

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 470 819**

21 Número de solicitud: 201300029

51 Int. Cl.:

C02F 3/00 (2006.01)

C02F 3/34 (2006.01)

C12R 1/40 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

21.12.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.06.2014

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA (100.0%)

Ctra. Sacramento, s/n Edf. Central

04120 La Cañada de San Urbano (Almería) ES

72 Inventor/es:

BALLESTEROS MARTÍN, María De La Menta;

CASAS LÓPEZ, José Luis;

SÁNCHEZ PÉREZ, José Antonio y

MALATO RODRÍGUEZ, Sixto

54 Título: **Ensayo y procedimiento para la evaluación de la biodegradabilidad rápida de aguas mediante Pseudomonas putida**

57 Resumen:

Ensayo y procedimiento para la evaluación de la biodegradabilidad rápida de aguas mediante Pseudomonas putida.

La invención consiste en un nuevo kit y procedimiento de evaluación de la "biodegradabilidad rápida" de aguas contaminadas. El test se basa en el empleo de unas cápsulas que contienen una proporción adecuada de bacteria Pseudomonas putida liofilizada y sales minerales que se añaden al agua cuya biodegradabilidad desea evaluarse. Durante tres días de incubación a 30°C, se monitoriza la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y se calcula la eficiencia de biodegradabilidad al final del ensayo.

Este test está dirigido al sector del tratamiento de efluentes acuosos, especialmente de origen industrial para realizar el seguimiento de la biodegradabilidad. El método resuelve los problemas de repetibilidad y tiempo de ensayo de los métodos tradicionales.

ES 2 470 819 A1

DESCRIPCIÓN

ENSAYO Y PROCEDIMIENTO PARA LA EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD RÁPIDA DE AGUAS MEDIANTE *PSEUDOMONAS PUTIDA*.

Sector de la técnica

5

La presente invención está dirigida al sector del tratamiento de efluentes acuosos, especialmente de origen industrial.

DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA INVENCIÓN

10

La invención consiste en un nuevo kit y un nuevo procedimiento de evaluación de la "biodegradabilidad rápida" de aguas contaminadas. Este kit consiste en cápsulas de la bacteria *Pseudomonas putida* liofilizada y sales minerales que se añaden al agua cuya biodegradabilidad desea evaluarse. Se mide la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y se calcula la eficiencia de biodegradabilidad a los tres días de incubación a 30°C.

15

El kit se aplica al seguimiento de la biodegradabilidad de efluentes acuosos y para el control de influentes en Estación Depuradora de Aguas Residuales Industriales (EDARI). Las alternativas para evaluar la biodegradabilidad en aguas propuestas por la OCDE e ISO (Zahn-Wellens, relación DBO_5/DQO , respirometría, etc.) se basan en la utilización de fangos activos y presentan numerosos inconvenientes en cuanto a su aplicabilidad. Este método resuelve los problemas de repetibilidad y tiempo de ensayo de los métodos tradicionales.

20

25 Estado de la técnica

En las últimas décadas, la cantidad de compuestos orgánicos que persisten en el medioambiente se ha visto considerablemente incrementada. Paralelamente, la comunidad científica ha ido desarrollando métodos para investigar y controlar los procesos de biodegradación y proporcionar el conocimiento adecuado para la toma de decisiones en materia de protección medioambiental. La mayoría de los esfuerzos se han

30

concentrado en la biodegradación de los compuestos orgánicos en el medio acuático, fundamentalmente en los procesos de tratamiento de aguas residuales, por ser un parámetro clave para estimar los riesgos a largo plazo en la biota. Estos métodos deben realizarse preferentemente con un coste mínimo, por lo que una forma preliminar de
5 evaluar qué productos son peligrosos para el medioambiente es hacer un estudio sencillo de su biodegradabilidad.

Las pruebas de biodegradabilidad más empleadas internacionalmente son las propuestas por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). En estas
10 pruebas están basadas otras técnicas estandarizadas por la Organización Internacional de Normalización (ISO) o por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), entre otras.

Según la OCDE (OCDE Guidelines for the Testing of Chemicals, París, Francia (1992))
15 debe estudiarse primero la biodegradabilidad aerobia mediante una prueba de "biodegradabilidad rápida" y en caso de que el resultado sea negativo la biodegradabilidad puede determinarse mediante una prueba de simulación. De forma alternativa puede realizarse una prueba para detectar la "biodegradabilidad inherente" ya que los ensayos de "biodegradabilidad rápida" son más rigurosos. En todos los casos,
20 dicha organización aconseja que los ensayos sean realizados preferiblemente bajo condiciones realistas para simular el comportamiento de un medioambiente particular (ej. estación depuradora de aguas residuales (EDAR), aguas superficiales, suelos o sedimentos).

25 Los test de la OCDE (OCDE Guidelines for the Testing of Chemicals, París, Francia (1992)) que pueden usarse para determinar la "biodegradabilidad rápida" de sustancias orgánicas o aguas residuales son los test OECD nº 301 A-F: Test de pérdida de Carbono Orgánico Disuelto (COD) (TG 301 A), Test de evolución del CO₂ (TG 301 B), Test MITI modificado (I) (TG 301 C), Test en botella cerrada (TG 301 D), Test de selección OCDE modificado (TG
30 301 E) y Test de respirometría manométrica (TG 301 F).

Los ensayos de “biodegradabilidad rápida” se realizan en condiciones aerobias empleando altas concentraciones de COD (2-100 mg COD/L) de la sustancia cuya biodegradabilidad es objeto de estudio como única fuente de carbono (excepto la fuente de carbono asociada con la biomasa). El agua contaminada se incuba durante 28 días con una concentración
5 relativamente baja de microorganismos (10^4 - 10^8 CFU/mL) no adaptados al contaminante. La biomasa procede de fangos activos, efluentes secundarios de depuradora, extracto de suelo o agua superficial a los que se añade un medio mineral específico. Se mantiene la incubación en condiciones aerobias a temperaturas entre 20 y 25°C y a pH neutro. El periodo puede aumentarse por encima de 28 días si la degradación ha comenzado pero no
10 se ha estabilizado (OCDE Guidelines for the Testing of Chemicals, París, Francia (1992)).

Los test de “biodegradabilidad rápida” son pruebas muy versátiles que pueden emplearse para un amplio número de contaminantes debido a que la medida de biodegradabilidad se realiza monitorizando parámetros globales. Un ejemplo de parámetro global es el
15 COD, que es proporcional a la concentración de compuestos orgánicos presentes y está limitado a describir la oxidación total permaneciendo invariable cuando no existe oxidación o es muy pequeña. Otros parámetros son relacionados con la respiración microbiana como la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) o la producción de dióxido de carbono que indirectamente proporcionan datos sobre la degradación del
20 contaminante.

Se considera que el compuesto es rápidamente biodegradable si se elimina un 70% del COD (TG 301 A y TG 301 E), un 60% del dióxido de carbono teórico (ThCO_2) (TG 301 B) o un 60% de la demanda de oxígeno teórica (ThDO) (TG 301 C, TG 301 D y TG 301
25 F). Estos niveles límite de biodegradación deben alcanzarse en una “ventana de 10 días” durante los 28 días de duración del test (excepto en el ensayo TG 301 C). La “ventana de 10 días” comienza cuando el grado de biodegradación ha alcanzado el 10% de eliminación del COD, ThDO o ThCO_2 . Si el resultado es positivo puede considerarse como indicativo de que el contaminante será rápidamente biodegradado en la mayoría
30 de ambientes, incluidas las EDAR (OCDE Guide lines for the Testing of Chemicals, París, Francia (1992)).

La evolución de un compuesto químico en una EDAR también puede estudiarse en el laboratorio usando los ensayos de simulación del tratamiento aerobio de aguas residuales (OCDE, 1992): Unidad de fangos activos (TG 303 A) y Biofilms (TG 303 B). Para ello, se
5 monitorizan los cambios en el COD y/o la DQO para una concentración inicial recomendada de entre 10 y 20 mg/L. Sin embargo muchos compuestos normalmente se presentan a menores concentraciones por lo que son necesarias técnicas analíticas más sofisticadas. Estos test de simulación ofrecen datos de biodegradación bajo unas condiciones medioambientales específicas mediante el uso de biomasa autóctona y
10 sólidos (fangos activos, sedimentos, suelos, etc.) que permiten la adsorción del contaminante a la temperatura típica que representa el ambiente particular.

Las pruebas de “biodegradabilidad inherente” presentan una elevada capacidad de degradación. Permiten tiempos prolongados de exposición de la sustancia a los
15 microorganismos, se emplea una baja relación sustancia evaluada/biomasa y se añade normalmente una fuente de carbono adicional, por lo que ofrecen más posibilidades de obtener un resultado positivo que los test de “biodegradabilidad rápida”. Algunos de estos test incluso utilizan microorganismos adaptados para incrementar el grado de biodegradación. Por ello, si el resultado es positivo no puede asumirse que la sustancia
20 problema vaya a degradarse rápidamente en el medioambiente.

Los métodos de biodegradabilidad inherente más utilizados son los ensayos 302 A (SCAS modificado), 302 B (Zahn-Wellens/EMPA) y 302 C (MITI II modificado)(OCDE, 1992). De todos los ensayos, el 302 A presenta mayor capacidad de biodegradación con un tiempo
25 de ensayo de hasta 6 meses de duración, en el que la sustancia a evaluar (20mg COD/L) es biodegradada por fangos activos empleando un efluente doméstico como fuente de carbono adicional. El ensayo de Zahn-Wellens se realiza siguiendo el consumo de COD durante 28 días y empleando una elevada concentración de sustancia problema (50-400mgCOD/L). En el ensayo MITI II modificado (el de menor capacidad de
30 biodegradación) se expone al contaminante a microorganismos provenientes de una mezcla de muestras naturales de aguas superficiales, fangos activos, suelo, etc. durante 30

días. En todos los casos las concentraciones de biomasa son mucho más elevadas que en las pruebas de "biodegradabilidad rápida" (del orden de 1 g STS (sólidos totales en suspensión)/L).

- 5 Una biodegradación por encima del 20% de la teórica (COD, DQO o DBO) se considera como evidencia de "biodegradabilidad inherente primaria" mientras que por encima de un 70% "biodegradabilidad inherente final". Si este nivel es casi alcanzado (ej. ThOD o DQO ligeramente por debajo de 60 o 70% respectivamente) también es indicativo de "biodegradabilidad inherente". Igualmente, esta aproximación se aplica en el caso de que
- 10 el porcentaje sea alcanzado pero no en la "ventana de 10 días". Si el resultado es positivo, la sustancia tiene una degradación potencial bajo condiciones favorables (ej. una EDAR bien operada) y si es negativo debe concluirse que la sustancia será persistente en el medioambiente.

- 15 Otro método alternativo a los propuestos por la OCDE y que es ampliamente utilizado por diversos investigadores para estudiar la evolución de la biodegradabilidad es el test estándar de la DBO (J. P. Scott y D. F. Ollis, *Journal of Advanced Oxidation Technology* 2: 374-381 (1997)). Los cambios en la biodegradabilidad se evalúan midiendo las relaciones DBO_x/DQO y/o DBO_x/COD y comparando sus valores en las muestras tratadas con los de
- 20 los efluentes originales (D. Mantzavinos y E. Psillakis, *Journal of Chem. Technol. Biotechnol.*, 79: 431-454 (2004)). Estas relaciones ofrecen un índice de la proporción de materia orgánica presente que es aeróbicamente degradable dentro de un cierto periodo de tiempo (ej. 5 días en la DBO_5). Las limitaciones del test de la DBO surgen principalmente del hecho de que la velocidad de biodegradación varía con la concentración. Así, los resultados de la
- 25 DBO deben interpretarse con precaución y no deben compararse con datos de otras fuentes. Además, las relaciones DBO_x/DQO (o DBO_x/COD) por sí solas pueden conducir a error a menos que también se den los valores de DBO individuales.

Según Pagga (U. Pagga, *Chemosphere*, 35: 2953-2972(1997)) es difícil definir un "método

30 verdadero" de medida de la biodegradabilidad ya que diversos factores o situaciones medioambientales pueden influenciar los resultados obtenidos. Diversos autores (U. Pagga,

Chemosphere, 35: 2953-2972(1997); Jiang y cols., Chemosphere 48: 133–138 (2002)) sugieren que la reproducibilidad de las medidas de biodegradabilidad utilizando diferentes métodos o condiciones, o incluso usando el mismo test pero diferente inóculo, pueden llegar a generar resultados inconsistentes y algunas veces incluso contradictorios. El inóculo
5 es el factor que más afecta a la reproducibilidad de los ensayos especialmente cuando la concentración de este es baja (en los ensayos de “biodegradabilidad rápida”). Blok y Booy (J. Blok y M. Booy, Ecotoxicology and Environmental Safety 8: 410-422 (1984)) demostraron que las diferencias encontradas al comparar la biodegradación de 29 compuestos químicos empleando diversos métodos propuestos por la OCDE eran debidas a la variabilidad en el
10 inóculo.

Reuschenbach y cols. (P. Reuschenbach y cols., WaterResearch 37: 1571-1582 (2003)) utilizaron dos métodos respirométricos diferentes para evaluar la biodegradabilidad de 10 compuestos químicos según el test OCDE 301F (Oxitop® and Sapromat®). En 8 casos
15 obtuvieron resultados comparables pero en los dos restantes los resultados fueron diferentes, por lo que concluyeron que ambos sistemas no eran equivalentes. Asimismo, Kümmerer y cols. (K. Kümmerer y cols., WaterResearch: 38 2111–2116 (2004)) encontraron que las concentraciones inhibitorias de diversos antibióticos, desinfectantes y citotóxicos dependían fuertemente del tiempo del test y del tipo de compuesto, concluyendo que el test
20 estandarizado de la OCDE empleado fallaba al estudiar los efectos medioambientales de dichos compuestos orgánicos.

La OCDE indica que la normalización del inóculo puede mejorar la comparación de resultados entre los distintos ensayos. Sin embargo, es difícil estandarizar el inóculo si al
25 mismo tiempo se requiere un número elevado de especies en el ensayo, ya que esta organización recomienda un inóculo mixto para asegurar la variabilidad de microorganismos. Ambas recomendaciones, inóculo normalizado y mixto resultan contradictorias y, pese a que la variabilidad de resultados dependiendo del ensayo empleado es posiblemente un reflejo del comportamiento de los microorganismos en los
30 ecosistemas naturales, la necesidad de reproducibilidad y fiabilidad en los datos ofrecidos

precisa nuevas investigaciones para disponer de métodos de medida de la biodegradabilidad más robustos.

Además de la variabilidad de métodos existentes de medida de biodegradabilidad y los
5 problemas asociados al empleo de estos, la legislación española de aguas no establece valores límite para la biodegradabilidad de aguas de vertido o reutilizables. Sin embargo, para otro tipo de sustancias como los tensioactivos, la legislación incluso recomienda qué método de referencia debe utilizarse (CE 907/2006). Por ello, es necesario investigar en métodos alternativos robustos que aseguren la reproducibilidad de los resultados y permitan
10 definir un protocolo estandarizado para evaluar la biodegradabilidad de los efluentes en estaciones depuradoras urbanas e industriales.

La presente invención tiene como objetivo la comercialización de las cápsulas conteniendo la bacteria *Pseudomonas putida* como inóculo estándar para la evaluación de la
15 “biodegradabilidad rápida” evitando la utilización de fangos activos. Trabajos previos al estudio objeto de patente han sido publicados demostrando la viabilidad del uso de dicha bacteria para medir la biodegradabilidad de aguas contaminadas aunque con importantes diferencias respecto al kit objeto de patente. Los autores de la invención desarrollaron un nuevo método en el año 2008 para medir la biodegradabilidad de aguas contaminadas
20 empleando cultivos líquidos de la bacteria *P. putida* y monitorizando la eliminación biológica del Carbono Orgánico Disuelto (COD).

El método se comenzó a emplear para evaluar la mejora de la biodegradabilidad obtenida al tratar mediante foto-Fenton aguas contaminadas con plaguicidas (M.M.
25 Ballesteros Martín y cols., Chemosphere 70, 1476-1483 (2008); M.M. Ballesteros Martín y cols., 155, 342-349 (2008)). Posteriormente, se demostró su viabilidad como ensayo para evaluar la biodegradabilidad (A. García-Ripoll y cols., Journal of Hazardous Materials 162,1223-1227 (2009)).

30 Para validar los resultados obtenidos con un único plaguicida, y garantizar la generalidad del ensayo, se siguió la misma metodología con una mezcla de cuatro plaguicidas

comerciales ((M.M. Ballesteros Martín y cols., Water Research 43, 653-660 (2009)) y otra de cinco plaguicidas comerciales con un mayor nivel de contaminación inicial ((M.M. Ballesteros Martín y cols., Water Research 43,3838-3848 (2009)). La investigación realizada para el empleo de dicho método se encuentra desarrollada en la Tesis Doctoral
5 de Dña. M^a de la Menta Ballesteros Martín titulada “Eliminación de plaguicidas no biodegradables en aguas mediante acoplamiento de fotocátalisis solar y oxidación biológica” defendida en la Universidad de Almería en el año 2008.

En el año 2010, los autores de la invención publicaron un estudio comparativo en el que
10 se demuestran las ventajas del ensayo frente a otros métodos alternativos utilizados para la medida de la biodegradabilidad ((M.M. Ballesteros Martín y cols., Ecotoxicology and Environmental Safety 73, 1189-1195 (2010)) que despertó el interés de la comunidad científica por este nuevo ensayo.

15 Para hacer extensivo este método a todos los interesados se propone en esta invención estandarizar el procedimiento para su comercialización mediante cápsulas de inóculo liofilizado de la bacteria *P. putida* y una proporción adecuada de sales minerales. Con el mismo fin, se presenta un nuevo método de evaluación de la biodegradabilidad mediante el seguimiento de la Demanda Química de Oxígeno.

20

Descripción de la invención

El test de medida de la “biodegradabilidad rápida” mediante el empleo de la bacteria *Pseudomonas putida* se basa en el empleo de unas cápsulas que contienen una
25 proporción adecuada de bacteria liofilizada y sales minerales que se añaden al agua cuya biodegradabilidad desea evaluarse.

En primer lugar se hidrata la bacteria liofilizada, mezclando en un tubo estéril el contenido de la capsulación una disolución estéril de NaCl al 0,9%. De esta forma se
30 obtiene el inóculo estándar que se adicionará posteriormente al agua problema.

Una porción de inóculo se incubó junto al agua problema en un matraz Erlenmeyer que se dispone en un agitador orbital a 150 rpm manteniendo una temperatura de incubación de 30°C. Cada 24 h se recoge una alícuota de forma estéril y se mide la DQO hasta valor constante (3-5 días).

5

Finalmente, se calcula la eficiencia de biodegradación mediante la expresión:

$$E_f = \frac{DQO_i - (DQO_f - DQO_m)}{DQO_i} \cdot 100$$

donde DQO_i es la DQO inicial aportada por la materia orgánica presente en el agua contaminada, DQO_f es la DQO medida al final del ensayo y DQO_m es la DQO remanente obtenida de un ensayo blanco. Si la eficiencia de biodegradación supera el 40% puede considerarse que el compuesto o el agua contaminada es "rápidamente biodegradable".

15 Realización preferente de la invención

La bacteria *Pseudomonas putida* CECT 324 se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España). Los cultivos se mantuvieron en placas Petri durante 24 horas a 30°C con medio de cultivo conteniendo extracto de buey, 1 g L⁻¹, extracto de levadura, 2 g L⁻¹, peptona, 5 g L⁻¹, NaCl, 5 g L⁻¹ y agar, 15 g L⁻¹ a pH 7.2. Una vez formadas las colonias se recogió una y se cultivó en medio líquido en un matraz Erlenmeyer de 25 mL conteniendo 5 mL del medio anterior (a excepción del agar). Se mantuvo esta disolución en agitación 24 horas y se repartió en tubos estériles a los que se añadió disolución de glicerina al 87% (v/v) en una proporción 4/1 (cultivo/disolución de glicerina). Una vez agitados, cada tubo se introdujo en nitrógeno líquido y se conservó a -70°C obteniendo un stock bacteriano.

A continuación, se incubaron 200 µL de dicho stock en un matraz de 250 mL conteniendo 50 mL de medio líquido (extracto de buey, 1 g L⁻¹, extracto de levadura, 2 g L⁻¹, peptona, 5 g L⁻¹ y NaCl, 5 g L⁻¹ a pH 7.2) durante 24 h a 30°C. Con el fin de obtener

una elevada cantidad de biomasa, pueden emplearse volúmenes mayores de matraces siguiendo las mismas proporciones. La biomasa así obtenida se centrifugó durante 15 min a 7000 rpm lavándose con disolución estéril de NaCl al 0,9% tres veces y se liofilizó durante 24 h el pellet bacteriano.

5

La bacteria liofilizada se encapsuló añadiendo en cada cápsula 1 g de bacteria liofilizada y 5,5 g de NH_4Cl , 5,5 g de K_2HPO_4 , 5,5 g de KH_2PO_4 , 5,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,11 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,11 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,09 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,02 g de ácido nitrilotriacético. El vehículo para la encapsulación deberá ser preferiblemente insoluble en agua e inerte o en forma de blíster. Con el contenido de una cápsula se preparó el inóculo estándar mezclando en un tubo estéril la bacteria y sales minerales contenidos en la cápsula y 10 mL de una disolución estéril de NaCl al 0,9%. Se agitó hasta completa disolución.

15 A continuación, el pH del agua problema se ajustó a 7, añadiendo NaOH o H_2SO_4 0.1 M y se filtró a través de filtros de $0.80 \mu\text{m}$, ya que si la filtración se realiza con filtros de menor tamaño, parte de la materia orgánica puede quedar retenida en éste. Una alícuota de 50 mL se vertió en un matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad (cada ensayo se realizó por triplicado), se adicionaron 1,5 mL de inóculo estándar y se taparon los 20 matraces con tapones de algodón. Seguidamente, se dispusieron los matraces en un agitador orbital a 150 rpm manteniendo una temperatura de incubación de 30°C .

Cada 24 h se recogió una alícuota de 2 mL con una pipeta estéril en cabina de flujo laminar y se midió la DQO hasta valor constante (3-5 días). La DQO puede medirse 25 mediante el uso de kits espectrofotométricos ($\lambda=448 \text{ nm}$) adecuados para el rango de medida conteniendo $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, H_2SO_4 , Ag_2SO_4 y HgSO_4 como reactivos e incubándose a 148°C durante 2 h. El método puede emplearse para muestras diluidas teniendo en cuenta que un gran exceso de DQO puede llevar a la indicación de resultados fuera de la gama de medida. En este caso se recomienda realizar un control de verosimilitud de los 30 resultados de medición mediante dilución. Todas las medidas se realizan por duplicado y periódicamente se realiza la medida de una disolución estándar.

Finalmente, se calculó la eficiencia de biodegradación mediante la expresión:

$$E_f = \frac{DQO_i - (DQO_f - DQO_m)}{DQO_i} \cdot 100$$

5 donde DQO_i es la DQO inicial aportada por la materia orgánica presente en el agua contaminada, DQO_f es la DQO medida al final del ensayo y DQO_m es la DQO remanente obtenida de un ensayo blanco. Si la eficiencia de biodegradación supera el 40% puede considerarse que el compuesto o el agua contaminada es "rápidamente biodegradable".

10

Se realizó un ensayo en blanco (por triplicado) procediendo de igual forma que con el agua problema pero utilizando agua destilada. Asimismo, se realizó un ensayo de viabilidad del inóculo inoculando durante 24 h a 150 rpm y 30°C con 200 μ L del stock de *P. putida* matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de medio recomendado por la
 15 CECT para la bacteria (extracto de buey, 1 g L⁻¹, extracto de levadura, 2 g L⁻¹, peptona, 5 g L⁻¹, NaCl, 5 g L⁻¹ y agar, 15 g L⁻¹) a pH 7.2 y se midió la densidad óptica a 600 nm. Todos los materiales se esterilizaron mediante autoclave a 126°C y 2 atm durante 20 minutos antes de su utilización.

REIVINDICACIONES

1. La invención consiste en el encapsulamiento de una proporción adecuada de bacteria
 5 *P. putida* liofilizada como microorganismo patrón y una mezcla de sales minerales. Cada
 cápsula contiene un gramo de bacteria liofilizada y 0,16 g de NH₄Cl, 0,16 g de K₂HPO₄,
 0,16 g de KH₂PO₄, 0,16 g de MgSO₄·7H₂O, 0,11 g de CaCl₂·2H₂O, 0,11 g de
 MnSO₄·H₂O, 0,08 g de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O, 0,02 g de ZnSO₄·7H₂O y 0,02 g de ácido
 nitrilotriacético.

10

2. El procedimiento para evaluar la biodegradabilidad rápida de aguas mediante el
 método objeto de protección consiste en:

15

a) Preparación de un inóculo de *P. putida* mediante disolución y homogeneizado
 del contenido de la cápsula preparada según la reivindicación 1 en 10 mL de una
 disolución estéril de NaCl al 0,9%.

20

b) Inoculación de 50 mL del agua objeto de análisis (ajustada a pH 7 y esterilizada
 mediante filtración) con 1,5 mL del inóculo previamente descrito, en un matraz
 Erlenmeyer de 250 mL de capacidad a 30°C de temperatura y agitación orbital.

c) Muestreo y medida de la DQO. Repetir cada 24 h durante 3–5 días hasta
 obtener un valor constante de DQO (variación inferior al 10% entre dos días
 consecutivos).

d) Determinación de la biodegradabilidad rápida mediante el cálculo de la
 eficiencia de biodegradación:

$$E_f = \frac{DQO_i - (DQO_f - DQO_m)}{DQO_i} \cdot 100$$

25

donde DQO_i es la DQO inicial aportada por la materia orgánica presente en el
 agua contaminada, DQO_f es la DQO medida al final del ensayo y DQO_m es la
 DQO remanente obtenida de un ensayo blanco.



②① N.º solicitud: 201300029

②② Fecha de presentación de la solicitud: 21.12.2012

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
X A	WO 2005033021 A1 (PAKOZDI LASZLO et al.) 14.04.2005, reivindicaciones.	1 2
X A	ES 2127703 A1 (UNIV SALAMANCA) 16.04.1999, reivindicaciones.	1
A	ES 2085239 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION) 16.05.1996, todo el documento.	1,2
A	WO 9321348 A1 (BARTL LUDWIG et al.) 28.10.1993, todo el documento.	1,2
A	US 4843009 A (BOPP LAWRENCE H) 27.06.1989, todo el documento.	1,2

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 n.º:

Fecha de realización del informe
17.10.2013

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C02F3/00 (2006.01)

C02F3/34 (2006.01)

C12R1/40 (2006.01)

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

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, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.10.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1,2	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 2	SI
	Reivindicaciones 1	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2005033021 A1 (PAKOZDI LASZLO et al.)	14.04.2005
D02	ES 2127703 A1 (UNIV SALAMANCA)	16.04.1999
D03	ES 2085239 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION)	16.05.1996
D04	WO 9321348 A1 (BARTL LUDWIG et al.)	28.10.1993
D05	US 4843009 A (BOPP LAWRENCE H)	27.06.1989

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención divulga en la primera reivindicación una mezcla de *P. putida* y sales minerales en distintas proporciones. La segunda reivindicación caracteriza un procedimiento de evaluación de la biodegradabilidad rápida de aguas que consiste en la preparación de un inóculo de *P. putida* y adición al agua objeto de análisis, el muestreo de la determinación química de oxígeno (DQO) de la muestra y la determinación de la biodegradabilidad mediante el cálculo de la eficiencia de biodegradación aplicando la fórmula del apartado d) de la reivindicación.

D01 divulga un procedimiento para la limpieza de la fase acuosa del estiércol líquido usando una sustancia microbiana, inoculándola a la fase acuosa del estiércol líquido, en concreto de estiércol líquido de cerdo, con una sustancia que contiene una mezcla bacteriana de: *Bacillus megatherium*, *Bacillus astuta*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* y *Micrococcus roseus*, con el objetivo de su posterior uso como abono de suelos.

D02 divulga el uso de *P. putida* en la degradación de azocolorantes en el tratamiento de aguas residuales textiles.

D03 a D05 divulgan diversos usos de *P. putida* en procesos de biodegradación de distintos contaminantes (hidrocarburos, PCBs en aguas residuales).

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga un encapsulamiento que contenga la bacteria *P. putida* junto a una mezcla de sales inorgánicas, por lo que la reivindicación 1 sería nueva, según se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986. Sin embargo, dado que la adición de sales inorgánicas al inóculo de *P. putida* no parece reportar ningún efecto sorprendente a la bacteria en sí, la elaboración de una mezcla *P. putida* y sales inorgánicas sería obvio para el experto en la materia en el campo de la depuración de aguas residuales, por lo que la reivindicación 1 carecería de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986.

La reivindicación 2 divulga como objeto de la invención un procedimiento para evaluar la biodegradabilidad rápida de aguas mediante el uso de *P. putida* y el cálculo de la eficiencia de biodegradación en base a los parámetros de DQO. Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulgan un procedimiento con las mismas características que el reivindicado, ni tampoco se puede derivar de manera obvia a partir de los documentos citados, tomados solos o en combinación. Así pues, la reivindicación 2 parece cumplir con los requisitos de novedad y actividad inventiva, tal y como se menciona en los arts. 6 y 8 de la ley 11/1986.