de confianza del 95%.

15 Modo de realización de la invención

A modo de ejemplo y sin exclusión de otro modo de realización, se describen algunas formas particulares de realización de la invención.

20 Ejemplo 1

Aislamiento, clonación y mantenimiento de la cepa So3P de S. obtusus

25 Las cepas se aislaron de muestras recogidas en el Arroyo Minero, Nirihuán de Arriba, Río Negro, Argentina (en posición S 41.2896, W 71.1823°), el día 4 de Abril de 2008. Se localizaron dos afloramientos de crudo de petróleo, uno de ellos natural, que lleva varios cientos de años vertiendo, y otro artificial, procedente de una cata para su posible explotación que se realizó en 1915. Ambos afloramientos se encontraron en la orilla derecha del Arroyo Minero separados unos 15 metros. De ambos brotaba crudo de petróleo mezclado con agua dulce, a temperatura de 20°C, pH de 8.3 y conductividad iónica de 694 μ S. Tanto en el la zona del vertido como en el río, se observaron importantes concentraciones algales en contacto con el petróleo. La toma de muestras se realizó mediante tubos Falcon estériles universales de 50 ml. Todos los tubos fueron debidamente etiquetados, incluyendo fecha de recolección, lugar y características físico-químicas del agua. Las muestras se refrigeraron en nevera (4°C) hasta su posterior envío al laboratorio.

35 Para la identificación de las especies presentes en las muestras, se colocó una gota de la muestra obtenida en un portaobjetos con ayuda de una pipeta pasteur, y se observó en un microscopio invertido. Las especies presentes se identificaron mediante los manuales Bourrelly (1966) y John *et al.* (2008). Además se utilizaron los trabajos de Zalocar *et al.* (1998), Mirande & Tracanna (2004), Mirande & Tracanna (2005), Fernández & Parodi (2005) y Mirande *et al.* (2007).

45 Para el aislamiento, clonación y mantenimiento de inóculos de la cepa So3P de *S. obtusus* se empleó un medio de cultivo BG-11 (Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany) diseñado especialmente para algas de aguas continentales. El medio de cultivo BG-11 se preparó con agua destilada procedente del destilador (Elix 3uv Millipore) a razón de 20 ml/L y filtrado mediante Stericup (Express plus membrane, 250 ml) con filtro de 0,22 μ m.

Los cultivos crecieron en cámaras de cultivo convencionales a una temperatura de 22°C y 60 μ mol/m²s proporcionada por tubos fluorescentes daylight (Phillips TLD 36W/33, France), y sometidos a luz continua.

50 Para el aislamiento se usaron micropipetas de 50 μ m de diámetro como las que se encuentran comercialmente disponibles. Con ayuda de una pipeta pasteur, se colocó una gota de la muestra obtenido en un portaobjetos, y se observó en un microscopio invertido de epifluorescencia. A continuación se sumergió la micropipeta en medio de cultivo BG-11 para evitar problemas de capilaridad. Una vez localizada una célula de características adecuadas, se apuntó con la pipeta y se aspiró. La célula seleccionada se depositó, con la misma micropipeta, en un pocillo de la placa multiensayo con 800 μ L de medio de cultivo BG-11. La operación se repitió para los tres pocillos restantes de la placa, que se rotuló con el nombre de la especie aislada, y la fecha del aislamiento, y se introdujo en la cámara de cultivo para crecimiento del cultivo, observándose en los días siguientes para controlar la evolución del aislado. Pasados unos días, se observó que el aislamiento había sido exitoso, y se realizaron una serie de diluciones sucesivas en placas de 96 pocillos con 200 μ l de medio de cultivo BG11. En cada pocillo de la primera fila de la placa, se inoculó 20 μ L de alícuota con células de la muestra y se transfirieron 20 μ L de cada pocillo de la primera fila a cada pocillo de la siguiente fila, y así sucesivamente hasta completar todas las filas de la placa. Una vez terminada la siembra, la placa se selló con parafilm y se metió en la cámara de cultivo. Pasados unos días, se observó que el aislamiento había sido exitoso, comenzando entonces la fase de clonación.

65 Para mantener un cultivo clonal en fase de crecimiento exponencial realizamos transferencias periódicas de inóculos obtenidos de las placas multiensayo a nuevo medio de cultivo en cajas de cultivo celular de 25 cm³ de volumen con tapón aireador (Greiner Bio-One INC, Longwood, NJ, USA). Las transferencias se realizaron cada 15-20 días en condiciones de esterilidad máxima asepsia, para lo que se utilizó una cámara de flujo laminar y material estéril. Los

inóculos clonales se mantuvieron en cajas de cultivo celular Greiner de 100 ml con tapón aireador en 20 ml de medio de cultivo BG-11 diseñado especialmente para algas de aguas continentales. Al medio de cultivo se añadió un 0,1% de petróleo estándar (Fluka Analytical Petroleum Special; Fluka Chemie AG, Buchs, Swizerland; ref: 77370). Los cultivos se mantuvieron en fase de crecimiento exponencial mediante una serie de transferencias de pequeños inóculos (1-3 ml) a medio de cultivo nuevo (20 ml) manteniendo así constantes sus propiedades a lo largo del tiempo.

Ejemplo 2

10 *Degradación de petróleo mediante la cepa So3P de S. obtusus*

Para los ensayos de degradación de petróleo se empleó un estándar de petróleo certificado (Fluka Analytical Petroleum Special; Fluka Chemie AG, Buchs, Swizerland; ref: 77370) sonicado y diluido al 5% v/v en medio de cultivo BG-11 (Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany). Los ensayos se prologaron durante 13 días.

15 El día 0 se prepararon 10 frascos de 100 ml de los cuales 5 de ellos, (controles) contenían una mezcla sonicada de 5 ml de Petróleo Fluka Analytical Petroleum Special (Fluka Chemie AG, Buchs, Swizerland; ref: 77370). + 95 ml de BG11, mientras que los otros 5 contenían una mezcla sonicada de 5ml de Petróleo Fluka Analytical Petroleum Special (Fluka Chemie AG, Buchs, Swizerland; ref: 77370). + 45 ml de BG11 y 50 ml de cultivo de algas (inoculo de la cepa So3P de *S. obtusus* mantenida en fase exponencial de crecimiento para obtener una concentración inicial de 5×10^6 células por mililitro). Los frascos se introdujeron durante 13 días en una cámara de cultivo en las siguientes condiciones: iluminación continua de $60\text{-}\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ de una longitud de onda de 400-700 nm proporcionada por un tubo fluorescente tipo *daylight* (Phillips TLD 36W/33, France), a 20°C en cámaras de cultivo (Cámaras de Crecimiento de Plantas, Modelo AGP, Ing. Climas, C/ Industria 498-500, Badalona 08918, Barcelona, España). A los 13 días se sacaron los frascos, filtrándose su contenido mediante filtros de jeringa de 0,22 μm . De cada frasco se realizaron extracciones sucesivas con CCl_4 ; los extractos orgánicos fueron filtrados con sulfato sódico anhidro para eliminar posibles restos de agua, y se registró el espectro IR de la muestra obtenida después de este proceso, para la medida de los hidrocarburos totales remanentes en la muestra y el cálculo de la cantidad de petróleo degradada.

30 El análisis de las muestras se realizó en un laboratorio independiente certificado y acreditado, según un método basado en la norma ASTM 3921 (American Society for Testing and Materials) aprobada para su uso por las agencias del Departamento de Defensa de los Estados Unidos bajo la jurisdicción del Comité de ASTM, ASTM International, 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19428-2959, United States), y el procedimiento EPA418b (United States Environmental Protection Agency).

35 En los 5 frascos control, los resultados de los análisis mostraron una media de 4.75% v/v de petróleo mientras que en los 5 frascos inoculados la media fue de 2.38% v/v de petróleo (con un error estándar de 0.20% v/v para los controles y de 0.92% v/v para las muestras).

40 Ejemplo 3

Degradación de BTEX mediante la cepa So3P de S. obtusus

45 Para los ensayos de degradación de BTEX se empleó un material de referencia certificado (BTEX-Standard (Fluka Chemie AG, Buchs, Swizerland; ref: 43728) sonicado y diluido al 5% v/v en medio de cultivo BG-11 (Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany). Los ensayos se prolongaron durante 13 días.

50 El día 0 se prepararon 10 frascos de 100 ml de los cuáles 5 de ellos, (controles) contuvieron una mezcla sonicada de 5% de BTEX-Standard (Fluka Chemie AG, Buchs, Swizerland; ref: 43728)+ 95 ml de BG11, mientras que los otros 5 contuvieron una mezcla sonicada de 5% de BTEX-Standard (Fluka Chemie AG, Buchs, Swizerland; ref: 43728)+ 45ml de BG11 y 50 ml de cultivo de algas (inoculo de la cepa So3P de *S. obtusus* mantenida en fase exponencial de crecimiento para obtener una concentración inicial de 5×10^6 células por mililitro). Los frascos se introdujeron durante 10 días en una cámara de cultivo en las condiciones detalladas en el ejemplo 1.

55 El análisis de las muestras, para la determinación de la cantidad de BTEX presente en las mismas se realizó con el kit comercial (RaPID Assay® Total BTEX Test Kit A00161/A00162; Strategic Diagnostic Inc., Segensworth East, Hampshire.UK.). En los 5 frascos control, los resultados de los análisis mostraron una media de 4.77% v/v de BTEX mientras que en los 5 frascos inoculados la media fue de 3.04% v/v de BTEX (con un error estándar de 0.52% v/v para los controles y de 0.36% v/v para las muestras). El porcentaje de BTEX degradado por las microalgas ajustó significativamente a una regresión lineal ($p \leq .0001$ ****) con un coeficiente de determinación $R^2 = 0.9987$; la pendiente de la recta de regresión es de 4.2 a 4.7 para un intervalo de confianza del 95%.

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cepa de microalga, aislada y biológicamente pura, para biorremediación, **caracterizada** porque pertenece a la especie *Scenedesmus obtusus* y degrada hidrocarburos procedentes de petróleo.
2. Cepa según la reivindicación 1, **caracterizada** porque degrada BTEX.
- 10 3. Cepa según la reivindicación 1, **caracterizada** porque degrada al menos uno o varios de entre los hidrocarburos petrolíferos presentes en derivados del petróleo tales como gases licuados, naftas, disolventes tipo "White Spirit", supercarburante, gasolina, carburante de reactores, queroseno, fuel-oil doméstico, gasóleo de motor, parafinas, fueles pesados, aceites base, ceras y asfaltos.
- 15 4. Cepa según reivindicación 3, **caracterizada** porque degrada hidrocarburos cuyo número de átomos de carbono comprende desde 1 átomo de carbono hasta más de 60 átomos de carbono.
- 20 5. Cepa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque:
- las células de dicha cepa tienen forma ovalada de aproximadamente 7,5 μm de diámetro medio y 6,4 μm de altura media;
 - forma cenobios fasciculares de 2 a 8 células conectadas entre sí en los que los núcleos de dichas células no coinciden con el eje de dicho cenobio;
 - cada célula se duplica a una velocidad de aproximadamente 1 división por día.
- 25 6. Cepa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque crece en un intervalo de temperaturas entre 20 y 30°C, un intervalo de pH entre 7 y 8,5, y un intervalo de intensidad lumínica entre 30 y 700 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.
- 30 7. Cepa según la reivindicación 6, **caracterizada** porque crece a 22°C; pH 8,2, y una intensidad lumínica de 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.
- 35 8. Cepa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque crece en un medio que contiene hidrocarburos procedentes de petróleo como única fuente de carbono.
- 40 9. Cepa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque es un clon que se ha obtenido por un procedimiento que comprende al menos las etapas de:
- a) Obtención de una muestra en un entorno natural que ha recibido hidrocarburos petrolíferos;
 - b) Selección de un clon de *S. obtusus* en dicha muestra obtenida en la etapa a);
 - c) Aislamiento de dicha célula seleccionada en la etapa b) y transferencia de la célula seleccionada a un medio de cultivo.
- 45 10. Cepa según la reivindicación 9, **caracterizada** porque el entorno natural en el que se obtiene dicha cepa es un medio acuático tal como un río, lago, embalse, acuífero o un medio marino.
- 50 11. Cepa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque es un clon de la cepa de *S. obtusus* denominada SoP3 que se encuentra depositado en el Banco Nacional de Algas con referencia BNA D33_09, o cualquier mutante o variante genéticamente modificada de la misma.
- 55 12. Dispositivo para la degradación de hidrocarburos petrolíferos, **caracterizado** porque comprende al menos una cepa de *S. obtusus* que degrada hidrocarburos petrolíferos, confinada en un espacio o soporte físico.
- 60 13. Dispositivo según la reivindicación 12, **caracterizado** porque el soporte físico está constituido por, al menos, un material silíceo, plástico, celulósico o sintético.
- 65 14. Dispositivo según la reivindicación 13, **caracterizado** porque dicho material comprende, al menos, un compuesto de entre poliuretano, poliéster, polisulfonato, polivinilo, poliamida, acetato de celulosa, resinas epoxy, carrágeno, agar, alginato o colágeno.
15. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, **caracterizado** porque la cepa confinada es la cepa denominada SoP3 de *S. obtusus* que se encuentra depositado en el Banco Nacional de Algas con referencia BNA D33_09, o cualquier mutante o variante genéticamente modificada de la misma.

16. Procedimiento de biorremediación de hidrocarburos petrolíferos, **caracterizado** porque comprende el empleo de al menos una cepa de *S. obtusus* que degrada hidrocarburos petrolíferos.

5 17. Procedimiento de biorremediación de hidrocarburos petrolíferos según la reivindicación 16, **caracterizado** porque la cepa de *S. obtusus* empleada, es la denominada SoP3 que se encuentra depositado en el Banco Nacional de Algas con referencia BNA D33_09, o cualquier mutante o variante genéticamente modificada de la misma.

10 18. Procedimiento de biorremediación de hidrocarburos petrolíferos según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 17, **caracterizado** porque degrada al menos uno o varios de entre los hidrocarburos petrolíferos presentes en derivados del petróleo tales como gases licuados, naftas, disolventes tipo "White Spirit", supercarburante, gasolina, carburante de reactores, queroseno, fuel-oil doméstico, gasóleo de motor, parafinas, fueles pesados, aceites base, ceras y asfaltos.

15 19. Procedimiento de biorremediación de hidrocarburos petrolíferos según la reivindicación 18, **caracterizado** porque degrada hidrocarburos cuyo número de átomos de carbono comprende desde 1 átomo de carbono hasta más de 60 átomos de carbono.

20 20. Procedimiento de biorremediación de hidrocarburos petrolíferos según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, **caracterizado** porque comprende al menos las etapas de:

- a) Acondicionamiento del medio contaminado;
- b) Inoculación del medio con al menos una cepa de *S. obtusus* que degrada hidrocarburos petrolíferos.

25 21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, **caracterizado** porque comprende al menos las etapas de:

- a) Acondicionamiento del medio contaminado;
- 30 b) Puesta en contacto del medio contaminado con un dispositivo que contiene un inóculo de la cepa de *S. obtusus* que degrada hidrocarburos petrolíferos, confinado en un espacio o soporte físico.

35 22. Procedimiento de biorremediación de hidrocarburos petrolíferos según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 21, **caracterizado** porque la etapa de acondicionamiento del medio comprende el ajuste de uno o varios parámetros de entre el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto, la iluminación, la presión o la velocidad de flujo.

40 23. Procedimiento según la reivindicación 22, **caracterizado** porque la etapa de acondicionamiento comprende el ajuste del pH a 8,2, la temperatura a 22°C y la iluminación a 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.

45 24. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, **caracterizado** porque comprende el inóculo de al menos 103 células/ml de la cepa de *S. obtusus*.

50 25. Procedimiento según la reivindicación 24, **caracterizado** porque comprende el inóculo de al menos 10⁶ células/ml de la cepa de *S. obtusus*.

55 26. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25, **caracterizado** porque incluye uno o varios ciclos consistentes en la retirada de la biomasa microalgal generada en el cultivo y la inoculación de nuevos clones de dicha cepa.

60 27. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 26, **caracterizado** porque el medio a tratar comprende un río, un embalse de agua, un pantano, un lago, un acuífero, un medio marino, un depósito o receptáculo destinado a almacenar líquido, un tanque de almacenamiento de agua de abastecimiento humano, un tanque o depósito de una depuradora de agua potable, un receptáculo o conducto de tratamiento de agua en una depuradora de aguas residuales, un reactor para tratamiento de vertidos, efluentes industriales o aguas residuales, superficies de suelos, y superficies de medios sólidos.

65

65

Figura 1

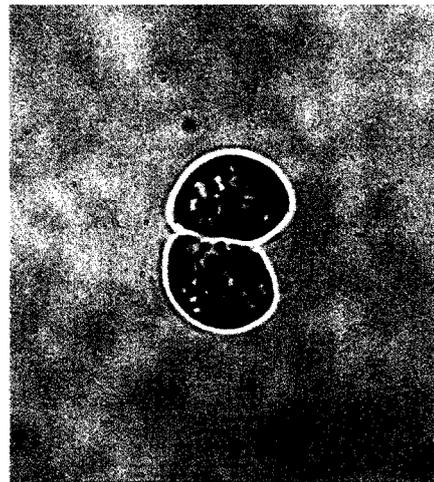
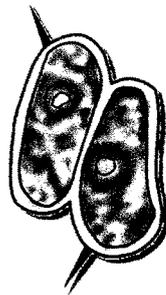
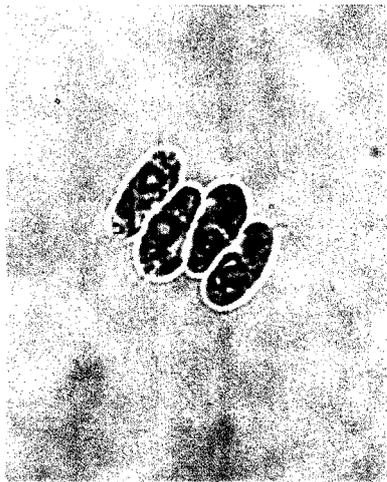


Figura 2

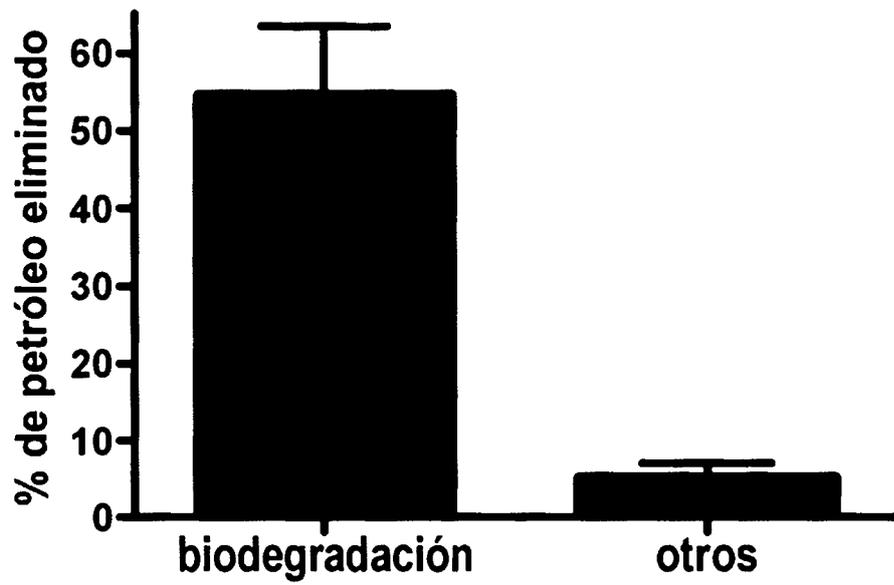
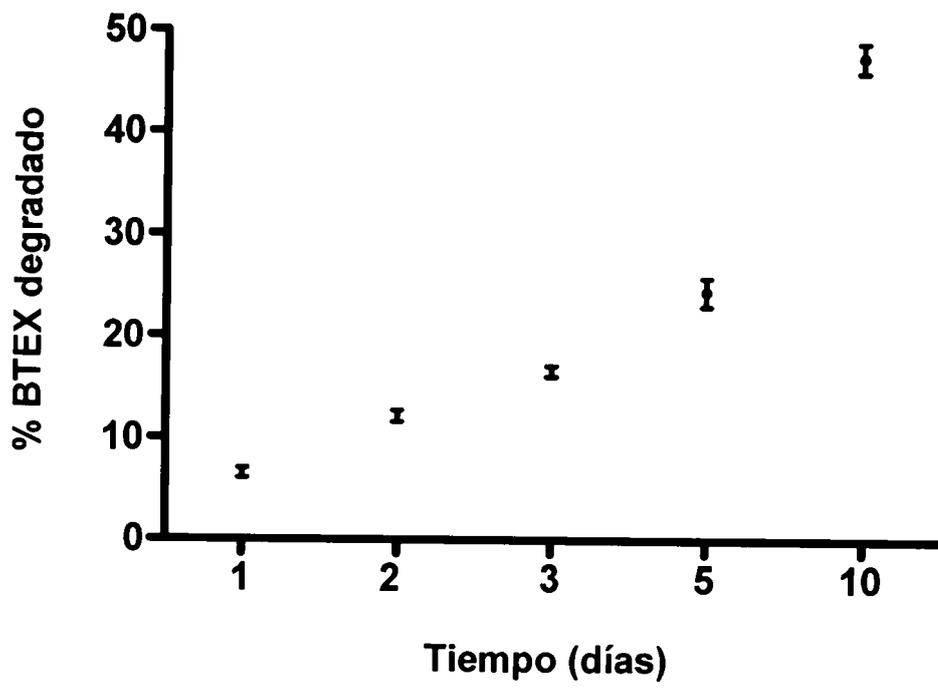


Figura 3





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200901935

②② Fecha de presentación de la solicitud: 01.10.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	GAMILA H.A. y IBRAHIM M.B.M. Algal bioassay for evaluating the role of algae in bioremediation of crude oil: I-isolated strains. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 2004, vol. 73, páginas 883-889, tabla 1.	1-27
A	IBRAHIM M.B.M. y GAMILA H.S. Algal bioassay for evaluating the role of algae in bioremediation of crude oil: II. Freshwater phytoplankton assemblages. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 2004, vol. 73, páginas 971-978.	1-27
A	LEI, A. et al. Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. Bioresource Technology, 2007, vol. 98, páginas 273-280.	1-27
A	FERRERA_CERRATO, R. et al. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. Revista Latinoamericana de Microbiología, 2006, vol. 48 (2), páginas 179-187.	1-27
A	EP 2093197 A1 (PETROLEO BRASILEIRO) 26.08.2009, todo el documento.	1-27

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
27.01.2011

Examinador
A. Polo Díez

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/20 (01.01.2006)

C12N1/26 (01.01.2006)

C02F3/32 (01.01.2006)

C12M1/40 (01.01.2006)

C12R1/89 (01.01.2006)

C02F101/32 (01.01.2006)

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

C12N, C12R, C02F, C12M

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, INTERNET, HCAPLUS, BIOSIS, POLLUAB

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.01.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-27	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-27	SI
	Reivindicaciones	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	GAMILA H.A. y IBRAHIM M.B.M. Algal bioassay for evaluating the role of algae in bioremediation of crude oil: I-isolated strains. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 2004, vol. 73, páginas 883-889, tabla 1.	2004
D02	IBRAHIM M.B.M. y GAMILA H.S. Algal bioassay for evaluating the role of algae in bioremediation of crude oil: II. Freshwater phytoplankton assemblages. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 2004, vol. 73, páginas 971-978.	2004
D03	LEI, A. et al. Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. Bioresource Technology, 2007, vol. 98, páginas 273-280.	2007
D04	FERRERA_CERRATO, R. et al. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. Revista Latinoamericana de Microbiología, 2006, vol. 48 (2), páginas 179-187.	2006
D05	EP 2093197 A1 (PETROLEO BRASILEIRO)	26.08.2009

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 se refiere a una cepa de la especie de microalga *Scenedesmus obtusus* que degrada hidrocarburos procedentes del petróleo (reivindicación 1). Las reivindicaciones dependientes caracterizan con más precisión a la cepa de la microalga (reivindicaciones 2-11). También es objeto de la invención un dispositivo que comprende la cepa anteriormente citada (reivindicaciones 12-15) y el procedimiento de biorremediación de hidrocarburos procedentes del petróleo utilizando la cepa *S. obtusus* (reivindicaciones 16-27)

Los documentos D1 a D4 citados en el estado de la técnica divulgan otras especies del género *Scenedesmus* capaces de degradar hidrocarburos.

En el documento D1 se aíslan microalgas del río Nilo con objeto de evaluar su capacidad para degradar hidrocarburos (tabla 1). La microalga de la especie *S. obliquus* es capaz de degradar tanto alcanos como hidrocarburos policíclicos aromáticos.

El documento D2 muestra la evolución de las comunidades fitoplanctónicas en los vertidos de petróleo. Con el paso del tiempo las algas verdes sustituyen a las diatomeas. La especie *S. quadricauda*, es una de las más adaptadas al medio contaminado.

En el documento D3 se estudia la eliminación de fluoranteno y pireno (hidrocarburos policíclicos aromáticos típicos del petróleo) por medio de diferentes microalgas de la división *Chlorophyta*, entre las que figuran *S. platydiscus* y *S. quadricauda*.

El documento D4 señala las especies de microalgas verdes pertenecientes a los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus* como las más utilizadas en procesos de biorremediación de contaminantes. Concretamente *S. acutus* y *S. brasiliensis* son capaces de degradar derivados del petróleo .

El documento D5 menciona que las microalgas del género *Scenedesmus sp.* se han usado para la purificación de efluentes domésticos (párrafo 5). Este documento también propone el aislamiento de microalgas capaces de degradar ciertos contaminantes a partir de un medio contaminado, de manera que las microalgas estén adaptadas de modo natural a estos contaminantes, es decir, sean capaces de crecer en condiciones severas de toxicidad (párrafos 10-15).

A pesar de que se han utilizado microalgas del género *Scenedesmus* en la degradación de hidrocarburos procedentes del petróleo, ninguno de los documentos citados en el estado de la técnica describe una cepa de la especie *S. obtusus* para este fin. Por lo tanto, las reivindicaciones 1 a 27 cumplen el requisito de novedad y se considera que implican actividad inventiva.