

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 743**

21 Número de solicitud: 201130630

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C02F 3/34** (2006.01)

**C12R 1/39** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **19.04.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**16.11.2012**

71 Solicitante/s:  
**BIO-ILIBERIS RESEARCH AND DEVELOPMENT  
S.L. (100.0%)**  
Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud,  
Edificio BIC, Avda. de la Innovación, 1  
18100 Armilla, Granada, ES

72 Inventor/es:  
**ROCA HERNÁNDEZ, Amalia y  
SOLANO PARADA, Jennifer**

74 Agente/Representante:  
**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **MICROORGANISMOS CAPACES DE HIDROLIZAR LÍPIDOS Y SU UTILIZACIÓN EN  
DEPURACIÓN DE AGUAS.**

57 Resumen:

Microorganismos capaces de hidrolizar lípidos y su  
utilización en depuración de aguas.

Se ha aislado e identificado una cepa de  
*Pseudomonas fluorescens* con actividad lipídica y  
proteolítica, capaz de formar biopelículas sobre  
soportes plásticos y resistente a lejía y detergentes,  
útil en la depuración de aguas residuales urbanas,  
industriales y agrícolas.

ES 2 390 743 A1

## DESCRIPCIÓN

Microorganismos capaces de hidrolizar lípidos y su utilización en depuración de aguas.

### CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se relaciona con una cepa de *Pseudomonas fluorescens* con actividad lipídica y proteolítica, capaz de formar biopelículas sobre soportes plásticos y resistente a lejía y detergentes. También se relaciona con sus aplicaciones en la depuración de aguas residuales urbanas, industriales y agrícolas.

### 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La preservación del medio ambiente es de gran importancia para la humanidad y ha cobrado gran relevancia para los gobiernos en la última década. Una de las acciones para preservar el medio ambiente consiste en reemplazar una amplia serie de compuestos químicos empleados en diferentes procesos por enzimas microbianas, ya que éstas son biodegradables y por lo tanto tienen un menor impacto sobre el medio ambiente.

Entre las enzimas de interés industrial las lipasas y proteasas, entre otras, ocupan un lugar preferente debido a su estabilidad frente a disolventes orgánicos, su especificidad de sustrato y su enantioselectividad.

Las lipasas catalizan la hidrólisis de los lípidos liberando ácidos grasos y glicerol [Ferrato F, Carriere F, Sarda L, Verger R. (1997) A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. *Method Enzymo.* 286:327–347; Arpigny JL, Jaeger KE. (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* 343:177–183], y las proteasas atacan los enlaces peptídicos degradando las proteínas [Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:597-635].

El uso de estas enzimas en la industria es muy variado e incluyen la industria agroalimentaria, peletera, cosmética, farmacéutica, síntesis de edulcorantes, elaboración de detergentes, síntesis de biosurfactantes y tratamiento de aguas residuales.

Los procesos biológicos son predominantes en el tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales. Las proteínas, polisacáridos y lípidos son uno de los mayores problemas en los vertidos urbanos e industriales. Esto es particularmente relevante en las empresas del sector agroindustrial, mataderos, hoteles y restaurantes, que generan residuos con grandes cantidades de grasas y aceites. La alta concentración de grasa causa a menudo problemas en los procesos de depuración del agua, ya que la grasa flota en la superficie del

agua creando una capa que disminuye la transferencia de oxígeno y afecta los procesos aerobios. Por ello, es imprescindible hacer una separación previa de este tipo de compuestos. Frecuentemente la separación de grasas, aceites y proteínas se realiza mediante procesos físicos, entre los que se incluye la decantación; sin embargo, estos procesos requieren una  
5 recogida posterior de estos residuos lo que aumenta su coste.

La adición de lipasas de origen microbiano es una alternativa menos costosa, además de ser más eficaz y ecológica, ya que el proceso biológico convierte estos residuos en dióxido de carbono, agua y biomasa, la cual se puede reutilizar tras secado como enmendante orgánico [Bhumibhamon, A. Kopraserstak and S. Funthong. (2002) Biotreatment of high fat  
10 and oil wastewater by lipase producing microorganisms. Kasetsart J Nat Sci. 36: 261–267; Kaeberlein T, Lewis K, Epstein S. (2002) Isolating ‘‘uncultivable’’ microorganisms in a simulated natural environment. Science. 296:1127–1129].

Por lo tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de disponer de un método de tratamiento de aguas residuales que permita una fácil separación y/o eliminación de grasas,  
15 aceites y proteínas del agua a tratar, evitando el empleo del proceso físico de decantación y disminuyendo así el coste de todo el proceso.

## COMPENDIO DE LA INVENCION

Los inventores han aislado y caracterizado un microorganismo de la especie  
20 *Pseudomonas fluorescens*, denominado *P. fluorescens* BIRD-4 y depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) el 20 de enero de 2011 con número de acceso CECT 7850, que tiene capacidad de degradar lípidos y proteínas, lo que permite el empleo de dicho microorganismo en la eliminación de grasas y aceites, evitando así los inconvenientes asociados con el uso de técnicas físico-químicas en los procesos industriales que comprenden  
25 la eliminación de dichas grasas y aceites. Además, dicho microorganismo es capaz de formar una biopelícula sobre soportes sólidos, crecer en presencia de detergentes no iónicos y sobrevivir en presencia de hipoclorito sódico al 0,1%.

El aislamiento de un microorganismo como el proporcionado por esta invención [*P. fluorescens* BIRD-4 (CECT 7850)] se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito en los  
30 Ejemplos 1 y 2. Dicho microorganismo tiene actividad lipasa (Ejemplo 4) y proteasa (Ejemplo 6) así como capacidad para formar biopelículas sobre soportes sólidos (Ejemplo 3) y crecer en detergentes no iónicos (Ejemplo 5) y en presencia de concentraciones de lejía relativamente altas (Ejemplo 8).

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un microorganismo de la especie *Pseudomonas fluorescens* depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo con número de acceso CECT 7850, que tiene la capacidad de hidrolizar lípidos y proteínas, o un mutante de dicho microorganismo que mantiene dicha capacidad de hidrolizar lípidos y proteínas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un cultivo biológicamente puro de un microorganismo según la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un soporte sólido activo que comprende un soporte sólido y un microorganismo según la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la degradación microbiológica, en condiciones aeróbicas, de una grasa y/o un aceite en un medio acuoso, que comprende poner en contacto dicho medio acuoso que contiene una grasa y/o un aceite con un microorganismo o con un soporte sólido activo según la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la degradación microbiológica, en condiciones aeróbicas, de una proteína en un medio acuoso, que comprende poner en contacto dicho medio acuoso que contiene una proteína con un microorganismo o con un soporte sólido activo según la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la degradación microbiológica, en condiciones aeróbicas, de una grasa, un aceite y/o una proteína presente en un agua residual, que comprende:

- añadir un microorganismo según la invención a dicho agua residual a tratar, y, opcionalmente, repetir la aplicación de dicho microorganismo hasta la degradación total o parcial de la grasa, aceite y/o proteína presente en el agua residual a tratar; o alternativamente,
- añadir dicho agua residual a tratar un cultivo de un microorganismo según la invención, a una concentración de, al menos,  $10^3$  unidades formadoras de colonia (ufc) por litro de agua residual a tratar; o alternativamente,
- añadir a dicho agua residual a tratar un soporte sólido activo según la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la formación de una biopelícula como monocultivo de un microorganismo, que comprende la aplicación de una cantidad eficaz de un microorganismo según la invención a un cultivo que contiene un soporte sólido y un aceite como fuente de carbono o una fuente de proteínas como fuente de carbono y nitrógeno.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para el aislamiento de un microorganismo que tiene la capacidad de degradar lípidos (grasas y aceites) y proteínas, que comprende:

- 5 a) suspender una muestra de un suelo, en un medio de cultivo que carece de fuente de carbono;
- b) añadir a la suspensión obtenida en la etapa a) una fuente de carbono constituida por uno o más tipos de lípidos, una fuente de fósforo y una fuente de nitrógeno;
- c) incubar la suspensión resultante de la etapa b) bajo condiciones aeróbicas que permitan el crecimiento de microorganismos con capacidad para hidrolizar lípidos;
- 10 d) sembrar diluciones de la suspensión resultante de la etapa c) en placas de medio sólido;
- e) incubar las placas sembradas de la etapa d) durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 7 días a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C;
- f) aislar y purificar las colonias de los microorganismos, obtenidas en la incubación de la etapa e);
- 15 g) sembrar en placas de medio sólido diferencial las colonias de los microorganismos aisladas y purificadas en la etapa f), con el fin de seleccionar aquellos que presentan actividad lipolítica, en un medio de cultivo que contiene un lípido como sustrato, una fuente de carbono, una fuente de fósforo, una fuente de nitrógeno y un colorante fluorescente a luz ultravioleta; incubando las placas durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 7 días a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C, seleccionando aquellas que finalizado el periodo de incubación presentan un halo naranja fluorescente al ser expuesta a luz ultravioleta;
- 20 h) sembrar en placas de medio sólido diferencial las colonias de los microorganismos seleccionados en la etapa g), en un medio de cultivo que contiene leche desnatada como sustrato, una fuente de carbono, una fuente de fósforo y una fuente de nitrógeno, con el fin de analizar la actividad proteolítica, incubando las placas durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 7 días a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C, seleccionando aquellas que finalizado el periodo de incubación presentan un halo transparente; e
- 25 i) identificar las colonias que presentan actividad lipolítica y proteolítica, seleccionadas en la etapa g) y h).
- 30

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los inventores han aislado y caracterizado un microorganismo de la especie *Pseudomonas fluorescens*, denominado *P. fluorescens* BIRD-4 y depositado en la Colección Española de Cultivos tipo (CECT) el 20 de enero de 2011 con número de acceso CECT 7850, que tiene capacidad de degradar lípidos y proteínas y, adicionalmente, formar una biopelícula sobre soportes sólidos, crecer en presencia de detergentes no iónicos y resistir hasta 0,1% de hipoclorito sódico, lo que permite el empleo de dicho microorganismo en la eliminación de grasas y aceites, evitando así los inconvenientes asociados con el uso de técnicas fisicoquímicas en los procesos industriales que comprenden la eliminación de dichas grasas y aceites.

El aislamiento del microorganismo proporcionado por esta invención se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito en los Ejemplos 1 y 2. Brevemente, una muestra de 10 g de un suelo agrícola se suspendió en un medio mínimo M9 [Abril MA, Michan C, Timmis KN, Ramos JL. 1989. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. J Bacteriol. 171:6782-90], sin fuente de carbono, al que posteriormente se le añadió aceite de oliva hasta alcanzar una concentración del 1% (v/v). Tras incubar la suspensión resultante, se sembraron diluciones en placas de medio sólido de crecimiento general y se seleccionaron las colonias que presentaban una morfología macroscópica diferente. Todas las bacterias seleccionadas y purificadas se inocularon en un medio selectivo suplementado con aceite de oliva y rodamina B, tras lo cual, se seleccionaron las colonias que presentaron un halo fluorescente naranja. Cada una de las colonias seleccionadas como positivas fueron aisladas en cultivo axénico e identificadas mediante la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S (Ejemplo 1). Posteriormente, se analizó la capacidad de las bacterias aisladas de crecer en medio líquido con aceite de oliva o mantequilla como única fuente de carbono, lo que permitió aislar el microorganismo proporcionado por la presente invención (Ejemplo 2). Adicionalmente, se analizó la capacidad de dicho microorganismo de formar biopelículas sobre soportes sólidos (Ejemplo 3), se cuantificó su actividad lipasa (Ejemplo 4) y proteasa (Ejemplo 6), se evaluó su crecimiento en detergentes no iónicos (Ejemplo 5), su utilización de proteínas como única de fuente de carbono (Ejemplo 6), y se determinó la concentración mínima inhibitoria empleando hipoclorito de sodio comercial (Ejemplo 8). Como resultado, se identificó un microorganismo de la especie *P. fluorescens*, denominado *P. fluorescens* BIRD-4 y con número de depósito CECT 7850, que tiene capacidad de degradar o hidrolizar lípidos y proteínas y, adicionalmente, formar una biopelícula sobre soportes sólidos, crecer en presencia de detergentes no iónicos y sobrevivir en presencia de hipoclorito sódico al 0,1%. A

continuación, se describirá en detalle el microorganismo objeto de la invención junto con los distintos aspectos inventivos derivados del mismo.

## 1. MICROORGANISMO DE LA INVENCION

5 En un aspecto, la invención se relaciona con un microorganismo de la especie *Pseudomonas fluorescens* depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 7850, de aquí en adelante, microorganismo de la invención, que tiene la capacidad de hidrolizar lípidos y proteínas, o un mutante de dicho microorganismo que mantiene dicha capacidad de hidrolizar lípidos y proteínas.

10 La hidrólisis es una reacción que implica la rotura de enlaces químicos mediante la intervención de moléculas de agua, y puede ser ácida (cuando se realiza en presencia de soluciones ácidas fuertes, por ejemplo, HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, etc.), básica (cuando se produce en presencia de una solución básica, por ejemplo, NaOH, BaOH, etc.) o enzimática (cuando la reacción se lleva a cabo mediante enzimas (en general, denominadas “hidrolasas”).

15 En la presente invención se entiende por “capacidad de hidrolizar lípidos”, la capacidad de un microorganismo de romper los enlaces ésteres que unen los ácidos grasos a los alcoholes, por ejemplo, glicerina o glicerol. En el sentido utilizado en esta descripción el término “lípidos” incluye aceites, grasas, etc.

20 Asimismo, en la presente invención, se entiende por “capacidad de hidrolizar proteínas”, la capacidad de un microorganismo de romper los enlaces peptídicos que unen los aminoácidos dando lugar a oligopéptidos y a los propios aminoácidos libres. En el sentido utilizado en esta descripción el término “proteína” incluye tanto proteínas como péptidos en general (incluyendo oligopéptidos y polipéptidos).

25 La capacidad de un microorganismo de hidrolizar lípidos y proteínas puede ser determinada por cualquier procedimiento convencional de los conocidos en el estado de la técnica. Así, la capacidad de un microorganismo de hidrolizar lípidos puede comprobarse incubando dicho microorganismo en un medio líquido con aceite de oliva o mantequilla como única fuente de carbono y observando el crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo a lo largo del tiempo tal como se muestra en el Ejemplo 2, o, alternativamente,  
30 incubando el microorganismo en un medio sólido complejo que incorpora una emulsión de lípidos y un indicador identificado como “Rhodamina B” [Kouker G, Jaeger KE. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. Appl Environ Microbiol. 53: 211-3], tal como se seleccionan las bacterias en el Ejemplo 1.

Asimismo, la capacidad de un microorganismo de hidrolizar proteínas puede comprobarse incubando dicho microorganismo en un medio mínimo M9 [Abril et al., citado *supra*], con albúmina como única fuente de carbono o, alternativamente, incubando el microorganismo en un medio sólido complejo que incorpora una leche desnatada y observando la formación de un halo alrededor de la colonia bacteriana [Sokol PA, Ohman DE, Iglewski BH. 1979. A More Sensitive Plate Assay for Detection of Protease Production by *Pseudomonas aeruginosa* J Clin Microbiol. 9(4):538-40], tal como se muestra en el Ejemplo 7.

Como entiende el experto en la materia, dentro del concepto “microorganismo de la invención”, también están contemplados todos aquellos microorganismos mutantes de la cepa *P. fluorescens* BIRD-4 (CECT 7850) que mantienen dicha capacidad de hidrolizar lípidos y proteínas.

Tal como aquí se utiliza, el término “mutante” incluye cualquier microorganismo resultante de una mutación o cambio en el ADN de un gen de un organismo que da como resultado un carácter (fenotipo) que no se encuentra en el tipo salvaje (*wild-type*); en una realización concreta, dicho mutante es un mutante de *P. fluorescens* BIRD-4 (CECT 7850) que mantiene esencialmente las mismas características que las de la cepa parental [*P. fluorescens* BIRD-4 (CECT 7850)], tal como la capacidad de hidrolizar lípidos y proteínas.

Por otro lado, los inventores han comprobado que el microorganismo de la invención, además de hidrolizar lípidos y proteínas, tiene la capacidad de formar una biopelícula sobre un soporte sólido. Por lo tanto, en una realización particular, el microorganismo de la invención tiene, además, la capacidad de formar una biopelícula sobre un soporte sólido.

En el contexto de la presente invención se entiende por “biopelícula” el ecosistema microbiano organizado formado por uno o varios microorganismos asociados a una superficie, con características funcionales y estructuras complejas. Este tipo de conformación microbiana ocurre cuando las células planctónicas se adhieren a una superficie o sustrato, formando una comunidad, que se caracteriza por la excreción de una matriz extracelular adhesiva protectora. Una biopelícula puede contener aproximadamente un 15% de células y un 85% de matriz extracelular. Esta matriz generalmente está formada de exopolisacáridos, que forman canales por donde circulan agua, enzimas, nutrientes, y residuos. Allí las células establecen relaciones y dependencias: viven, cooperan y se comunican a través de señales químicas (*quorum sensing*), que regulan la expresión de genes de manera diferente en las distintas partes de la comunidad, como un tejido en un organismo multicelular.

La capacidad de un microorganismo de formar una biopelícula sobre un soporte sólido puede determinarse por cualquier procedimiento convencional, por ejemplo, cultivando el microorganismo en medio líquido, sobre un soporte plástico (por ejemplo, poliestireno), cambiando el medio periódicamente y observando la adhesión del microorganismo a la superficie del recipiente hasta cubrir la totalidad de mismo (Ejemplo 3) [Andersson S, Nilsson M, Dalhammar G, Kuttuva R. 2008. Assessment of carrier materials for biofilm formation and denitrification. *Vatten*. 64:201–207].

Como entiende el experto en la materia, cualquier soporte sólido de los disponibles en el estado de la técnica puede emplearse en el contexto de la presente invención. En la presente invención, se entiende por “soporte sólido” cualquier superficie que, ventajosamente, posee una elevada superficie específica que facilita la adsorción de los microorganismos de la invención. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de materiales que pueden formar el soporte sólido incluyen materiales poliméricos, en particular materiales celulósicos y materiales derivados de la celulosa, nitrocelulosa, acetato de celulosa, poliacrilamida, poli(vinilcloruro), dextrano entrecruzado, agarosa, poliacrilato, polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), cristal, metal, cerámica y similares. Estos materiales pueden ser usados en solitario o en combinación unos con otros en función de las necesidades.

Por lo tanto, en otro aspecto la invención se relaciona con un soporte sólido activo, de aquí en adelante soporte sólido activo de la invención, que comprende un soporte de un material plástico y el microorganismo de la invención que, en una realización particular, puede estar formando parte de una biopelícula. En otra realización particular, el material del soporte sólido es un material plástico.

Adicionalmente, los inventores han comprobado que el microorganismo de la invención puede crecer en presencia de un detergente no iónico. Por tanto, en otra realización particular, el microorganismo de la invención tiene la capacidad de crecer en un medio de cultivo que comprende un detergente no iónico.

En la presente invención, por “detergente no iónico” se incluye cualquier compuesto químico que estabiliza mezclas de aceite y agua reduciendo la tensión en la interfase entre las moléculas de aceite y agua, y cuya estructura química no presenta carga neta. Los términos “detergente no iónico”, “tensioactivo no iónico” y “surfactante no iónico” son sinónimos y pueden ser empleados indistintamente a lo largo de la descripción. Ejemplos de detergentes no iónicos incluyen, sin limitar a, cetil alcohol, estearil alcohol, oleil alcohol, decil glucósido, lauril glucósido, octil glucósido, Triton X-100, etc.

La capacidad de un microorganismo de crecer en un medio de cultivo que comprende un detergente no iónico puede determinarse por cualquier procedimiento convencional del estado de la técnica, por ejemplo, cultivando el microorganismo en medio sólido con un polisorbato y observando el crecimiento del microorganismo en la placa con un halo alrededor de la colonia, lo que indica la degradación del polisorbato tal como se describe en el Ejemplo 5 [Thomson CA, Delaquis PJ, Mazza G. 1999. Detection and Measurement of Microbial Lipase Activity: A Review. Crit Rev Food Sci Nutr. 39(2):165-87].

En otra realización particular, el microorganismo de la invención tiene, además, la capacidad de crecer en un medio de cultivo que comprende hipoclorito sódico en una concentración de hasta un 0,1%

La capacidad de un microorganismo de crecer en presencia de hipoclorito de sodio puede determinarse por cualquier procedimiento convencional, por ejemplo, cultivando el microorganismo en medio LB junto con hipoclorito de sodio y observar el crecimiento del microorganismo, tal como se describe en los Ejemplos 8 y 9 [Arancegui N, Cabanillas M, Martinez A, Funosas E, Maestri L, Hermida Lucena P. 1999. Quality control of decontaminating agents. Acta Odontol Latinoam. 12:83-8].

Un cultivo biológicamente puro de un microorganismo de la invención constituye un aspecto adicional de la presente invención. En la presente invención se entiende por “cultivo biológicamente puro”, a aquel cultivo en el que el microorganismo de la invención se encuentra en una proporción igual o superior al 95% respecto al resto de microorganismos presentes en el cultivo.

## 2. APLICACIONES DEL MICROORGANISMO DE LA INVENCION

Tal como se ha explicado previamente, el microorganismo de la invención *P. fluorescens* BIRD-4 (CECT 7850) es capaz de hidrolizar lípidos y proteínas y, además, es capaz de formar una biopelícula sobre un soporte sólido, crecer en presencia de un detergente no iónico, y crecer en presencia hipoclorito sódico en una concentración de hasta 0,1%. Por tanto, todas estas capacidades hacen que el microorganismo de la invención pueda emplearse con éxito en procesos de degradación microbiológica aerobia de grasas, aceites y proteínas en, por ejemplo, aguas residuales urbanas y vertidos industriales.

En el contexto de la presente invención, se entiende por “degradación microbiológica aerobia” a la transformación en presencia de oxígeno de compuestos complejos (por ejemplo, polímeros) en compuestos sencillos (por ejemplo, monómeros) por acción de los microorganismos o los productos derivados del metabolismo de los mismos.

Por lo tanto, en otro aspecto la invención se relaciona con un procedimiento para la degradación microbiológica en condiciones aeróbicas de un lípido en un medio acuoso, que comprende poner en contacto dicho medio acuoso que contiene un lípido con el microorganismo de la invención o con el soporte sólido activo de la invención.

5 Como se ha mencionado previamente el término “lípido”, tal como aquí se utiliza incluye grasas y aceites. El término “grasa” se emplea para designar varias clases de lípidos, aunque generalmente se refiere a los acilglicéridos, es decir, ésteres en los que uno, dos o tres ácidos grasos se unen a una molécula de glicerina, formando monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos respectivamente. Las grasas están presentes en muchos organismos y tienen  
10 funciones tanto estructurales como metabólicas. Los triglicéridos sólidos a temperatura ambiente son denominados grasas, mientras que los triglicéridos líquidos a temperatura ambiente son conocidos como aceites.

En una realización particular, dicho lípido es un aceite, tal como un aceite de origen vegetal, un aceite de origen animal, y sus mezclas. Aceites de origen vegetal incluyen todos  
15 aquellos aceites que proceden de los frutos y semillas de oleaginosas. Ejemplos de aceites de origen vegetal incluyen, sin limitar a, aceite de palma, aceite de coco, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de cacahuete, aceite de almendra, aceite de palmito, aceite de lino, aceite de cártamo, aceite de ricino, aceite de colza, aceite de maíz, aceite de sésamo, aceite de soja, etc. Aceites de origen animal incluyen todos aquellos aceites procedentes de la grasa de los  
20 animales. Ejemplos de aceites animales incluyen, sin limitar a, aceite de hígado de bacalao, aceite de ballena, aceite de foca, aceite de manteca de cerdo, aceite de hígado de hipogloso, aceite de pie de buey, aceite de tiburón, aceite de delfín, etc.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la degradación microbiológica, en condiciones aerobias, de una proteína en un medio acuoso, que comprende  
25 poner en contacto dicho medio acuoso que contiene una proteína con el microorganismo de la invención o con el soporte sólido activo de la invención.

En una realización particular, el medio acuoso comprende una proteína seleccionada entre una proteína de origen vegetal, una proteína de origen animal y sus mezclas. Proteínas de origen vegetal incluyen, sin limitar a, proteínas procedentes legumbres, cereales, frutos  
30 secos, etc. Proteínas de origen animal incluyen, sin limitar a, proteínas procedentes de la carne, el pescado, la leche, el queso, el huevo, etc.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la degradación microbiológica, en condiciones aeróbicas, de un lípido y/o una proteína presente en un agua residual, que comprende

- añadir el microorganismo de la invención a dicho agua residual a tratar, y, opcionalmente, repetir la aplicación de dicho microorganismo hasta la degradación total o parcial de dicho lípido y/o proteína presente en el agua residual a tratar; o alternativamente,
- 5       - añadir dicho agua residual a tratar un cultivo del microorganismo de la invención, a una concentración de, al menos,  $10^3$  unidades formadoras de colonia (ufc) por litro de agua residual a tratar; o alternativamente,
- añadir a dicho agua residual a tratar el soporte sólido activo de la invención.

En la presente invención se entiende por “agua residual” al agua contaminada con los  
10 materiales generados como consecuencia de la actividad humana, la cual, por razones de salud pública, no puede ser vertida sin tratamiento en lagos o corrientes convencionales. Las principales fuentes de contaminación acuática pueden clasificarse como urbanas (formada por las aguas residuales de los hogares y establecimientos comerciales), industriales (formada por las aguas residuales procedentes de los procesos industriales) y agrícolas (formada por las  
15 aguas residuales procedentes, por ejemplo, de la agricultura, el ganado comercial y las granjas avícolas). En una realización particular de la invención, el agua residual a tratar es un agua residual doméstica, un agua residual industrial o un agua residual agrícola.

Como entiende el experto en la materia, el microorganismo de la invención puede aplicarse directamente al agua residual a tratar o puede añadirse unido a un soporte sólido tal  
20 como los descritos previamente, para dar lugar a un soporte sólido activo.

Por lo tanto, en otra realización particular, el microorganismo de la invención se aplica directamente sobre el agua residual a tratar o, alternativamente, en otra realización particular, se aplica formando parte de un soporte sólido activo que comprende una biopelícula como monocultivo del microorganismo de la invención sobre un soporte sólido, preferiblemente, un  
25 soporte sólido de un material plástico.

Por otro lado, tal como se ha explicado previamente, el microorganismo de la invención tiene la capacidad de formar un biopelícula, para lo cual es preciso poner en contacto el microorganismo de la invención con un soporte sólido en las condiciones adecuadas (luz, temperatura, pH, nutrientes, etc.) para permitir la formación de la biopelícula.

30       Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la formación de una biopelícula como monocultivo de un microorganismo, que comprende la aplicación de una cantidad eficaz del microorganismo de la invención a un cultivo que contiene un soporte de un material plástico y un aceite como fuente de carbono o una fuente de proteínas como fuente de carbono y nitrógeno.

Varios ejemplos de aceites y proteínas que pueden ser degradadas por el microorganismo de la invención han sido descritos previamente y son aplicables al presente aspecto inventivo. En una realización particular, dicho aceite es un aceite de oliva y dicha fuente de proteínas es un suero de origen animal.

5

### 3. AISLAMIENTO DEL MICROORGANISMO DE LA INVENCION

En otro aspecto la invención se relaciona con un procedimiento para el aislamiento de un microorganismo que tiene la capacidad de degradar lípidos, tales como grasas y aceites, y proteínas, de aquí en adelante, procedimiento de aislamiento del microorganismo de la

10 invención, que comprende:

- a) suspender una muestra de un suelo, en un medio de cultivo que carece de fuente de carbono;
- b) añadir a la suspensión obtenida en la etapa a) una fuente de carbono constituida por uno o más tipos de lípidos, una fuente de fósforo y una fuente de nitrógeno;
- 15 c) incubar la suspensión resultante de la etapa b) bajo condiciones aeróbicas que permitan el crecimiento de microorganismos con capacidad para hidrolizar lípidos;
- d) sembrar diluciones de la suspensión resultante de la etapa c) en placas de medio sólido;
- e) incubar las placas sembradas de la etapa d) durante un periodo de tiempo
- 20 comprendido entre 1 y 7 días a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C;
- f) aislar y purificar las colonias de los microorganismos, obtenidas en la incubación de la etapa e);
- g) sembrar en placas de medio sólido diferencial las colonias de los microorganismos aisladas y purificadas en la etapa f), con el fin de seleccionar aquellos que
- 25 presentan actividad lipolítica, en un medio de cultivo que contiene un lípido como sustrato, una fuente de carbono, una fuente de fósforo, fuente de nitrógeno y un colorante fluorescente a luz ultravioleta; incubando las placas durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 7 días a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C, seleccionando aquellas que finalizado el periodo de incubación presentan
- 30 un halo naranja fluorescente al ser expuesta a luz ultravioleta;
- h) sembrar en placas de medio sólido diferencial las colonias de los microorganismos seleccionados en la etapa g), en un medio de cultivo que contiene un leche desnatada como sustrato, una fuente de carbono, una fuente de fósforo y una fuente de nitrógeno, con el fin de analizar la actividad proteolítica, incubando las

placas durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 7 días a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C, seleccionando aquellas que finalizado el periodo de incubación presentan un halo transparente; e

- 5 i) identificar las colonias que presentan actividad lipolítica y proteolítica, seleccionadas en la etapa g) y h).

La primera etapa del procedimiento para el aislamiento del microorganismo de la invención comprende recoger una muestra de suelo, tal como, por ejemplo, una muestra de suelo procedente de un suelo agrícola. Una vez recogida la muestra, se suspende en un medio de cultivo mínimo que carece de fuente de carbono. Cualquier medio de cultivo mínimo de los descritos en el estado de la técnica puede emplearse en la puesta en práctica del procedimiento de aislamiento del microorganismo de la invención, tal como medio mínimo M9 cuya composición específica por litro es: 7,0 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x12 H<sub>2</sub>O; 3,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0 g; NH<sub>4</sub>Cl; 0,5 g NaCl, 1X solución de oligoelementos y 1mL/L citrato férrico amónico 6‰ (p/v) [Abril MA et al. citado *supra*]. Existen otros medios de cultivos que pueden emplearse para el aislamiento de bacterias lipolíticas, tales como, por ejemplo, medio de producción de lipasas, el cual está compuesto por: aceite de oliva 1%, peptona 6%, 0,5% de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1% de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,04% de goma arábiga [Peng R, Lin J, Wei D. 2010. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* CS-2. Appl Biochem Biotechnol. 162:733-43].

20 Posteriormente, a la suspensión obtenida en la etapa a) se le añade cualquier grasa o aceite como fuente de carbono, una fuente de fósforo y una fuente de nitrógeno. Ejemplos de grasas y aceites que pueden ser utilizadas en el contexto de la presente invención como fuente de carbono se han descrito en detalle previamente. No obstante, en una realización particular, las fuentes de carbono empleadas son aceite de oliva como aceite de origen vegetal y mantequilla como grasa animal.

25 Como fuente de nitrógeno puede utilizarse cualquier fuente de nitrógeno asimilable por los microorganismos a identificar, por ejemplo, compuestos amónicos, nitrato, urea, aminoácidos, etc. La cantidad de fuente de nitrógeno que puede añadirse a la suspensión obtenida en la etapa a) puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, se añade una fuente de nitrógeno en una cantidad adecuada para alcanzar una concentración comprendida entre 5 y 10 mM.

Adicionalmente, pueden añadirse oligoelementos por ejemplo, en forma de sales minerales. Las sales minerales son la fuente de aniones y de cationes para los microorganismos, entre los cuales están: K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>. Aparte de estos iones, que se

requieren en mayores concentraciones, las bacterias necesitan minúsculas cantidades de otros elementos, tales como:  $Mn^+$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^+$ ,  $Mo^+$ ,  $Zn^{2+}$ , entre otros. En una realización particular, los oligoelementos se añadieron en una concentración comprendida entre 0,07 y 1 mM.

Como fuente de fosforo, puede emplearse tanto fosfatos orgánicos como inorgánicos.

5 En una realización particular, la fuente de fosforo se añadió en forma de fosfatos.

En la siguiente etapa del procedimiento de aislamiento del microorganismo de la invención, es decir, la etapa c), se lleva a cabo la incubación de la suspensión resultante de la etapa b) a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C, durante un período de tiempo comprendido entre 1 y 7 días, con agitación opcional, bajo condiciones aeróbicas para  
10 permitir el crecimiento de los microorganismos.

A continuación, en la etapa d), se siembran diluciones de la suspensión resultante del cultivo obtenido en la etapa c) para inocular placas de agar de crecimiento general. Cualquier agar de crecimiento general puede emplearse en la puesta en práctica del presente aspecto inventivo. En una realización particular, la composición por litro del agar de crecimiento es  
15 4,3 g de peptona de carne, 4,3 g de peptona de caseína, 6,4 g de cloruro de sodio y 15 g de agar [Hasan F, Shah AA, Hameed A. (2009) Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnol Adv.* 27:782-98]. Una vez inoculadas las placas de agar, se procede a la incubación de las mismas a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 7 días [etapa e)].

20 Posteriormente [etapa f) del procedimiento], se aíslan y purifican todas las colonias obtenidas en la etapa e), empleando, por ejemplo, un medio general de crecimiento como el empleado en la etapa anterior.

En la siguiente etapa del procedimiento de aislamiento [etapa g)], se procede a la selección de aquellas colonias que poseen actividad lipolítica, sembrando todas las bacterias  
25 purificadas en la etapa f) en placas de medio sólido diferencial, cuya composición por litro es, por ejemplo: 4,3 g de peptona de carne, 4,3 g de peptona de caseína, 6,4 g de cloruro de sodio y 15 g de agar y contiene hasta un 3% (v/v) de un aceite vegetal como única fuente de fósforo y un rodamina B como colorante a una concentración final de 0,001% [Kouker G, Jaeger KE. (1987) Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl Environ microbiol.*  
30 53:211-3; Hasan F, Shah AA, Hameed A. (2009) Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnol Adv.* 27:782-98]. Aunque prácticamente cualquier aceite vegetal o grasa animal puede ser utilizado, en una realización particular, dicha fuente de carbono está constituida por aceite de oliva y/o la grasa animal es mantequilla. A continuación, las placas sembradas de la etapa g) se incuban a una temperatura

comprendida entre 25°C y 30°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 7 días, seleccionando aquellas que finalizado el periodo de incubación presentan un halo naranja fluorescente al ser expuestas a luz ultravioleta.

Finalmente, se analiza la actividad proteolítica de todas las bacterias seleccionadas en la etapa g), inoculando placas de medio solido diferencial que contiene leche desnatada como sustrato, una fuente de carbono, una fuente de fosforo y una fuente de nitrógeno. La composición específica por litro de dicho medio diferencial es, por ejemplo: 70 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 12 H<sub>2</sub>O; 30 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 g de NH<sub>4</sub>Cl; 5 g de NaCl, 1X solución de oligoelementos y 1ml/l de citrato férrico amónico 6‰ [Jha, B.K., M.G. Pragash, J. Cletus, G. Raman and N. Sakthivel, (2009). Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new fluorescent pseudomonad strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida* and *P. mosselii*. World J. Microbiol. Biotechnol., 25: 573-581]. Las placas se incuban durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 7 días a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C, seleccionando aquellas que finalizado el periodo de incubación presentan un halo transparente [etapa h)]. Todas las bacterias seleccionadas en la etapa h) fueron identificadas por medio de la amplificación de un fragmento de 1550 pb a partir del gen ARNr 16S, empleando los cebadores GM3 [5'- AGAGTTTGATCMTGGC-3' (SEQ ID NO: 1)], donde M es A o C, y GM4 [5'-ACCTTGTTACGACTT-3' (SEQ ID NO: 2)] [Blöthe M, Akob DM, Kostka JE, Göschel K, Drake HL, Küsel K. (2008). pH gradient – induced heterogeneity of Fe(III) – reducing microorganisms in coal mining – associated lake sediments. Applied Environmental Microbiology. 74:1019-1029]. Una de las colonias aisladas, la denominada *Pseudomonas fluorescens* BIRD-4, fue depositada el 20 de enero de 2011 en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de acceso CECT 7850.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no pretenden ser limitativos del alcance de la misma.

## EJEMPLO 1

### Aislamiento de las bacterias

Se suspendió una muestra de 10 g de un suelo agrícola en un medio mínimo, en una relación 1:10 (p/v). Dicho medio es un medio mínimo sin fuente de carbono cuya composición específica por litro es: 7,0 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 12 H<sub>2</sub>O, 3,0 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0 g de NH<sub>4</sub>Cl, 0,5 g de NaCl, 1X de solución de oligoelementos, MgSO<sub>4</sub> 1 mM y 1 ml de citrato férrico amónico (6 g/l). A dicho medio, se añadió posteriormente un aceite de oliva en cantidad suficiente para alcanzar una concentración de 1% (v/v) [Abril MA, Michan C,

Timmis KN, Ramos JL. . 1989. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. J Bacteriol. 171:6782-90].

La suspensión resultante se incubó a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C, con agitación, durante una semana, en condiciones aeróbicas. Posteriormente, se sembraron diluciones apropiadas ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ) de dicha suspensión en placas de medio sólido de crecimiento general, cuya composición por litro es: 4,3 g de peptona de carne, 4,3 g de peptona de caseína, 6,4 g de cloruro de sodio y 15 g de agar. Todas las colonias que presentaron una morfología macroscópica diferente fueron seleccionadas y sembradas en cultivo axénico.

Todas las bacterias seleccionadas y purificadas se inocularon en un medio selectivo, constituido por medio nutritivo cuya composición por litro es: 4,3 g de peptona de carne, 4,3 g de peptona de caseína, 6,4 g de cloruro de sodio y 15 g de agar, suplementado con aceite de oliva al 3% y rhodamina B al 0,001%.

Tras incubar entre 1 y 7 días a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C, se observaron y seleccionaron las colonias que presentaron halo fluorescente naranja bajo la exposición a luz ultravioleta (365 nm). Cada una de las colonias seleccionadas como positivas fueron aisladas en cultivo axénico e identificadas mediante la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S.

20

## EJEMPLO 2

### **Utilización de aceites y grasas como única fuente de carbono, en condiciones aeróbicas**

Se analizó la capacidad de las bacterias aisladas en el Ejemplo 1 de crecer en medio líquido con aceite de oliva o mantequilla como única fuente de carbono. Para ello, las bacterias previamente aisladas e identificadas de manera individual (Ejemplo 1), se inocularon en un medio mínimo M9 (7,0 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ , 3,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,0 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,5 g de  $\text{NaCl}$ , 1X de solución de oligoelementos,  $\text{MgSO}_4$  1 mM y 1 ml de citrato férrico amónico (6 g/l)) [Abril MA et al., citado *supra*], con 3% de aceite de oliva ó 3% de mantequilla, como única fuente de carbono. Los cultivos se incubaron con agitación (entre 50 y 200 rpm) en un incubador orbital tipo Kühner. A lo largo del tiempo se realizaron conteos de los microorganismos viables, observándose que la densidad de la población aumentaba 4 órdenes de magnitud en 24 horas aproximadamente con cada una de las fuentes de carbono.

30

Un cultivo de bacterias procedentes de la colonia identificada como *Pseudomonas fluorescens* BIRD-4 ha sido depositado el 20/01/2011, en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Burjasot (Valencia, España), con el número de acceso CECT 7850.

5

### EJEMPLO 3

#### **Formación de biopelículas sobre soportes plásticos**

Se analizó la capacidad de formación de biopelículas por parte de dichas bacterias en medio líquido con aceite de oliva como única fuente de carbono. Para ello, la bacteria *P. fluorescens* BIRD-4 (CECT 7850), se inoculó en un medio mínimo M9 (7,0 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ×12 H<sub>2</sub>O, 3,0 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0 g de NH<sub>4</sub>Cl, 0,5 g de NaCl, 1X de solución de oligoelementos, MgSO<sub>4</sub> 1 mM y 1 ml de citrato férrico amónico (6 g/l)) [Abril MA et al., citado *supra*], con 3% de aceite de oliva, como única fuente de carbono. Los cultivos se incubaron con agitación (entre 50 y 200 rpm) en un incubador orbital tipo Kühner. El medio de cultivo fue cambiado cada 2 días, realizándose una observación diaria. Dicha bacteria es capaz de cubrir la totalidad de la superficie del soporte plásticos (poliestireno) al cabo de 10 días.

15

### EJEMPLO 4

#### **Cuantificación de la actividad lipasa mediante titulación**

Se cuantificó la actividad lipasa a partir del sobrenadante del cultivo de la bacteria *P. fluorescens* BIRD-4 (CECT 7850). Para ello, dicha bacteria fue inoculada en un medio mínimo M9 (7,0 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ×12 H<sub>2</sub>O, 3,0 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0 g de NH<sub>4</sub>Cl, 0,5 g de NaCl, 1X oligoelementos, MgSO<sub>4</sub> 1 mM y 1 ml de citrato férrico amónico (6 g/l)) [Abril MA, et al., citado *supra*], con glucosa 25 mM, como fuente de carbono. Los cultivos se incubaron con agitación (entre 50 y 200 rpm) en un incubador orbital tipo Kühner. Pasadas 18 horas aproximadamente el cultivo fue centrifugado a 10.000 rpm durante 5 minutos recolectándose el sobrenadante. Posteriormente, se mezclaron 1 ml del sobrenadante, 2 ml de agua destilada, 1 ml de Tris-HCl pH 7,7, y 1 ml sustrato lipasa (Sigma, Ref: 62314). La mezcla fue incubada a 37°C durante 30 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se añadieron 3 ml de etanol al 95% (v/v) y 4 gotas de Thimolphtalein al 0,9% (p/v). Se preparó un blanco al que se añadieron los mismos componentes pero reemplazando el sobrenadante del medio de cultivo por 1 ml de medio de cultivo sin bacteria.

20

25

30

Tanto el blanco como la muestra fueron titulados con NaOH 50 mM. La cuantificación de la actividad lipasa (en U/ml de enzima) fue determinada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad lipasa} = V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}} \times 1.000 \times 2 / V_{\text{Sn}}$$

donde:

- 5 “ $V_{\text{NaOH}}$ ” es el volumen (en ml) de NaOH añadido a la muestra menos el volumen (en ml) de NaOH añadido al blanco;
- “ $M_{\text{NaOH}}$ ” es la molaridad de la solución de NaOH;
- “1.000” es el factor de conversión de miliequivalentes a microequivalentes;
- “2” es el factor de conversión del tiempo de 30 min a 1 horas (definición de unidad); y
- 10 “ $V_{\text{Sn}}$ ” es el volumen (en ml) de sobrenadante.

La actividad de enzima determinada en el sobrenadante del cultivo fue 60 de U/ml.

#### EJEMPLO 5

##### 15 **Crecimiento de *P. fluorescens* BIRD-4 (CECT 7850) con detergentes no iónicos**

Se analizó la capacidad de crecimiento de *P. fluorescens* BIRD-4 (CECT 7850) en medio sólido con un polisorbato (Tween®). Para ello, dicha bacteria se inoculó en un medio mínimo M9 (7,0 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ , 3,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,0 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,5 g de NaCl, 1X oligoelementos,  $\text{MgSO}_4$  1 mM y 1 ml de citrato férrico amónico (6 g/l)) [Abril MA, et al.,  
20 citado *supra*], con 15 g de agar y 2% de Tween® 20. Los cultivos se incubaron de 25°C a 30°C durante 1-7 días. Pasado el tiempo de incubación se observó crecimiento sobre la placa de agar y un halo alrededor de la colonia que indicaba la degradación del polisorbato (Tween® 20).

25

#### EJEMPLO 6

##### **Utilización de proteínas como única fuente de carbono por *P. fluorescens* BIRD-4 (CECT 7850)**

Se analizó la capacidad de *P. fluorescens* BIRD-4 (CECT 7850) de utilizar albúmina como única fuente de carbono. Para ello, dicha bacteria se inoculó en un medio mínimo M9  
30 (7,0 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ , 3,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,0 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,5 g de NaCl, 1X oligoelementos,  $\text{MgSO}_4$  1 mM y 1 ml de citrato férrico amónico (6 g/l)) [Abril MA, et al., citado *supra*], con 1% (p/v) de albúmina, como única fuente de carbono. Los cultivos se incubaron con agitación (entre 50 y 200 rpm) en un incubador orbital tipo Kühner. A lo largo

del tiempo se realizaron conteos de los microorganismos viables, observándose que la densidad de la población aumentaba varios órdenes de magnitud en 24 horas.

### EJEMPLO 7

#### 5 Cuantificación de la actividad proteasa

Para la determinación y cuantificación de la actividad proteolítica de *P. fluorescens* BIRD-4 (CECT 7850) se utilizó un medio Skim Milk, cuya composición por litro es: 7,0 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ , 3,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,0 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,5 g de  $\text{NaCl}$ , 1X de solución de oligoelementos,  $\text{MgSO}_4$  1 mM y 1 ml de citrato férrico amónico (6 g/l), suplementado al 0,7%  
 10 (p/v) con leche desnatada. Tras incubar entre 1 y 7 días a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C, se observaron y seleccionaron las colonias que presentaron un halo transparente. Posteriormente, se determinó el diámetro del halo de degradación. Para realizar una estimación de la actividad proteolítica se determinaron los diámetros de los halos de degradación midiéndose el diámetro de cada halo con respecto al margen externo de la  
 15 colonia. Se emplearon distintas cepas de *Pseudomonas fluorescens* como referencia para comparar los halos de degradación y comprobar su mayor actividad proteolítica (mayor diámetro del halo en comparación con las cepas de referencia). Los halos de degradación se observaron tras 24 y 48 horas de incubación. Este ensayo es similar al presentado por distintos autores para detectar actividad proteasa en bacterias de la especie *Pseudomonas aeruginosa*  
 20 [Brown y Foster, 1970. A simple diagnostic milk medium for *Pseudomonas aeruginosa*. Sokol *et al.*, 1979. A More Sensitive Plate Assay for Detection of Protease Production by *Pseudomonas aeruginosa*].

### EJEMPLO 8

#### 25 Determinación de la concentración mínima inhibitoria empleando hipoclorito de sodio comercial (lejía)

Se determinó la concentración mínima de hipoclorito de sodio a la cual se inhibe el crecimiento de *P. fluorescens* BIRD-4 (CECT 7850). Dicha determinación se realizó empleando como medio de cultivo LB (composición por litro: 10 g de bacto triptona, 10 g de  
 30  $\text{NaCl}$  y 5 g de extracto de levadura), y diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio: 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,0313, 0,0156 y 0,0078% (v/v) a partir de una solución acuosa al 4% (p/v), las cuales corresponden a 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,563, 0,7813, 0,3906 y 0,1953% (v/v) de lejía. El microorganismo (*P. fluorescens* BIRD-4 (CECT 7850)) fue inoculado a una concentración de  $10^4$  ufc/ml por tratamiento. Los cultivos se incubaron entre 25°C y 30°C

durante 1-7 días. Pasado el tiempo de incubación se observaron las concentraciones que presentaban turbidez, observándose que dicho microorganismo (*P. fluorescens* BIRD-4 (CECT 7850)) presenta una resistencia natural al 0,0313% de hipoclorito de sodio (correspondiente a 0,7813% de lejía).

5

### EJEMPLO 9

#### **Cinética de muerte con hipoclorito sódico**

La cinética de muerte se realizó inoculando el microorganismo (*P. fluorescens* BIRD-4 (CECT 7850)) en medio LB (composición por litro: 10 g de bactotripton, 10 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura) a una concentración  $10^8$  ufc/ml; este cultivo fue incubado a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C con agitación hasta alcanzar una  $DO_{660\text{ nm}}=0,8$ . Una vez se alcanzó la concentración adecuada el cultivo fue dividido en 5 alícuotas de igual volumen, las cuales fueron sometidas a 4 concentraciones diferentes de hipoclorito de sodio (1%, 0,1%, 0,01% y 0,001% (v/v)), mientras que la quinta alícuota permaneció como control. Estos cultivos fueron incubados a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C con agitación. A partir de cada una de las 5 alícuotas se realizaron diluciones seriadas y recuento en placa a 3 tiempos diferentes (10, 30 y 60 minutos), observándose que dicho microorganismo (*P. fluorescens* BIRD-4 (CECT 7850)) resiste hasta un 0,1% (v/v) de hipoclorito sódico.

20

### EJEMPLO 10

#### **Determinación de la resistencia de la biopelícula formada por *P. fluorescens* BIRD-4 (CECT 7850) frente a lejía**

Se determinó la resistencia a lejía de la biopelícula formada por *P. fluorescens* BIRD-4 (CECT 7850). Para ello se inoculó una placa multipocillo con  $10^8$  ufc/ml de dicho microorganismo y se incubó a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C con agitación, durante 1-7 días o hasta la completa formación de la biopelícula. Una vez finalizado el periodo de formación de la biopelícula el medio de cultivo se sustituyó por una solución con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio: 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,0313, 0,0156 y 0,0078% (v/v), las cuales corresponden a 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,563, 0,7813, 0,3906 y 0,1953% (v/v) de lejía. La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, renovándose la solución de hipoclorito de sodio cada 20 minutos. Transcurrido el tiempo de tratamiento se removió la solución desinfectante (hipoclorito sódico) y se analizó la concentración de microorganismos viables y el mantenimiento de la actividad metabólica

(actividad lipolítica y proteolítica) [Ejemplos 4 y 7], observándose que a una concentración de 0,1% (v/v) de hipoclorito sódico el microorganismo (*P. fluorescens* BIRD-4 (CECT 7850)) mantiene su actividad metabólica.

**5 TRADUCCIÓN DE LOS TÉRMINOS EMPLEADOS EN LA LISTA DE SECUENCIAS**

“Microorganisms capable of hydrolyzing lipids and their applications in depuration of water”:

Microorganismos capaces de hidrolizar lípidos y su utilización en depuración de aguas.

“Artificial sequence”: Secuencia artificial

10 “Primer”: Cebador

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un microorganismo de la especie *Pseudomonas fluorescens* BIRD-4 depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 7850, que tiene la capacidad de hidrolizar lípidos y proteínas, o un mutante de dicho microorganismo que mantiene dicha capacidad de hidrolizar lípidos y proteínas.
- 10 2. Microorganismo según la reivindicación 1, que, además, tiene la capacidad de formar una biopelícula sobre un soporte sólido.
- 15 3. Microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que, además, tiene la capacidad de crecer en un medio de cultivo que comprende un detergente no iónico.
- 20 4. Microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que, además, tiene la capacidad de crecer en un medio de cultivo que contiene una concentración de hasta 0,1% de hipoclorito sódico.
- 25 5. Un cultivo biológicamente puro de un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 30 6. Un soporte sólido activo que comprende un soporte sólido y un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 35 7. Soporte sólido activo según la reivindicación 6, en donde el soporte sólido es de un material plástico.
- 40 8. Un procedimiento para la degradación microbiológica, en condiciones aeróbicas, de un lípido en un medio acuoso, que comprende poner en contacto dicho medio acuoso que contiene un lípido con un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o con un soporte sólido activo según la reivindicación 6 ó 7.
- 45 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicho lípido comprende un aceite seleccionado entre un aceite de origen vegetal, un aceite de origen animal y sus mezclas.
- 50 10. Un procedimiento para la degradación microbiológica, en condiciones aeróbicas, de una proteína en un medio acuoso, que comprende poner en contacto dicho medio acuoso que contiene una proteína con un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o con un soporte sólido activo según la reivindicación 6 ó 7.
- 55 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicho medio acuoso comprende una proteína seleccionada entre una proteína de origen vegetal, una proteína de origen animal y sus mezclas.
- 60 12. Un procedimiento para la degradación microbiológica, en condiciones aeróbicas, de un lípido y/o una proteína presente en un agua residual, que comprende:
  - añadir un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 a dicho agua residual a tratar, y, opcionalmente, repetir la aplicación de dicho microorganismo

hasta la degradación total o parcial de dicho lípido y/o proteína presente en el agua residual a tratar; o alternativamente,

- 5
- añadir dicho agua residual a tratar un cultivo de un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, a una concentración de, al menos,  $10^3$  unidades formadoras de colonia (ufc) por litro de agua residual a tratar; o alternativamente,
  - añadir a dicho agua residual a tratar un soporte sólido activo según la reivindicación 6 ó 7.
- 10
13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que dicho agua residual es un agua residual doméstica.
- 15
14. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que dicho agua residual es un agua residual industrial.
- 15
15. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que dicho agua residual es un agua residual agrícola.
- 20
16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que dicho microorganismo se aplica directamente sobre el agua residual a tratar.
- 25
17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que se añade dicho soporte sólido activo al agua residual a tratar, comprendiendo dicho soporte sólido activo una biopelícula como monocultivo de dicho microorganismo sobre un soporte de un material plástico.
- 30
18. Un procedimiento para la formación de una biopelícula como monocultivo de un microorganismo, que comprende la aplicación de una cantidad eficaz de un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 a un cultivo que contiene un soporte sólido y un aceite como fuente de carbono o una fuente de proteínas como fuente de carbono y nitrógeno.
- 35
19. Procedimiento según la reivindicación 18, en donde el soporte sólido es de un material plástico.
- 40
20. Procedimiento según la reivindicación 18 ó 19, en el que dicho aceite es un aceite de oliva.
- 40
21. Procedimiento según la reivindicación 18 ó 19, en el que dicha fuente de proteínas es un suero de origen animal.
- 45
22. Un procedimiento para el aislamiento de un microorganismo de la especie *Pseudomonas fluorescens* BIRD-4 depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 7850, que tiene la capacidad de degradar lípidos y proteínas, que comprende:
- a) suspender una muestra de un suelo, en un medio de cultivo que carece de fuente de carbono;

- b) añadir a la suspensión obtenida en la etapa a) una fuente de carbono constituida por uno o más tipos de lípidos, una fuente de fósforo y una fuente de nitrógeno;
- 5 c) incubar la suspensión resultante de la etapa b) bajo condiciones aeróbicas que permitan el crecimiento de microorganismos de la especie *Pseudomonas fluorescens* BIRD-4 con capacidad para hidrolizar lípidos;
- 10 d) sembrar diluciones de la suspensión resultante de la etapa c) en placas de medio sólido;
- e) incubar las placas sembradas de la etapa d) durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 7 días a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C;
- 15 f) aislar y purificar las colonias de los microorganismos de la especie *Pseudomonas fluorescens* BIRD-4, obtenidas en la incubación de la etapa e);
- 20 g) sembrar en placas de medio sólido diferencial las colonias de los microorganismos de la especie *Pseudomonas fluorescens* BIRD-4 aisladas y purificadas en la etapa f), con el fin de seleccionar aquellos que presentan actividad lipolítica, en un medio de cultivo que contiene un lípido como sustrato, una fuente de carbono, una fuente de fósforo, fuente de nitrógeno y un colorante fluorescente a luz ultravioleta; incubando las placas durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 7 días a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C, seleccionando aquellas que finalizado el periodo de incubación presentan un halo naranja fluorescente al ser expuesta a luz ultravioleta;
- 25 h) sembrar en placas de medio sólido diferencial las colonias de los microorganismos seleccionados en la etapa g), en un medio de cultivo que contiene un leche desnatada como sustrato, una fuente de carbono, una fuente de fósforo y una fuente de nitrógeno, con el fin de analizar la actividad proteolítica, incubando las placas durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 7 días a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C, seleccionando aquellas que finalizado el periodo de incubación presentan un halo transparente; e
- 30 i) identificar las colonias que presentan actividad lipolítica y proteolítica, seleccionadas en la etapa g) y h) como de un microorganismo de la especie *Pseudomonas fluorescens* BIRD-4 depositado en la CECT con número de acceso CECT 7850, que tiene la capacidad de degradar lípidos y proteínas.
- 35

# ES 2 390 743 A1

## SEQUENCE LISTING

<110> BIO-ILIBERIS RESEARCH AND DEVELOPMENT, S.L.

<120> MICROORGANISMS CAPABLE OF HYDROLYZING LIPIDS AND THEIR APPLICATIONS IN DEPURATION OF WATER

<130> P6618ES00

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> primer GM3

<400> 1  
agagtttgat cmtggc 16

<210> 2  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> primer GM4

<400> 2  
accttggtac gactt 15



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130630

②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.04.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CHRISTEN G.L.; MARSALL R.T. "Selected properties of lipase and protease of <i>Pseudomonas fluorescens</i> 27 produced in four media" Journal of Dairy Science (1984) Vol. 67, N.º. 8, páginas 1680-1687; todo el documento.	1-22
A	O'TOOLE G.A.; KOLTER R. "Initiation of biofilm formation in <i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis" Molecular Microbiology (1998) Vol. 28, N.º. 3, páginas 449-461; todo el documento.	1-22
A	DEVLIEGHER W. et al. "Survival and plant growth promotion of detergent-adapted <i>Pseudomonas fluorescens</i> ANP15 and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 7NSK2" Applied and Environmental Microbiology (noviembre 1995) Vol. 61, N.º. 11, páginas 3865-3871; todo el documento.	1-22
A	NORWOOD D.E.; GILMOUR A. "The growth and resistance to sodium hypochlorite of <i>Listeria monocytogenes</i> in steady-state multispecies biofilm" Journal of Applied Microbiology (2000) Vol. 88, páginas 512-520; todo el documento.	1-22

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  
11.09.2012

Examinador  
M. M. García Coca

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N1/20** (2006.01)

**C02F3/34** (2006.01)

**C12R1/39** (2006.01)

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

C12N, C02F, C12R

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, XPEST/XPEST2, XPSPEG, XPMISC, XPOAC, XPTK, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.09.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-22	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-22	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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	CHRISTEN G.L.; MARSALL R.T. "Selected properties of lipase and protease of <i>Pseudomonas fluorescens</i> 27 produced in four media" Journal of Dairy Science (1984) Vol. 67, N°. 8, páginas 1680-1687.	1984
D02	O'TOOLE G.A.; KOLTER R. "Initiation of biofilm formation in <i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis" Molecular Microbiology (1998) Vol. 28, N°. 3, páginas 449-461.	1998
D03	DEVLIEGHER W. et al "Survival and plant growth promotion of detergent-adapted <i>Pseudomonas fluorescens</i> ANP15 and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 7NSK2" Applied and Environmental Microbiology (noviembre 1995) Vol. 61, N°. 11, páginas 3865-3871.	Noviembre 1995
D04	NORWOOD D.E.; GILMOUR A. "The growth and resistance to sodium hypochlorite of <i>Listeria monocytogenes</i> in steady-state multispecies biofilm" Journal of Applied Microbiology (2000) Vol. 88, páginas 512-520.	2000

**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**

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-22, es un microorganismo de la especie *Pseudomonas fluorescens* BIRD-4 (CECT 7850) que tiene la capacidad de hidrolizar lípidos y proteínas, forma biopelículas sobre un soporte sólido y es capaz de crecer en un medio de cultivo que contiene un detergente no iónico y con una concentración de hasta 0,1% de hipoclorito sódico (reiv. 1-4). Es también objeto de la invención el cultivo biológicamente puro de dicho microorganismo (reiv. 5) y un soporte sólido activo que comprende dicho microorganismo (reiv. 6 y 7). También es objeto de la invención el uso de dicho microorganismo para la degradación microbiológica en condiciones aeróbicas de lípidos y proteínas (reiv. 8-11), un procedimiento para la realización de dicha degradación microbiológica en aguas residuales (reiv. 12-17) y el uso de dicho microorganismo para la formación de biopelículas sobre un soporte sólido (reiv. 17-21). Por último es también objeto de la invención el procedimiento de aislamiento de dicho microorganismo (reiv. 22).

**Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).**

El documento D01 divulga distintas características de lipasas y proteasas de la cepa *Pseudomonas fluorescens* P27.

El documento D02 divulga un estudio basado en la propiedad que tienen los microorganismos de la especie *Pseudomonas fluorescens* de formar biopelículas sobre soportes sólidos plásticos.

El documento D03 divulga un estudio sobre la capacidad de los microorganismos de la especie *Pseudomonas fluorescens*, en concreto las cepas ANP15 y JPB3, de crecer en medios de cultivo a los que se le añaden distintos detergentes iónicos y no iónicos, como el polisorbato Tween 80.

El documento D04 divulga una cepa de la especie *Pseudomonas fragi* capaz de crecer en un medio con unas concentraciones determinadas de hipoclorito sódico.

No se ha encontrado en el estado de la técnica el microorganismo de la invención 1. En los documentos citados D01-D03 se divulgan las características de los microorganismos de la especie *Pseudomonas fluorescens* como son el tener la capacidad de hidrolizar lípidos y proteínas, formar biopelículas sobre soportes plásticos o crecer en medios de cultivo en presencia de detergentes no iónicos, que son características propias de la especie *Pseudomonas fluorescens*. Sin embargo, la característica técnica que distingue al microorganismo de la invención de los divulgados en el estado de la técnica es su capacidad de crecer en un medio de cultivo que contiene una concentración de hasta 0,1% de hipoclorito sódico.

Por lo tanto, ninguno de los documentos citados (D01-D04), tomados solos o en combinación, revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-22. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida por dichas reivindicaciones. Por lo tanto, el objeto de invención según se recoge en las reivindicaciones 1-22, cumple con el requisito de novedad e implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).