

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 566**

51 Int. Cl.:
C12N 1/16 (2006.01)
B09C 1/10 (2006.01)
C02F 3/34 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06714411 .3**
96 Fecha de presentación: **23.02.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1857541**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.11.2007**

54 Título: **Microorganismo que puede degradar una sustancia estrogénica y uso del mismo**

30 Prioridad:
23.02.2005 JP 2005046392

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.05.2012

73 Titular/es:
**KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA
1-19, HIGASHISHINBASHI 1-CHOME MINATO-KU
TOKYO 105-8660, JP**

72 Inventor/es:
**YOSHIMOTO, Takeshi;
NAGAI, Fumiko;
FUJIMOTO, Junji;
KIMURA, Kazumasa;
MIZUKOSHI, Harumi;
WATANABE, Koichi;
MAKINO, Takashi;
OMURA, Hiroshi y
SAINO, Hideyuki**

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 381 566 T3

DESCRIPCIÓN

Microorganismo que Puede Degradar una Sustancia Estrogénica y Uso del Mismo

5 **Campo Técnico**

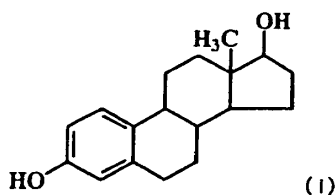
La presente invención se refiere a un microorganismo que degrada una sustancia estrogénica y al uso del mismo, y, más particularmente, a un microorganismo capaz de degradar una sustancia estrogénica contenida en las aguas residuales domésticas, las aguas residuales vertidas de una explotación ganadera, y similares, a un método para degradar biológicamente una sustancia estrogénica utilizando el microorganismo, y a un aparato para lograr la degradación.

Técnica Anterior

15 Los mecanismos de oxidación de esteroides por *Nocardia* sp. son conocidos de Coombe, RG, et al., J. Biol. Chem., 241 (7), 1587-1595, (1966). Los disruptores endocrinos, que alteran el sistema endocrino en un organismo vivo se han entendido como un grave problema social, desde que T. Colborn publicó "Our Stolen Future" en 1996. El sistema endocrino en un organismo es un sistema que mantiene y regula la generación de un organismo, el desarrollo de los órganos sexuales, y las funciones de varios órganos de un organismo vivo causados por las acciones de un andrógeno, un estrógeno, una hormona tiroidea, una hormona adrenocortical, y similares. Las sustancias químicas que funcionan como disruptores endocrinos son un grupo de sustancias que alteran el sistema endocrino en el organismo. Una gran cantidad de los disruptores endocrinos se vierten a la naturaleza por diversas actividades humanas y similares y ocasionan una gran cantidad de crecimiento anormal en la vida silvestre.

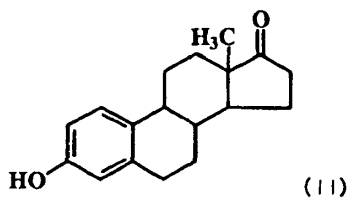
25 Junto con las sustancias estrogénicas, se conocen compuestos organoclorados tales como plaguicidas, agentes antibacterianos, y herbicidas y productos químicos industriales tales como el bisfenol A y el nonilfenol como sustancias químicas que funcionan como disruptores endocrinos. Entre ellos, el uso de productos químicos industriales ha sido estrictamente regulado por la Ley de Control de la Contaminación del Agua y otras normas de contaminación, debido a sus propiedades tóxicas. La cantidad de estas sustancias químicas vertidas al medio ambiente está disminuyendo. Sin embargo, la cantidad de sustancias estrogénicas como el 17 β -estradiol, la estrona y el estriol contenidas en la orina humana y animal vertidas al medio ambiente va en aumento junto con el crecimiento de la población. La feminización anormal de la vida silvestre ha sido confirmada en los ríos y lagos a los que fluyen grandes cantidades de aguas residuales domésticas desde el área urbana ("The Fiminization of Nature ", escrito por Deborah Cadbury, editado por Taisen Iguchi, Shueisha, 1998). Esto sugiere que la incapacidad para fertilizar puede desequilibrar los ecosistemas.

40 El 17 β -estradiol mostrado por la siguiente fórmula (I) es una hormona esteroide secretada por el foliculo ovárico y es la sustancia más fisiológicamente activa entre las sustancias estrogénicas. Su secreción es controlada por las hormonas estimuladoras del foliculo y las hormonas luteinizantes en la glándula pituitaria. El 17 β -estradiol se utiliza como un medicamento para el tratamiento de la amenorrea, los trastornos menstruales, la dismenorrea, la hipoplasia uterina, el síndrome posmenopáusico, y similares.



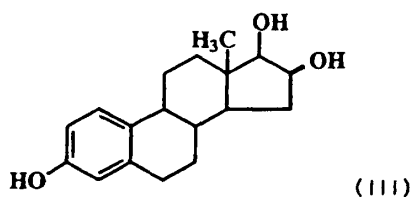
45 La estrona mostrada por la siguiente fórmula (II) es un tipo de estrógeno que es un metabolito de 17 β -estradiol. La estrona que tiene una fuerte actividad estrogénica aparece en la orina y es descargada desde el organismo. La estrona se usa como un agente hormonal para el tratamiento de la disfunción sexual en las mujeres, el síndrome postmenopáusico, el cáncer de próstata en los hombres, y similares.

50



El estriol mostrado mediante la siguiente fórmula (III) es un estrógeno que es un metabolito de 17β-estradiol en un organismo que está formado a través de estrona y se descarga en la orina. El estriol tiene un efecto de estro.

5



Como se describió anteriormente, las sustancias estrogénicas se utilizan como medicamentos humanos. Están contenidos en la orina y se descargan desde el organismo junto con la orina. Estas sustancias también se administran a los animales de granja y de este modo se vierten al medio ambiente desde las explotaciones ganaderas. Debido a que la vida silvestre y los peces en ríos y lagos están contaminados con estas sustancias estrogénicas, es necesario disminuir las sustancias estrogénicas contenidas en las aguas residuales antes de su vertido a un río o similar, por ejemplo, en las instalaciones de tratamiento de aguas residuales.

10

Hay tres tipos de métodos de tratamiento de aguas residuales utilizados en la actualidad en las instalaciones de tratamiento de aguas residuales: tratamiento físico, tratamiento químico y tratamiento biológico. El tratamiento físico incluye centrifugación, filtración, separación por flotación a presión, adsorción, y similares. El tratamiento químico, en concreto, es la desintoxicación de sustancias tóxicas mediante la adición de productos químicos y similares, electrodiálisis, intercambio iónico, y similares. Por otro lado, el tratamiento biológico es un tratamiento que utiliza microorganismos para degradar y eliminar las sustancias orgánicas en aguas residuales y es eficaz para el tratamiento de sustancias difíciles de tratar físicamente o químicamente.

15

20

El tratamiento biológico ha sido popularmente utilizado en muchas instalaciones de tratamiento de aguas residuales en los últimos años. El tratamiento biológico, en general, tiene tres pasos: un tratamiento preliminar, un tratamiento de oxidación biológica, y un tratamiento de lodos. El tratamiento preliminar comprende los tratamientos que utilizan una pantalla, una pila de arena, una cuenca de sedimentación, un baño flotante, y similares. Estos dispositivos eliminan los materiales sólidos y los materiales flotantes inorgánicos que tienen un tamaño de partícula grande en las aguas residuales, y son útiles en la reducción de la carga de sustancias orgánicas en las instalaciones de tratamiento de oxidación biológica.

25

30

El tratamiento de oxidación biológica, por el contrario, utiliza microorganismos. En cuanto al método de utilización de microorganismos, se pueden proporcionar un método para hacer que los microorganismos se adhieran a la superficie de un soporte sólido y para hacer crecer los microorganismos en la superficie, y un método para suspender grupos microbianos en un líquido. El primer método se lleva a cabo normalmente utilizando un aparato de lecho fijo de un procedimiento de percolación, mientras que para el último método se utiliza un aparato de lecho fluidificado de un procedimiento con lodos activados.

35

Entre éstos, en el método de tratamiento de aguas residuales usando un aparato de lecho fijo, se emplean un método de inmovilización por unión, un método de inmovilización por englobamiento, y similares para inmovilizar los microorganismos. El método de inmovilización por unión es un método que hace que los microorganismos se adhieran a un portador insoluble por medio de un enlace covalente, enlace iónico, enlace de hidrógeno, adsorción física, o similares. El método de inmovilización por englobamiento es un método para englobar los microorganismos en un gel polimérico producido mediante polimerización o asociación de un compuesto de bajo peso molecular o cambiando el estado de un compuesto polimérico de un estado soluble a un estado insoluble. En cuanto al material en el método anterior se utilizan un portador cerámico, un portador de celulosa, carbón activado particulado, y similares, mientras que en el último método se utilizan como material poli(alcohol vinílico) (PVA), carragenano, y similares.

40

45

Dado que el tratamiento de lodos activados, el tratamiento de percolación, y similares son métodos excelentes para la reducción de las sustancias contaminantes en las aguas residuales, se han llevado a cabo activamente en los últimos años diversos enfoques biológicos de los disruptores endocrinos degradantes. Algunos proyectos incluyen la mejora de la eficiencia de tratamiento y el empleo de una norma más estricta para el escrutinio y la selección de microorganismos que pueden degradar los disruptores endocrinos cuyo tratamiento es difícil. Hasta ahora, se ha informado sobre microorganismos pertenecientes al género *Sphingomonas* capaces de degradar nonilfenol (Documento de patente 1), los microorganismos pertenecientes al género *Fusarium* capaces de degradar dioxina (Documento de patente 2), los microorganismos pertenecientes al género *Fusarium* capaces de degradar etinilestradiol que es un estrógeno sintético (Documento de patente 3), y similares. El solicitante de la presente invención ha informado sobre microorganismos pertenecientes al género *Rhodococcus* o *Sphingomonas* que pueden degradar 17 β -estradiol y similares (Documento de patente 4).

Sin embargo, se han descubierto pocos microorganismos capaces de degradar sustancias estrogénicas de forma rápida y eficaz que sean particularmente difíciles de degradar por el tratamiento con microorganismos. Se exige un microorganismo que tenga una mayor capacidad de degradación.

El solicitante de la presente invención ha informado sobre microorganismos pertenecientes al género *Rhodococcus* o *Sphingomonas* que pueden degradar 17 β -estradiol y similares. Sin embargo, a pesar de que estas bacterias que degradan estrógenos presentan una buena capacidad de degradación en circunstancias en las que fluye continuamente una concentración de estrógeno comparativamente baja, sus efectos no son suficientes en circunstancias que permiten fluir principalmente una alta concentración de estrógeno.

[Documento de patente1] Solicitud de Patente Japonesa Abierta No. 2001-333767

[Documento de patente2] Solicitud de patente japonesa Abierta a la Inspección Pública Núm. 11-341978

[Documento de patente3] Solicitud de Patente japonesa Abierta a la Inspección Pública Núm. 2003-52356

[Documento de patente 4] Solicitud de patente japonesa Abierta a la Inspección Pública Núm. 2004-65008

Descripción de la invención

Problemas a resolver por la invención

La presente invención se ha completado en la vista de esta situación y tiene el objeto de proporcionar un microorganismo que degrade sustancias estrogénicas, un método para degradar simple y eficazmente una sustancia estrogénica contenida en las aguas residuales domésticas, aguas residuales vertidas de una explotación ganadera, o similares, utilizando el microorganismo, y un aparato para lograr la degradación.

Medios para resolver los problemas

Como resultado de estudios exhaustivos, los autores de la presente invención han descubierto microorganismos capaces de degradar sustancias estrogénicas eficazmente mediante el método de selección que se discute más adelante. Los autores de la invención han encontrado además que la sustancia estrogénica contenida en las aguas residuales o similares se puede degradar simple y eficazmente utilizando el microorganismo. Estos hallazgos han llevado a la finalización de la presente invención.

Específicamente, la presente invención proporciona microorganismos que degradan sustancias estrogénicas que pertenecen al género *Pseudaminobacter*, *Gordonia*, *Zoogloea*, *Cryptococcus*, o *Trichosporon* como se define adicionalmente en la reivindicación 1.

La presente invención también proporciona un método para degradar biológicamente una sustancia estrogénica usando uno de los microorganismos anteriormente mencionados.

La presente invención proporciona adicionalmente un aparato para degradar una sustancia estrogénica que comprende un medio para soportar el microorganismo que degrada sustancias estrogénicas anteriormente mencionado y también se describe un medio para hacer que el microorganismo entre en contacto con el agua residual o el suelo.

Además, la presente invención se utiliza para la degradación de una sustancia estrogénica por los microorganismos que degradan la sustancia estrogénica anteriormente mencionados.

Efecto de la invención

El microorganismo que degrada sustancias estrogénicas de la presente invención tiene la capacidad de degradar sustancias estrogénicas tales como el 17 β -estradiol, la estrona, o el estriol.

Por lo tanto, las sustancias estrogénicas en las aguas residuales y suelos contaminados con las sustancias estrogénicas se pueden degradar mediante el método y el aparato para degradar sustancias estrogénicas en los que se utiliza el microorganismo anteriormente mencionado, mediante el cual se puede mejorar el medio ambiente.

5 Mejor Modo de Llevar a Cabo la Invención

El microorganismo que degrada sustancias estrogénicas de la presente invención como se define en la reivindicación 1 (en lo sucesivo denominado "microorganismo de la presente invención") tiene la capacidad de degradar sustancias estrogénicas en un organismo vivo, tal como 17 β -estradiol, estrona, y estriol que se ilustran, respectivamente, mediante las fórmulas (I) a (III), o sus metabolitos (en adelante denominadas colectivamente como "sustancias estrogénicas"). Estas sustancias estrogénicas no pueden ser eliminadas mediante un tratamiento de oxidación biológica común y se pueden tratar químicamente solo con dificultad debido a su estructura química estable.

En cuanto al microorganismo de la presente invención que tiene estas características, los se pueden proporcionar microorganismos pertenecientes al género *Pseudaminobacter*, *Gordonia*, *Zoogloea*, *Cryptococcus*, o *Trichosporon*. Más específicamente, se pueden proporcionar uno o más microorganismos pertenecientes al siguiente Grupo A.

<Grupo A>

Pseudaminobacter salicylatoxidans

Gordonia terrae

Zoogloea sp.

Cryptococcus sp.

Trichosporon loubieri

Estos microorganismos de la presente invención se pueden obtener a partir de diversos microorganismos que existen en el lodo activado y lodo de retorno en las plantas de tratamiento de aguas residuales y similares mediante escrutinio multietapa usando una sustancia estrogénica.

Específicamente, con el fin de obtener el microorganismo de la presente invención a partir de diversos microorganismos que existen en el lodo activado en unidades de eliminación de aguas residuales y similares, los microorganismos contenidos en el lodo activado se cultivan mediante cultivo de enriquecimiento utilizando una sustancia estrogénica para separar los microorganismos que degradan sustancias estrogénicas de los microorganismos que no se degradan sustancias estrogénicas.

El cultivo de enriquecimiento se lleva a cabo preferiblemente utilizando un caldo de cultivo que contiene lodo tal como lodo activado y lodo de retorno, y el medio de cultivo MDG, por ejemplo, que contiene una sustancia estrogénica y tiene una composición de la siguiente Tabla 1 (Medio de DOMINIC y GRAHAM modificado; los compuestos enumerados en la Tabla 2 se utilizan como elementos traza). Es deseable cultivar los microorganismos sacudiendo vigorosamente un tubo de ensayo o similar a una temperatura de aproximadamente 28°C, por ejemplo, durante una semana por cada generación. Es preferible el cultivo de aproximadamente cinco generaciones.

TABLA 1

Unidad: (peso/vol)%	
Medio MGD	
K ₂ HPO ₄ (G/L)	3,5
KH ₂ PO ₄	1,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5
NaCl	0,5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,15
Elementos traza (mL/L)	1,0
Extracto de levadura	0,005 o 0
pH	6,0 o 7,0

TABLA 2

Unidad: g / L	
Elemento traza	
NaHCO ₃ · OH ₂ O	2,0
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0,3
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,2
(NH ₄) Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0,02
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,1
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,05
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,5

5 A continuación, el que se hayan degradado o no las sustancias estrogénicas en la solución de cultivo de enriquecimiento obtenida anteriormente se examina y confirma mediante una cromatografía en capa fina (TLC) y similares, y se seleccionan las soluciones de cultivo de enriquecimiento en las que se han degradado las sustancias estrogénicas.

10 Los microorganismos contenidos en la solución de cultivo de enriquecimiento seleccionados de esta manera se aíslan utilizando un medio de cultivo común utilizado para la separación de los microorganismos, por ejemplo, un medio de cultivo disponible comercialmente tal como medio de cultivo ISP, medio de cultivo R₂A, y medio de cultivo YM.

15 Cada uno de los microorganismos aislados se cultiva adicionalmente en un medio de cultivo que contiene sustancias estrogénicas, y se pueden escrutar los microorganismos con alta capacidad de degradación de la sustancia estrogénica midiendo la cantidad de las sustancias estrogénicas que quedan en el medio de cultivo después del cultivo, utilizando, por ejemplo, un cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de gases, o similares. Un microorganismo con una alta capacidad de degradación de la sustancia estrogénica se puede obtener mediante la repetición de esta operación de escrutinio varias veces.

20 Cuando se hace que de 10⁷ a 10⁸ células/L del microorganismo de la presente invención obtenido de esta manera actúen sobre lodos, aguas residuales, un medio de cultivo, o similares que contienen sustancias estrogénicas a una concentración de 100 mg/L, el microorganismo puede degradar 65% o más, y preferiblemente 80% o más de las sustancias estrogénicas contenidas en el medio de cultivo al cabo de cinco horas. El microorganismo de la presente invención puede degradar particularmente 90% o más, y más preferiblemente 99% o más, de 17β-estradiol entre las sustancias estrogénicas en ocho horas. La temperatura a la cual se hace que actúe el microorganismo de la presente invención es de 25 a 30°C, y preferiblemente de 27 a 28°C.

30 En concreto, se obtuvieron las siguientes nueve cepas de microorganismos como microorganismos que degradan sustancias estrogénicas mediante el método de escrutinio antes mencionado a partir de los lodos activados o los lodos de retorno de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Fushimi (Kyoto-shi, Kyoto), la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Tarumi (Kobe-shi, Hyogo), la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Tamagawa-joryu (Akishima-shi, Tokyo), el Centro de Tratamiento de Morigasaki (Ota-ku, Tokio), la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Northern Second (Yokohama-shi, Kanagawa), el Centro Medioambiental de Todoroki (Kawasaki-shi, Kanagawa), y la Planta de Tratamiento de Tachikawa-Fujimi (Tachikawa-shi, Tokio). Estas cepas de microorganismos se identificaron mediante análisis de la evolución del sistema molecular descrito por Carl R. Woese, *Bacterial Evolution*, *Microbiological Reviews*, 51: 221-271 (1987) y E. Stackebrandt y B.M. Goebel, *Taxonomic Note, A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology.*, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, (4), 846-849 (1994), utilizando la secuencia de ADNr 16S de los microorganismos.

45 *Pseudaminobacter salicylatoxidans* cepa TAA-I3 (FERM BP-10519)
Gordonia terrae cepa TAI-I5 (FERM BP-10521)
Zoogloea sp. cepa ATM-I1 (FERM BP-10523)
Cryptococcus sp. cepa TMN-Y2 (FERM BP-10525)
Trichosporon loubieri cepa FF-Y2 (FERM BP-10526)

Entre estos microorganismos, la cepa TAA-I3 de *Pseudaminobacter salicylatoxidans*, la cepa TAI-I5 de *Gordonia terrae*, la cepa ATM-I1 de *Zoogloea sp.*, la cepa TMN-Y2 de *Cryptococcus sp.*, y la cepa FF-Y2 de *Trichosporon loubieri* fueron depositadas a nivel internacional en Independent Administrative Agency, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository Center (Address: Chuo No. 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki, 305-8566, Japón) con el número de depósito descrito anteriormente el 26 de abril de 2004.

Se examinaron las características microbiológicas de la cepa TAA-I3 de *Pseudaminobacter salicylatoxidans* entre los microorganismos anteriormente mencionados y se encontró que eran las siguientes.

Forma: es aeróbica estricta y aplanética, crece en forma de hifas, forma una colonia de color amarillo en muchos casos, y se incluye en la subdivisión α de Proteobacterias de bacterias gram negativas.

Características fisiológicas: es positiva para oxidasa y catalasa.

Rango de crecimiento: crece a una temperatura de 20 a 40°C, pero no crece cuando se incubaba a 10°C o 45°C durante siete días.

Utilización de sacáridos: aeróbicamente utiliza D-glucosa, D-manitol, dulcitol, y melibiosa y exhibe un efecto anabólico sobre D-glucosa, D-maltosa, D-ribosa, D-xilosa, y similares.

Estas características son las mismas que las características de *Pseudaminobacter sp.* que incluye *Pseudaminobacter salicylatoxidans*, referido por P. Kampfer, Descripción de Pseudoaminobacter gen. Nov. con dos nuevas especies, *Pseudaminobacter salicylatoxidans sp. Nov.* y *Pseudaminobacter defluvii sp. Nov.*, International Journal of Systematic Bacteriology, 49:887-897 (1999).

Se examinaron las características microbiológicas de la cepa TAI-I5 de *Gordonia terrae* entre los microorganismos anteriormente mencionados y se encontró que eran las siguientes. Forma: son aeróbicas estrictas, aplanéticas, y bacilos cortos o pseudococos débilmente resistentes a ácidos. Forman colonias de color rojo y amarillo en muchos casos y se pueden separar de entornos tales como el suelo y lodos activados, y se incluyen en *Corynebacterium* cocos gram positivos con alto contenido en GC.

Características fisiológicas: El peptidoglicano de la pared celular es de tipo A1 γ , muchos de los cuales son de tipo glicolilo e incluyen arabinosa y galactosa. El componente básico de una quinona de la cadena respiratoria es MK-9 (H₂). El ácido graso es de tipo monoinsaturado lineal y contiene 10Me-18:0. El contenido de ácidos impares varía según la especie. Como fosfolípidos, además de PE, se detectan DPG, PG, PI, y PIM. También hay algunos glicolípidos.

Rango de crecimiento: La temperatura óptima de crecimiento es de 28 a 37°C.

Estas características son las mismas que las características de *Gordonia sp.* incluso *Gordonia terrae*, *Gordonia rubropertinctus*, y *Gordonia amaraese* descritas en "Classification and Identification of Actinomyces" Business Center for Academic Societies Japan, editado por The Society for Actinomyces de Japón: 183-184 (2001).

Se examinaron las características microbiológicas de la cepa ATM-I1 de *Zoogloea sp.* entre los microorganismos anteriormente mencionados y se encontró que eran las siguientes. Forma: es aeróbica estricta y aplanética, crece en forma de hifas, forma colonias de color blanco a amarillo pálido en muchos casos, se incluye en la subdivisión β de *Proteobacteria* de bacterias Gram negativas, y existe en el lodo mediante la formación de grupos.

Características fisiológicas: posee las actividades ureasa, oxidasa, y gelatinasa. Rango de crecimiento: La temperatura de crecimiento óptima es de 20 a 37°C.

Estas características son las mismas que las características de *Zoogloea sp.* descrita en los documentos publicados (Rosselló-Mora, R., Luis, W. y Schleifer, KH: *Zoogloea ramigera*, una especie filogenéticamente diversa, FEMS Microbiol. Lett. 114, 129-134 (1993) y R. G. E Murray: MANUAL de BERGEY de Bacteriología Sistemática, Volumen 4, 214-219 (1992)).

Se examinaron las características microbiológicas de la cepa TMN-Y2 de *Cryptococcus sp.* y se encontró que eran las siguientes.

Forma: produce un basidio como generación sexual, produce exógenamente basidiosporas, y forma colonias de color blanco en muchos casos, que crecen rápidamente, son uniformes, y emiten brillo fuerte o franco. Los conidios de tipo yema son mono-celulares, recubiertos con una cápsula, globulares u ovals, y multipolares.

Características fisiológicas: no fermenta azúcar, pero utiliza inositol y produce ureasa.

Rango de crecimiento: La temperatura de crecimiento óptima es de 20 a 37°C.

Estas características son las mismas que las características de *Cryptococcus sp.* descritas en un documento publicado (Takashima, M. y Nakase, T., Molecular phylogeny of the genus *Cryptococcus* and related species based on the sequence of 18S rDNA and internal transcribed spacer regions, Microbiol. Cult. Coll., 15, 35-47 (1999)).

Se examinaron las características microbiológicas de la cepa FF-Y2 de *Trichosporon loubieri* y se encontró que eran las siguientes.

- Forma: es reproducible sexualmente y produce ascosporas en esporosacos. Las colonias crecen rápidamente, tienen una superficie lisa, arrugada, atricosis a superficie aterciopelada, y emiten brillo fuerte o franco. Es de tipo ceroso y frágil, y tiene un color blanco o crema amarillento. Los seudomicelios y las hifas son abundantes y bien desarrollados. Los conidios de tipo yema son monocelulares y tienen formas diversas. Los conidios de tipo división son monocelulares y tienen una forma alargada.
- 5 Características fisiológicas: fermenta o fermenta sólo débilmente, y es positivo a la sacarosa, la lactosa, el sorbitol, la glucosa, y negativo al levulinato.
Rango de crecimiento: La temperatura de crecimiento óptima es de 20 a 37°C.
- 10 Estas características son las mismas que las características de *Trichosporon sp.* que incluye *Trichosporon loubieri*, referido en un documento publicado (Wouter J. Middelhoven, Scorzetti Gloria y Jack W. Fell, *Trichosporon porosum* comb. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast inhabiting soil, related to the loubieri/laibachii group of species that assimilate hemicelluloses and phenolic compounds, FEMS Yeast Research, Vol. 1, 15-22 (2001)).
- 15 Las condiciones adecuadas para cultivo en masa de los microorganismos obtenidos anteriormente fueron examinadas para encontrar que es adecuado el cultivo en masa utilizando una jarra fermentadora de 10 L, con una temperatura óptima de 28 a 30°C y un pH óptimo es 6,0 a 7,0.
- 20 Los microorganismos de la presente invención descritos anteriormente se pueden utilizar independientemente o combinando dos o más para degradar las sustancias estrogénicas en las aguas residuales o el suelo.
- Con el fin de degradar sustancias estrogénicas en las aguas residuales utilizando el microorganismo de la presente invención, es preferible utilizar el microorganismo entre el tanque de sedimentación primario y el tanque de sedimentación final en un proceso de tratamiento de aguas residuales, en particular en una etapa de tratamiento secundario en un procedimiento de oxidación biológica. Cuando el microorganismo se utiliza en la etapa de tratamiento secundario, es más preferible un sistema de fijación y crecimiento del microorganismo en una superficie del cuerpo de soporte sólido que un sistema de suspensión del microorganismo en una solución, debido a que se puede evitar la pérdida del microorganismo y se puede obtener un líquido de cultivo con una concentración más alta fijando los microorganismos a la superficie de un cuerpo de soporte sólido.
- 25 En cuanto al cuerpo de soporte sólido para fijar y hacer crecer el microorganismo de la presente invención, se pueden proporcionar PVA poli(alcohol vinílico), celulosa porosa, y similares. La celulosa porosa se prefiere cuando se usa en la etapa de tratamiento secundario. Como método para inmovilizar el microorganismo en un cuerpo de soporte sólido, se proporcionan un método de unión-inmovilización utilizando polipropileno, cerámica y similares, un método de inmovilización por englobamiento tal como el método de congelación en PVA, y similares, siendo preferible el método de unión-inmovilización.
- 30 En el tratamiento de aguas residuales antes mencionado, el microorganismo de la presente invención se utiliza directamente suministrando directamente un caldo de cultivo, en el que se han desarrollado las células a una concentración de 10^8 a 10^9 células/mL mediante cultivo en masa, al tanque de tratamiento de aguas residuales o suministrando un vehículo sobre el que se ha inmovilizado el microorganismo al tanque de tratamiento. El portador en el que se ha inmovilizado el microorganismo (portador inmovilizador) se puede preparar introduciendo directamente una cantidad prescrita de portador a un recipiente de cultivo, tal como una jarra fermentadora o similar en el que el microorganismo ha sido cultivado en masa y operando continuamente el recipiente de cultivo durante dos o tres días mientras se agita para inmovilizar el microorganismo. El portador inmovilizador se retira del caldo de cultivo en el momento de suministrarlo al tanque de tratamiento y se introduce en el tanque de tratamiento.
- 35 Por otro lado, la degradación de las sustancias estrogénicas en el suelo utilizando el microorganismo de la presente invención se puede llevar a cabo mediante la centrifugación del microorganismo cultivado a una concentración de 10^8 a 10^9 células/ml por medio de cultivo en masa en una jarra fermentadora, suspendiendo las células en una solución salina fisiológica o similares, según se requiera, y esparciendo directamente la suspensión sobre el suelo contaminado para hacer que el microorganismo entre en contacto con el suelo. En este caso, el número de células del microorganismo de la presente invención que se va a esparcir sobre las zonas superficiales o excavada del suelo que se van a tratar se puede ajustar a aproximadamente 10^9 a 10^{10} células/metro³.
- 40 Con el fin de degradar eficazmente las sustancias estrogénicas utilizando el microorganismo de la presente invención se pueden utilizar, por ejemplo, un aparato equipado con un medio para soportar el microorganismo de la presente invención y un medio para hacer que el microorganismo entre en contacto con las aguas residuales o el suelo. Como ejemplos específicos de tal aparato, se pueden proporcionar biorreactores de tipo levantamiento por aire, una columna de tipo carga, o de tipo flujo de carga. Tal aparato puede utilizarse también durante la etapa de tratamiento secundario del procedimiento de tratamiento de aguas residuales para degradar eficazmente sustancias estrogénicas en las aguas residuales o el suelo.
- 45 50 55 60

EJEMPLOS

La presente invención se explicará con más detalle por medio de ejemplos que no pretenden ser limitantes de la presente invención.

Ejemplo 1**Separación del microorganismo que degrada la sustancia estrogénica****(1) Cultivo de enriquecimiento**

Los medios de cultivo MDG siguientes 1 a 4 se cargaron en tubos de ensayo, cada uno en una cantidad de 10 ml, y se añadió 17 β -estradiol como sustancia estrogénica para proporcionar una concentración de 0,1%, para obtener grupos de medios de cultivo de enriquecimiento, consistiendo un grupo de cuatro medios. Se añadió a cada tubo de ensayo 1 mL de lodo activado o lodo de retorno obtenido de cada uno de los procedimientos de tratamiento de aguas residuales para la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Fushimi (indicada por F: Kyoto-shi, Kyoto), la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Tarumi (indicada por TM: Kobe-shi, Hyogo), la Planta de Tratamiento de Tamagawa-joryu (indicada por TJ: Akishima-shi, Tokyo), el Centro de Tratamiento de Morigasaki (indicado por M: Ota-ku, Tokio), la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Northern Second (indicada por H: Yokohama-shi, Kanagawa), el Centro Medioambiental de Todoroki (indicado por A: Kawasaki-shi, Kanagawa), y la Planta de Tratamiento de Tachikawa-Fujimi (indicada por el TT: Tachikawa-shi, Tokio) para preparar 56 soluciones de medio de cultivo de enriquecimiento. Estas soluciones de medio de cultivo de enriquecimiento se cultivaron mediante movimiento oscilatorio a 28°C durante una semana.

Después de la terminación de la incubación, se extrajo 1 ml de la solución de cultivo a partir del caldo de cultivo y se añadió a un tubo de ensayo junto con 10 ml de medio MDG de nueva aportación, y se cultivó durante una semana. Esta operación se repitió cinco veces para cultivar de forma continua los microorganismos a lo largo de cinco generaciones.

TABLA 3

	Medio MGD 1	Medio MGD 2	Medio MGD 3	MGD Medio 4
K ₂ HPO ₄ (g/L)	3,5	3,5	3,5	3,5
KH ₂ PO ₄	1,5	1,5	1,5	1,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	0,5	0,5	0,5
NaCl	0,5	0,5	0,5	0,5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,15	0,15	0,15	0,15
Elementos traza (mL/ L)	1,0	1,0	01:00	1,0
Extracto de levadura	0,005	0,005	-	-
pH	6,0	7,0	6,0	7,0

TABLA 4

Elementos traza	
NaHCO ₃ · 10H ₂ O	2,0
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0,3
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,2
(NH ₄) Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0,02
CuSO ₄ · H ₂ O	0,1
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,05
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,5

(2) Aislamiento y escrutinio primario del microorganismo

5 Después del cultivo de enriquecimiento en el apartado (1) anterior, se colocaron 100 µL de cada una de las soluciones de cultivo en una placa de Petri que contenía un medio de cultivo ISP (Difco 277010), medio de cultivo R₂A (Difco 218.263), o medio de cultivo YM (Difco 271120: todo fabricado por Difco) para cultivar los microorganismos, con el fin de aislar colonias individuales en cada cultivo inclinado.

10 Se añadieron 4 g de extracto de levadura, 10 g de extracto de malta, y 4 g de dextrosa a 1 L del medio ISP anterior, y la mezcla se ajustó a pH 7,2. Se añadieron 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de peptona proteosa, 0,5 g de casaminoácido, 0,5 g de dextrosa, 0,5 g de almidón soluble, 0,3 g de piruvato sódico, 0,3 g de difosfato de potasio, y 0,05 g de sulfato de magnesio a 1 L del medio R₂A anterior, y la mezcla se ajustó a pH 7,2. Se añadieron 3 g de extracto de levadura, 3 g de extracto de malta, 5 g de peptona, y 10 g de dextrosa a 1 L del medio YM anterior, y la mezcla se ajustó a pH 6,2.

15 Además, junto con el aislamiento de los microorganismos, la solución de cultivo de enriquecimiento obtenida en el apartado (1) anterior se analizó mediante el desarrollo directo en un cromatógrafo de capa fina (TLC) para seleccionar el caldo de cultivo que consumió el substrato 17β-estradiol (en lo sucesivo referido vez en cuando como "E2") (Escrutinio primario). La TLC se hizo funcionar bajo las siguientes condiciones.

- 20 (Condiciones cromatográficas)
 Placa TLC utilizada: MERCK (Núm. 13727)
 Disolvente de desarrollo: etanol-benceno (1:9)
 Cantidad de disolvente de desarrollo: 5 ml
 Tiempo de desarrollo: alrededor de 16 minutos/10 cm
 25 Cantidad de muestra: 5 µL
 Reactivo colorante: Dicromato de potasio y ácido sulfúrico (cuando sea necesario)

30 La actividad degradante de E2 y el número de provisiones de partida aisladas cuando se desarrolló cada solución de cultivo de enriquecimiento en la TLC se muestran en las Tablas 5 y 6.

La actividad degradante se evaluó de acuerdo con la siguiente norma.

(Evaluación)	(Contenido)
O: Fuerte actividad degradante	(Sin manchas de E2)
Δ: Actividad degradante comparativamente fuerte	(Presencia de manchas muy finas de E2)
En blanco: No hay actividad degradante	(Presencia de manchas de E2)

TABLA 5-1

Planta de la que se recogen los lodos (Abreviatura)	Tipo de lodos	pH del medio	Adición de extracto de levadura	Símbolo	Actividad de degradación	Número de poblaciones separadas	El número total de provisiones de partida	
Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Fushimi (F)	Lodos activados	7	-	FA		14	35	64
		7	+	FB		13		
		6	-	FE		4		
		6	+	FF	O	4		
	Lodos de retorno	7	-	FI		12	29	
		7	+	FJ		6		
		6	-	FM		5		
		6	+	FN		6		
Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Tarumi (TM)	Lodos activados	7	-	TMA		6	26	60
		7	+	TMB		8		
		6	-	TME		5		
		6	+	TMF		7		
	Lodos de retorno	7	-	TMI	O	12	34	
		7	+	ATM	O	13		
		6	-	TMM	Δ	4		
		6	+	RGT	O	5		
Planta de Tratamiento Tamagawajoryu (TJ)	De lodos activados	7	-	TJA		5	21	49
		7	+	TJB		8		
		6	-	TJE		6		
		6	+	TJF		2		
	Lodos de retorno	7	-	TJI		11	28	
		7	+	TJJ		9		
		6	-	TJM		4		
		6	+	TJN		4		

TABLA 5-2

Centro de Tratamiento de Morigasaki (M)	Lodos activados	7 -	MA		14	32	59
		7 +	MB		9		
		6 -	ME		3		
		6 +	MI		6		
	Lodos de retorno	7 -	MI		7	27	
		7 +	MJ		11		
		6 -	MM	O	3		
		6 +	Minnesota		6		

TABLA 6

Planta de la que se recogen los lodos (Abreviatura)	Tipo de lodos	pH del medio	Adición de extracto de levadura	Símbolo	Actividad de degradación	Número de poblaciones separadas	Número total de provisiones de partida	
Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Northern Second (H)	Lodos activados	7	-	HA		7	25	53
		7	+	HB		9		
		6	-	HE		3		
		6	+	HF		6		
	Lodos de retorno	7	-	Hawai		8	28	
		7	+	HJ		10		
		6	-	HM		3		
		6	+	HN		7		
Centro Medioambiental de Todoroki (A)	Lodos activados	7	-	TOA	O	12	35	67
		7	+	TOB		14		
		6	-	TOE		5		
		6	+	TOF		4		
	Lodos de retorno	7	-	TOI	O	12	32	
		7	+	TOJ		10		
		6	-	TOM		3		
		6	+	TON	O	7		
Planta de Tratamiento de Tachikawa-Fujimi (TT)	Lodos activados	7	-	TAA	Δ	14	35	67
		7	+	TAB		13		
		6	-	TAE		6		
		6	+	TAF		2		
	Lodos de retorno	7	-	TAI	O	14	32	
		7	+	TAJ	O	11		
		6	-	TAM		4		
		6	+	TAN		3		

5 Como resultado del escrutinio inicial, se encontró que el 17β-estradiol se degradó en las soluciones de cultivo de enriquecimiento de FF, TMI, TMJ, TMM, TMN, MM, TOA, TOI, TON, TAA, TAI, y TAJ, y se seleccionaron un total de 111 provisiones de partida separadas de las soluciones de cultivo de enriquecimiento.

(3) Escrutinio secundario

10 Las 111 provisiones de partida seleccionadas en el escrutinio primario del apartado (2) anterior se cultivaron usando 17β-estradiol como sustrato para seleccionar las cepas que producen un caldo de cultivo que contiene sólo una pequeña cantidad de 17β-estradiol residual de acuerdo con el siguiente procedimiento.

15 Las 111 poblaciones de microorganismos se cultivaron mediante cultivo en estría utilizando una placa de agar YM. Se inoculó la cantidad de un asa de siembra del caldo de cultivo en cada solución de cultivo al que se añadió 17β-estradiol para proporcionar una concentración de 100 mg/L. Al cabo de un día, la cantidad total del caldo de cultivo de crecimiento se extrajo mediante una columna en fase sólida C18 (fabricada por Waters) y se aplicó en la TLC para seleccionar 23 microorganismos en los que se había degradado completamente el 17β-estradiol.

(4) Escrutinio ternario

5 Con el fin de seleccionar las poblaciones que pueden degradar 17 β -estradiol más rápidamente y para examinar su capacidad en la degradación de otras sustancias estrogénicas naturales (estrone, estriol), se llevó a cabo el siguiente experimento utilizando las 23 provisiones de partida seleccionadas en el escrutinio secundario del apartado (3) anterior .

10 Las 23 provisiones de partida de microorganismos se cultivaron mediante cultivo en estría utilizando una placa de agar YM, seguido del cultivo utilizando tubos de ensayo de la misma manera que en el escrutinio primario. El cultivo se terminó en 0, 3, 5, 8, o 24 horas después del comienzo, seguido inmediatamente de extracción en fase sólida. A continuación, la cantidad total del caldo de cultivo se mantuvo en una columna en fase sólida C18 (fabricada por Waters), seguido de elución con metanol. Una sustancia sustituta (17 β -estradiol-d₄) se añadió a una cantidad apropiada del eluato. La mezcla se secó hasta un estado sólido mediante una corriente de nitrógeno y se hizo reaccionar con BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida) para inducir un compuesto trimetilsililado (compuesto de TMS). Después de secar de nuevo hasta un estado sólido mediante una corriente de nitrógeno, el sólido se disolvió en n-hexano y la solución muestra se analizó utilizando un cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Se midió la concentración de sustancias estrogénicas después del cultivo durante diferentes periodos de tiempo para determinar la cantidad degradada. Las condiciones del análisis GC-MS se muestran en la Tabla 7.

20

TABLA 7

GC		Agilent 6890	
	Columna	HP-5 (30 mx 0,32 mm d.i., película 0,25 m	espesor, Agilent)
	Gas portador	Él, 1,5 ml / min	
	Temp. Horno	150°C (2 min)→ 50°C/min → 250°C → 5°C/min → 300°C	(15 min)
	Inyección	método Splitless (1 min de tiempo de purgado)	
	Volumen de inyección 1	μ L	
	Temp. del Inyector	280°C	
	Interfaz	temperatura 300°C	
MS		JEOL JMS-700	
	Resolución de masa	1000	
	Tensión del Detector	1,0 kV	
	Modo de funcionamiento	SIM	
	Seguimiento de iones	TMS-17 β -estradiol	416 (m / z)
		TMS-estrone	342 (m / z)
		TMS-estriol	504 (m / z)
		TMS-17 β -estradiol d ₄	420 (m / z)
	Frecuencia de muestreo	50 (ms)	

25 Como resultado de la detección, se seleccionaron nueve poblaciones que pueden degradar 65% o más de 17 β -estradiol en cinco horas. Los cambios a lo largo del tiempo de las cantidades residuales de 17 β -estradiol, estrone, y estriol después de la degradación por la cepa TAA-I3, la cepa TAI-I5, y la cepa FF-Y2 entre los microorganismos seleccionados se muestran en la FIG. 1 a la FIG. 3, y la proporción residual (%) de cada sustancia estrogénica después de cinco horas en soluciones tratadas con cada una de la nueve cepas se muestra en la Tabla 8.

TABLA 8

	Tiempo después del inicio del experimento	17 β -estradiol (E2)	Estrona (E1)	Estriol (E3)
TAA-I3	5 h	18%	15%	18%
TAI-I5	5 h	10%	8%	10%
ATM-I1	5 h	15%	10%	16%
TMN-Y2	5 h	18%	20%	17%
FF-Y2	5 h	5%	8%	12%

Ejemplo 2**5 Identificación de microorganismos que tienen la capacidad de degradar la sustancia estrogénica (1) Identificación de la cepa mediante la secuencia de ADNr 16S**

Se preparó un árbol filogenético usando la secuencia de ADNr 16S o 18S de nueve poblaciones de microorganismos que degradan sustancias estrogénicas que han sido seleccionados por medio del escrutinio ternario de acuerdo con el siguiente procedimiento para llevar a cabo identificación de la cepa.

(A) Extracción de ADN del microorganismo

Se extrajo el ADN utilizando el método del cloruro de bencilo de cada uno de los microorganismos del cultivo puro de las anteriores nueve cepas. Los microorganismos se cultivaron usando medio de agar inclinado YM a 30°C durante tres días. Se añadieron 250 μ L de una solución tampón de extracto de ADN (Tris-HCl de 100 mmol/L, EDTA de 40 mmol/L, pH 9,0), 200 μ l de cloruro de bencilo, y 50 μ l de SDS al 10% a cada uno de los microorganismos recogidos, y la mezcla se sacudió vigorosamente a 50°C durante 30 minutos. Después de añadir 150 μ L de acetato de sodio de 3 moles/L, la mezcla se centrifugó y el líquido sobrenadante se transfirió a un tubo separado, seguido de precipitación con isopropanol, lavado con etanol del 70%, y secado al aire. El sólido resultante se disolvió en 100 μ l de solución de tampón TE (Tris-HCl de 10 mmol/L de (pH 8,0), EDTA de 1 mmol/L).

(B) Reacción de amplificación mediante PCR de ADNr 16S o 18S

Se utilizaron los siguientes 8F y 15R como cebadores de amplificación de 16S, y se utilizaron Y1F e Y1770R como cebadores de amplificación de 18S. Un total de 50 μ L de una solución de reacción que contenía 10 mmol/L de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mmol/L de KCl, 1,5 mmol/L de MgCl₂, 200 μ L de una mezcla de dNTP, 1U de ADN polimerasa Taq (fabricada por Takara Co., Ltd.), 50 ng de ADN, y 0,4 mmol/cebador de amplificación se sometieron a una reacción PCR de 25 ciclos utilizando un ciclador térmico de ADN PTC200 (fabricado por MJ Research), consistiendo un ciclo de una reacción durante 20 segundos a 94°C, 15 segundos a 55°C, y 180 segundos a 72°C. El producto de amplificación se purificó utilizando Microcon-PCR (fabricado por Millipore).

<Cebadores de amplificación>

8F: (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')
 15R: (5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3')
 Y1F: (5'-TATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3')
 Y1770R: (5'-CTACGGAAACCTTGTACGAC-3')

(C) Determinación de la secuencia de ADNr 16S o 18S

La secuencia de bases del ADNr 16S o 18S fue descodificada mediante el secuenciador ABI PRISM 373A (fabricado por ABI) utilizando ABI PRISM™ Dye Terminator Kit (fabricado por Perkin Elmer). Los cebadores utilizados para la descodificación del ADN 16S y 18S se muestran en la Tabla 9. Se utilizó Auto Assembler™ (Fabricado por Perkin Elmer) para el alineamiento de secuencias.

TABLA 9

Cebador Núm.	Secuencia (5'... 3')
(Para 168)	
8F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG

Cabador Núm.	Secuencia (5' ... 3')
520F	CAGGAGTGCCAGCAGCCGCGG
930F	CAAGCGGTGGAGCATGTGG
1100F	CAGGAGCAACGAGCGCAACCC
520R	ACCGCGGCTGCTGGC
800R	GGACTACCAGGGTATCTAAT
1100R	AGGGTTGCGCTCGTTG
15R	AAGGAGGTGATCCARCCGCA
(Para 18S)	
Y1F	TATCTGGTTGATCCTGCCAGT
Y380F	CCGGAGAGGGAGCCTGAG
Y430R	TTTGCGCGCCTGCTGCCTT
Y570F	AGCCGCGGTAATTCCAGC
Y820R	CGTCCTATTCTATTATTCCATGC
Y970F	AAGAACGAAAGTTAGGGGATC
Y1200R	CTTTCCCCGTGTTGAGTCAA
Y1430F	AGGTCTGTGATGCCCTTAGA
Y1580R	CGCTTACTAGGAATTCCTCGTT
Y1770R	CTACGAAACCTTGTTACGAC

(D) Análisis filogenético de las secuencias de ADNr 16S o 18S

5 Se llevó a cabo el análisis filogenético de la evolución molecular utilizando un programa de soporte lógico de análisis filogenético (Clustal X) usando la secuencia de ADNr 16S o 18S obtenida anteriormente y la secuencia de bases de ADNr 16S de bacterias relacionadas obtenidas a partir de una base de datos de genes tales como DDBJ.

(E) Resultados de la identificación

10 Las secuencias se determinaron utilizando la secuencia de ADNr 18S para las cepas que se consideraron que eran levadura de la forma bacilo, y utilizando la secuencia de ADNr 16S para otras cepas. Se llevó a cabo la búsqueda de homología de la secuencia determinada con la secuencia sobre la base de datos para encontrar que, entre las 23 cepas separadas, cuatro cepas pertenecen al grupo con alto contenido en G + C gram-positivo, una cepa pertenece a α -Proteobacteria, dos cepas pertenecen de β -Proteobacteria, y dos cepas son levaduras (Figura 10).
 15 un árbol filogenético para cada grupo (FIG. 4 a FIG. 7).

TABLA 10

Plantas para las que se recogen los lodos		Microorganismo Separado Núm.	Resultado de la identificación	Grupo de clasificación Superior
Planta de Tratamiento de Tachikawa-Fujimi	Lodos activados	TAA-I3	<i>Pseudaminobacter salicylatoxidans</i>	α
	Lodos de retorno	TAI-I5	<i>Gordonia terrae</i>	H
Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Tarumi	Lodos de retorno	ATM-I1	<i>Zoogloea sp.</i>	β
		TMN-Y2	<i>Cryptococcus sp.</i>	Y
Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Fushimi	Lodos activados	FF-Y2	<i>Trichosporon loubieri</i>	Y

R: Subdivisión α de Proteobacteria
 β : Subdivisión β de Proteobacteria
H: Bacterias con alto contenido en G + C gram positivas
Y: Levadura

Ejemplo 3

5 Degradación de la sustancia estrogénica utilizando lodos activados

El lodo activado bruto se obtuvo de una planta de eliminación de aguas residuales que funciona en la actualidad para medir la actividad de la cepa TAI-I5 de *Gordonia terrae*, que se considera que tiene una fuerte actividad de degradación de la sustancia estrogénica y que tiene un nivel relativamente alto de seguridad.

10 (1) Selección del portador para la inmovilización de microorganismos

Se obtuvieron portadores para la inmovilización de microorganismos disponibles en el mercado para examinar cómo la cepa TAI-I5 se adhiere a cada portador. Se utilizaron polipropileno, cerámica, alúmina-sílice, y carbón activado fijado con poli(alcohol vinílico) como material del portador inmovilizador. En primer lugar, el microorganismo de la cepa TAI-I5 se cultivó en masa en una jarra fermentadora a una concentración de 10^7 células/ml. Después, los portadores anteriores, cada uno en una cantidad de aproximadamente 150 g, se añadieron a 1 L de la solución de cultivo, seguido por agitación durante 24 horas para inmovilizar la cepa TAI-I5 en cada uno de los portadores. Al cabo de 24 horas, los portadores se retiraron y, después de eliminar el agua utilizando un papel de filtro, se midió su peso. A continuación, los portadores se pusieron en una solución salina fisiológica, se agitaron suficientemente usando un mezclador de vórtice, y se trataron con ultrasonidos durante cinco minutos para hacer eluir la cepa TAI-I5 de los portadores. Este eluato se diluyó apropiadamente con una solución salina fisiológica y se aplicó a un medio de agar (placa Petri) preparado a partir de un medio de cultivo YG (Tabla 11) para incubarlo a 28°C. Se midió el número de células vivas por unidad de peso de los portadores. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

TABLA 11

Componente	Cantidad
D (+)-Glucosa	10 g / L
Polipeptona	5,0 g / L
Extracto de levadura	5,0 g / L
K ₂ HPO ₄	2,0 g / L
KH ₂ PO ₄	1,0 g / L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g / L
pH	7,0

TABLA 12

Material	Dimensiones (mm)	Peso específico	Células vivas (células / g)
Polipropileno	φ4	0,98	$1,2 \times 10^9$
Cerámica	φ6	>1	$7,8 \times 10^6$
Alúmina-sílice	φ12	>1	$2,2 \times 10^6$
Carbón activado inmovilizado con PVA	φ10	>1	$6,6 \times 10^8$

5 Como resultado de la prueba de inmovilización, se encontró que el portador de polipropileno inmovilizaba mejor la cepa TAI-I5 entre los portadores disponibles en el mercado.

(2) Prueba de eficacia utilizando un portador para la inmovilización de microorganismos

10 Se preparó un portador de polipropileno con la cepa TAI-I5 inmovilizada sobre el mismo de la misma manera que en el apartado (1) anterior, y se examinó su actividad de degradación de 17β-estradiol usando los lodos activados de una planta de eliminación que funciona en la actualidad en la Prefectura de Ibaraki.

15 El portador de polipropileno se esterilizó a 121°C durante 10 minutos y se cargó en una solución de la cepa TAI-I5, cultivada a una concentración de 10^7 células/mL, en una cantidad de 150 g/L. La mezcla se incubó durante 24 horas mientras se agitaba para inmovilizar los microorganismos de la cepa TAI-I5 sobre el portador de polipropileno. El portador para la inmovilización del microorganismo resultante se añadió a un tanque de aireación en una cantidad de 50 g por 1 litro de lodo.

20 Se añadió 17β-estradiol al depósito de lodo que contenía el soporte de polipropileno para proporcionar una concentración de 17β-estradiol de 0,1 mg/l, y se midió la concentración al cabo de ocho horas. Los resultados se muestran en la Tabla 13. La concentración después de ocho horas indica que se degradó casi el 100% del 17β-estradiol añadido.

TABLA 13

Núm. de Experimento	Concentración inicial mg/L	Concentración al cabo de ocho horas µg/L	Tasa de eliminación (%)
1	0,098	0,15	99,8
2	0,10	0,082	99,9
3	0,099	0,055	99,9
4	0,095	0,55	99,4
5	0,091	0,14	99,8

25 **Aplicabilidad industrial**
Una microorganismo que degrada sustancias estrogénicas de la presente invención puede degradar rápida y eficazmente una sustancia estrogénica.

30 Por lo tanto, la sustancia estrogénica contenida en las aguas residuales domésticas, las aguas residuales vertidas de una explotación ganadera, o similares puede ser degradada rápida y eficazmente por medio del uso del microorganismo.

35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

40 La FIG. 1 es un dibujo que muestra el cambio en la cantidad residual de 17β-estradiol a lo largo del tiempo.
La FIG. 2 es un dibujo que muestra el cambio en la cantidad residual de estrona a lo largo del tiempo.
La FIG. 3 es un dibujo que muestra el cambio en la cantidad residual de estriol a lo largo del tiempo.
La FIG. 4 muestra un árbol filogenético de la cepa separada y la cepa que pertenece a un grupo con alto contenido de G + C gram positivo estrechamente relacionado con la cepa separada, preparado en base a sus secuencias de bases de ADNr 16S (alrededor de 1450 bases) utilizando el método del vecino más próximo

(los números indican los valores Bootstrap obtenidos mediante la repetición de 100 veces y una barra en el extremo inferior izquierdo indica una distancia de sustitución de bases de 5%).

La FIG. 5 muestra un árbol filogenético de la cepa separada y la cepa perteneciente a la subdivisión α de *Proteobacteria* estrechamente relacionada con la cepa separada, preparada en base a sus secuencias de bases del ADNr 16S (alrededor de 1450 bases) utilizando el método del vecino más próximo (los números indican los valores Bootstrap obtenidos mediante la repetición de 100 veces y una barra en el extremo inferior izquierdo indica una distancia de sustitución de bases de 5%).

La FIG. 6 muestra un árbol filogenético de la cepa separada y la cepa perteneciente a la subdivisión β de *Proteobacteria* estrechamente relacionada con la cepa separada, preparada en base a sus secuencias de bases del ADNr 16S (alrededor de 1450 bases) utilizando el método del vecino más próximo (los números indican los valores Bootstrap obtenidos mediante la repetición de 100 veces y una barra en el extremo inferior izquierdo indica una distancia de sustitución de bases de 5%).

La FIG. La figura 7 muestra un árbol filogenético de la cepa separada y la levadura y estrechamente relacionada con la cepa separada, preparada en base a sus secuencias de bases del ADNr 18S (alrededor de 1750 bases) utilizando el método del vecino más próximo (los números indican los valores Bootstrap obtenidos mediante la repetición de 100 veces y una barra en el extremo inferior izquierdo indica una distancia de sustitución de bases de 3%).

LISTA DE SECUENCIAS

- 20 <110> Kabushiki Kaisha Yakult Honsha
Dirección General del Ministerio del Territorio, Infraestructuras y Transportes, Instituto Nacional para el Territorio y la Gestión de Infraestructuras
- 25 <120> Microorganismo para la descomposición de estrógenos y su utilización
<130> PF-060002-WO
<150> JP2005-46392
<151> 2005-02-23
<160> 18
<170> PatentIn version 3.1
- 30 <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> 8F
<400> 1
agagtttgat cmtggctcag
20
- 40 <210> 2
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> 520F
<400> 2
caggagtgcc agcagccgcg g
21
- 45 <210> 3
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial
- 50 <220>
<223> 930F
<400> 3
caagcgggtgg agcatgtgg
19
- 55 <210> 4
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> 1100F

<400> 4

caggagcaac gagcgcaacc c
21

5

<210> 5
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> 520R
<400> 5

accgcggctg ctggc
15

10

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> 800R
<400> 6

15

ggactaccag ggtatctaata
20

20

<210> 7
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> 1100R
<400> 7

25

agggttgccg tcgctg

16

30

<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> 15R
<400> 8

35

aaggaggtga tccarccgca
20

40

<210> 9
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Y1F
<400> 9

tatctgggtg atcctgccag t
21

45

<210> 10
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Y380F

50

<400> 10

ccggagaggg agcctgag
18

5

<210> 11
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Y430R
<400> 11

tttgcgcgcc tgctgcctt
19

10

<210> 12
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Y570F
<400> 12

agccgcggta attccagc
18

15

20

<210> 13
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Y820R
<400> 13

cgtcctattc tattattcca tgc
23

25

30

<210> 14
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Y970F
<400> 14

aagaacgaaa gttaggggat c
21

35

40

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Y1200R
<400> 15

ctttccccgt gttgagtcaa
20

45

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Y1430F

<400> 16

aggtctgtga tgccttaga

20

<210> 17

<211> 22

5

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Y1580R

<400> 17

cgcttactag gaattcctcg tt

22

10

<210> 18

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Y1770R

<400> 18

ctacggaaac cttgttacga c

21

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo que degrada sustancias estrogénicas en el que el microorganismo es uno o más microorganismos pertenecientes al grupo siguiente:
- 5 *Pseudaminobacter salicylatoxidans* cepa TAA-I3 (FERM BP-10519)
 Gordonia terrae cepa TAI-I5 (FERM BP-10521)
 Zoogloea sp. cepa ATM-I1 (FERM BP-10523)
 Cryptococcus sp. cepa TMN-Y2 (FERM BP-10525)
10 *Trichosporon loubieri* cepa FF-Y2 (FERM BP-10526),
 y que tiene la capacidad para degradar una sustancia estrogénica seleccionada entre 17β-estradiol, estrona y
 estriol.
2. Un método para degradar biológicamente una sustancia estrogénica seleccionada entre 17β-estradiol, estrona, y
15 estriol utilizando el microorganismo de la reivindicación 1.
3. El método para degradar una sustancia estrogénica acuerdo con la reivindicación 2, aplicado para degradar una
 sustancia estrogénica en las aguas residuales o el suelo.
4. El método para degradar una sustancia estrogénica acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que se utiliza un
20 microorganismo que degrada una sustancia estrogénica fijado a y desarrollado sobre la superficie de un cuerpo de
 soporte sólido.
5. El uso de la microorganismo que degrada sustancias estrogénicas en la reivindicación 1 para degradar una
25 sustancia estrogénica seleccionada entre 17β-estradiol, estrona y estriol.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que se emplea un aparato para degradar una sustancia
 estrogénica, que comprende
- i. un medio para soportar el microorganismo que degrada sustancias estrogénicas y
- 30 ii. un medio para hacer que el microorganismo entre en contacto con las aguas residuales o el suelo.

FIG. 1

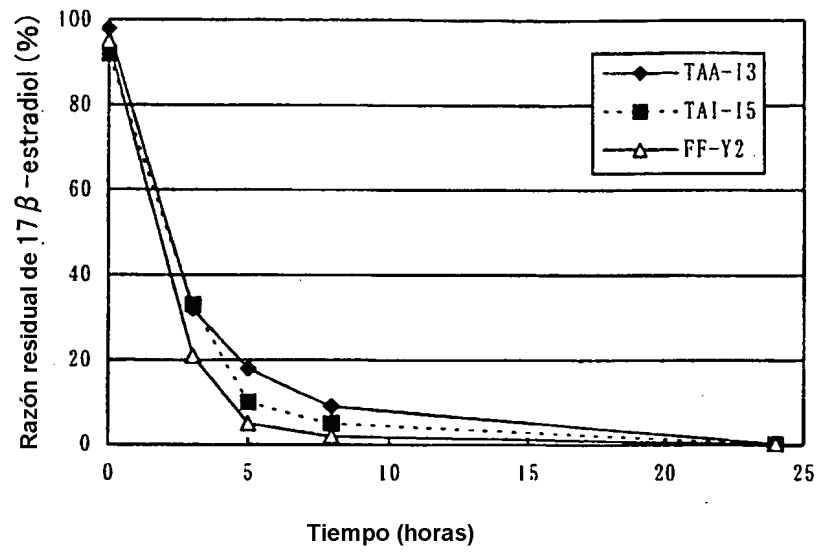


FIG. 2

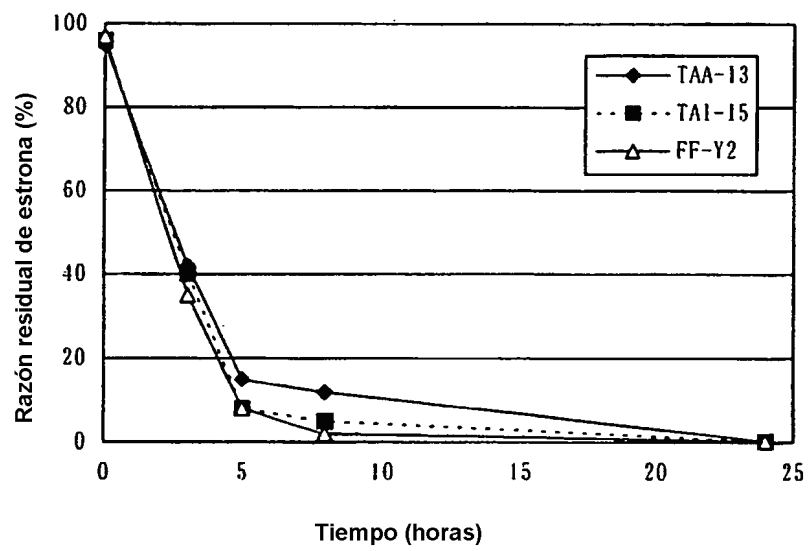


FIG. 3

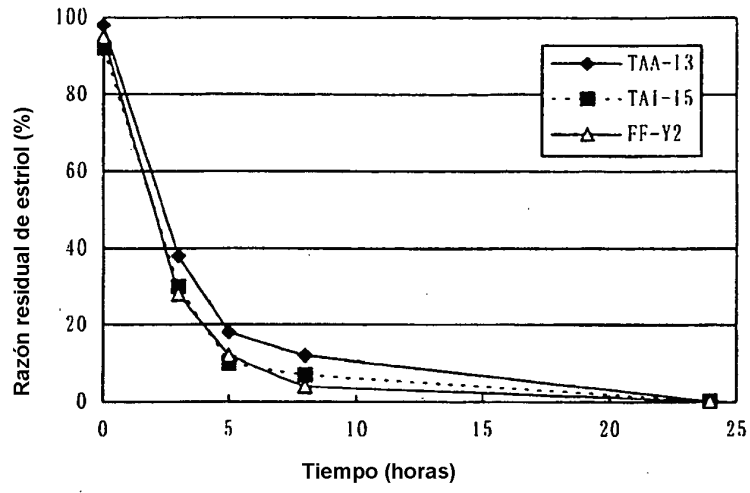


FIG. 4

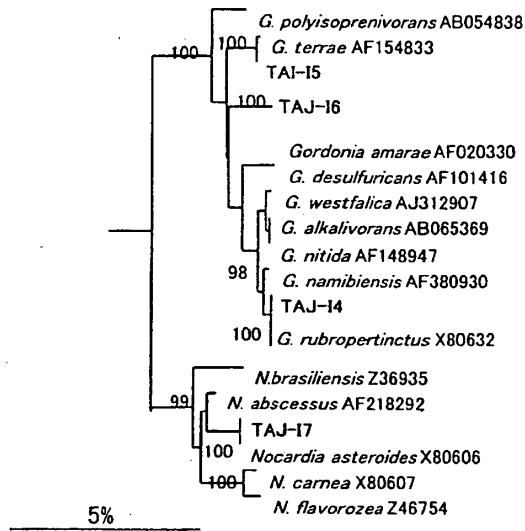


FIG. 5

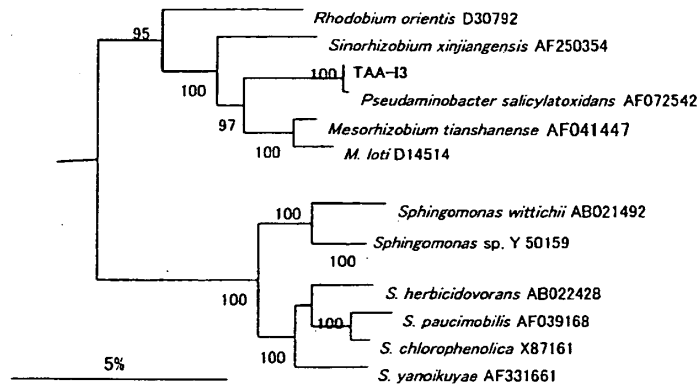


FIG.6

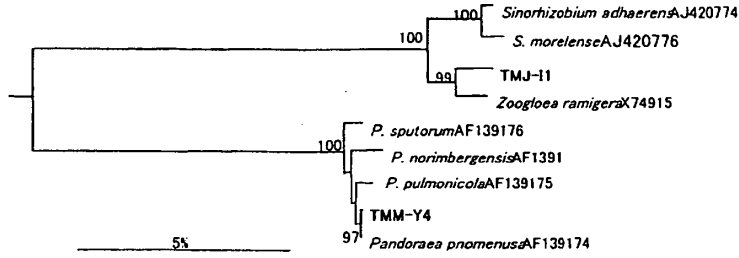


FIG.7

