

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 491 965**

21 Número de solicitud: 201330334

51 Int. Cl.:

C02F 3/34 (2006.01)

C02F 9/14 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C02F 101/30 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

C12R 1/38 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

08.03.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

08.09.2014

71 Solicitantes:

BIO-ILIBERIS RESEARCH & DEVELOPMENT S.L.
(49.0%)
Avda. Cervantes, 12-2º C
18008 Granada ES y
INGENIERÍA Y ECONOMÍA DEL TRANSPORTE,
S.A. (51.0%)

72 Inventor/es:

NIQUI ARROYO, José Luis;
FERNÁNDEZ CIFUENTES, Sonia;
ROCA HERNÁNDEZ, Amalia De Arrixaca y
SOLANO PARADA, Jennifer

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **PROCEDIMIENTO BIOLÓGICO PARA LA DEGRADACIÓN DE MEZCLAS COMPLEJAS DE HIDROCARBUROS EN FASE ACUOSA**

57 Resumen:

Procedimiento biológico para la degradación de mezclas complejas de hidrocarburos en fase acuosa. El procedimiento biológico para reducir el contenido de hidrocarburos presentes en un medio acuoso que comprende una mezcla de hidrocarburos que contiene, al menos, un alcano alifático; al menos, un hidrocarburo aromático policíclico (HAP); y, al menos, un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, o-xileno, m-xileno, p-xileno y sus combinaciones, comprende poner en contacto dicho medio acuoso contaminado por dicha mezcla de hidrocarburos con una mezcla bacteriana que comprende, al menos, una bacteria que degrada un alcano alifático; al menos una bacteria que degrada un HAP; y, al menos, una bacteria que degrada dicho hidrocarburo aromático. El procedimiento puede incluir un tratamiento químico o fotoquímico previo al biológico del medio acuoso contaminado. Se describen bacterias capaces de degradar dichos hidrocarburos.

ES 2 491 965 A2

DESCRIPCIÓN

Procedimiento biológico para la degradación de mezclas complejas de hidrocarburos en fase acuosa.

5

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se relaciona, en general, con la eliminación de hidrocarburos presentes en mezclas complejas de hidrocarburos en fase acuosa. En particular, la invención se relaciona con la degradación *in-situ* de una mezcla compleja de hidrocarburos en fase acuosa mediante un procedimiento biológico basado en el uso de unas bacterias capaces de degradar dichos hidrocarburos, opcionalmente combinado con un procedimiento fisicoquímico o fotoquímico. La invención también se relaciona con unas bacterias capaces de degradar dichos hidrocarburos, así como con unas mezclas de dichas bacterias opcionalmente junto con otras bacterias capaces de degradar hidrocarburos.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Durante las últimas décadas el uso de combustibles fósiles no ha cesado de aumentar paulatinamente en todo el mundo, especialmente en lo que se refiere a los productos derivados del petróleo, tales como gasoil, gasolina, querosenos, etc. Desgraciadamente este aumento de consumo se ha traducido al mismo tiempo en la generación de un mayor volumen de residuos, los cuales deberán ser sometidos necesariamente a algún tipo de tratamiento que minimice sus efectos negativos sobre el medio ambiente. Todas aquellas instalaciones donde se lleven a cabo actividades que generen residuos deberán implantar un sistema de gestión ambiental acorde con los estándares adecuados, requisito éste de obligado cumplimiento para la obtención de la correspondiente certificación ambiental o autorización de vertido. Una adecuada gestión de todos los residuos generados en cualquier actividad, ya estén catalogados o no como residuos tóxicos y peligrosos (RTPs), facilita el desarrollo sostenible de dicha actividad, haciéndola compatible al mismo tiempo con el medioambiente. En todo sistema de gestión ambiental, y siempre que las circunstancias particulares lo permitan, la reutilización, revalorización y/o reciclaje de dichos residuos deberá prevalecer sobre otros tratamientos menos respetuosos con el medio, como por ejemplo la inertización, incineración o depósito en vertederos. Los residuos peligrosos precisan de un mayor control y vigilancia, y a diferencia de los no peligrosos, no pueden ser libremente manipulados y requieren por tanto la intervención de un gestor autorizado para su retirada y procesamiento.

20

25

30

35

En el caso particular de fases acuosas contaminadas con hidrocarburos, ámbito de aplicación de esta invención, e independientemente de la naturaleza de la actividad que genere el residuo, una instalación típica para la separación del hidrocarburo incluye una serie de etapas, en las que por medios meramente físicos, tales como tamizado, filtración, sedimentación o coalescencia, se lleva a cabo la separación tanto de los sólidos como de los hidrocarburos contenidos en las aguas de entrada a la unidad separadora. Las aguas clarificadas abandonan de forma continua el separador dirigiéndose hacia el punto de vertido autorizado. La calidad de estas aguas, de acuerdo con los parámetros establecidos por el Plan Hidrológico correspondiente, deberá ser avalada mediante análisis físicos y químicos periódicos realizados por un servicio acreditado de control de calidad de aguas. Aún así, y de forma periódica, un gestor autorizado deberá proceder a la retirada de la fase acuosa contaminada que permanece en el separador y eventualmente, cuando sea necesario, también de los sólidos acumulados en el fondo del separador. No obstante, los gastos generados como consecuencia de la gestión y tratamiento de estos residuos son elevados, debiendo realizarse un número variable de vaciados anuales, que dependerá fundamentalmente del régimen de lluvias registrado y/o del volumen de sólidos acumulados en la unidad separadora. Sobre el generador del residuo

40

45

50

recaen asimismo los costes relacionados con el transporte de éste hasta la planta de tratamiento así como los gastos del tratamiento propiamente dicho.

5 Los niveles de referencia impuestos por las distintas autoridades medioambientales, con una
marcada tendencia a ser cada vez más restrictivos, han venido impulsando desde hace tiempo
el desarrollo de tecnologías eficaces y de bajo coste que apliquen el principio básico de la
eliminación del contaminante antes que un cambio de fase o su traslado a una ubicación
10 diferente. En este contexto, el tratamiento biológico *in-situ* de los contaminantes orgánicos es
considerado hoy en día como una alternativa razonable frente a otros tratamientos más
“tradicionales”, siempre y cuando las circunstancias específicas no requieran una actuación a
corto plazo. Estos tratamientos biológicos se basan en la capacidad de ciertos
microorganismos, generalmente aerobios, para degradar los compuestos de interés,
15 transformándolos en productos de menor peligrosidad o completamente inocuos. No obstante,
para que la degradación biológica tenga lugar deben de cumplirse dos requisitos básicos: 1)
disponer de microorganismos capaces de degradar el contaminante o contaminantes objetivo y
2) que el contaminante se encuentre en una forma disponible y accesible para su interacción
con el microorganismo, o bien que el propio microorganismo, mediante algún proceso
biológico, como por ejemplo la producción de biosurfactantes, lo haga biodisponible.
20 En este sentido, los alcanos alifáticos habitualmente presentes en combustibles de amplio uso
tales como gasolina o gasoil, y en otros más específicos como Jet A1, de empleo frecuente en
aviación comercial, pueden ser aprovechados como fuente de carbono y energía por una
relativamente amplia variedad de microorganismos. Está documentada la capacidad de
bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* (Singer y Finnerty, “Microbial
25 Metabolism of straight-chain and branched alkanes” (1984), Atlas R.M. Ed. Petroleum
Microbiology, McMillan Publishing, Co, USA; 2-32) *Arthrobacter* y *Bacillus* (Kachholz y Rehm,
“Degradation of long-chain alkanes by Bacilli II. Metabolic pathways”. European Journal of
Applied Microbiology, 6; 39-54) para degradar alcanos alifáticos con cadenas de entre 13 y 20
carbonos (Vivas-Jiménez et al., “Identificación y caracterización de una bacteria degradadora
30 de parafinas”, (2008), Investigación Universitaria Multidisciplinaria, 51-60). Se ha comprobado
incluso que la degradación de algunos compuestos aromáticos por *Pseudomonas* depende en
algunos casos de los metabolitos producidos durante la degradación de alcanos alifáticos por
especies de *Acinetobacter* (Kamukai-Nakamura et al., “Construction of bacterial consortes that
degrade Arabian light crude oil”, (1996), Journal of Fermentation and Bioengineering, 82 (6);
35 570-574). Sin embargo, no existen demasiados informes sobre microorganismos capaces de
degradar alcanos alifáticos de más de 20 carbonos. Se ha descrito que la cepa *Acinetobacter*
sp M-1 es capaz de degradar compuestos de hasta 44 carbonos (Sakai et al., “Use of long-
chain n-alkanes (C13-C44) by an isolate, *Acinetobacter* sp M-1”, (1994), Biosci. Biotech.
Biochem., 58; 2128-2130) en tanto que *Acinetobacter calcoaceticus* S30 hace lo propio con
40 octacosano, alcano alifático de 28 carbonos (Lai et al., “Mineralisation of ¹⁴C-octacosane by
Acinetobacter calcoaceticus S30”, (1996), Can. J. Microbiol., 42; 1225-1231). Asimismo, la
cepa *Arthrobacter nicotianae* KCCB35 degrada compuestos de hasta 40 carbonos (Radwan et
al., “Uptake and utilization of n-octacosane and n-nonacosane by *Arthobacter nicotianae*
KCCB35”, (1996), J.Appl. Bacteriol., 80; 370-374) mientras que la cepa *Rhodococcus* sp. Q15
45 muestra capacidad para la degradación a baja temperatura no sólo de alcanos alifáticos puros
(de 8 a 32 carbonos) sino también mezclas de éstos, como por ejemplo diesel (Whyte et al.,
“Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperature by a psychotropic
Rhodococcus”, (1998), Appl. Environ. Microbiol., 64; 2578-2584). Vivas-Jiménez y col. aislaron y
caracterizaron la cepa *Pseudomonas aeruginosa* AP-1, que mostró actividad degradadora
50 para alcanos alifáticos entre 11 y 40 carbonos, con un máximo para el eicosano, compuesto
alifático de 20 carbonos (Salgado-Brito et al., “Degradación de n-alcanos por *Pseudomonas*
aeruginosa MGP-1”, (2008), Investigación Universitaria Multidisciplinaria, 7; 123-132).

Por su parte, los compuestos aromáticos destacan en general por presentar una marcada
estabilidad termodinámica, consecuencia de la energía de resonancia asociada a la

deslocalización de los electrones π en los anillos bencénicos (Mastandrea et al., "Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos", (2005), Acta Bioquim. Clin. Latinoam., 39 (1); 27-36). Constituidos en su mayoría, y de forma similar a los alcanos, por átomos de carbono e hidrógeno, muestran una elevada hidrofobicidad, lo que unido a su estabilidad les convierte en compuestos especialmente recalcitrantes y persistentes en el medio ambiente. Dentro de los compuestos aromáticos, los BTEX (acrónimo de benceno, tolueno, etilbenceno y mezcla de xilenos) y los HAPs (hidrocarburos aromáticos policíclicos) destacan por su amplia distribución en el medioambiente. Los primeros son compuestos metilados derivados del benceno en tanto que los segundos son compuestos que presentan estructuras con un número variable de anillos bencénicos condensados, ya sea en disposición lineal o angular. La procedencia de estos compuestos es variada pero las fuentes más importantes son la pirolítica y la petrogénica. En la fuente pirolítica se encuadran todas aquellas combustiones incompletas de la materia orgánica, bien de forma natural (actividad volcánica, incendios forestales, etc.), o bien antropogénica (uso de combustibles fósiles, ya sea en motores de explosión o en calefacción, incineración de residuos, procesos industriales, uso de sustancias que incorporen a estos compuestos en su composición, etc.). El calor generado a las elevadas temperaturas alcanzadas durante los procesos de combustión produce la rotura de los compuestos orgánicos, generándose una serie de fragmentos y radicales que se recombinan para dar lugar a los HAPs.

Se han descrito varios géneros bacterianos que tienen la capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), entre los que se encuentran *Mycobacterium*, *Sphingomonas* (Uyttebroek, M., Ortega-Calvo, J.J., Breugelmans, P y Springael, D. "Comparison of mineralization of solid-sorbed phenanthrene by polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Mycobacterium* spp. and *Sphingomonas* spp". Appl Microbiol Biotechnol 72(4):829-36. 2006), *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas* (Molina, M.C., González, N., Bautista, L.F., Sanz, R., Simarro, R., Sánchez, I., y Sanz, J.L. "Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium". Biodegradation 20(6):789-800. 2009) y *Acidovorax* sp. (Singleton D.R., Ramirez, L.G and Aitken, M.D. "Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon degradation gene cluster in a phenanthrene-degrading *Acidovorax* strain". Appl Environ Microbiol 75(9):2613-20. 2009).

En el caso particular de los alcanos, cuanto menor sea la longitud de la cadena hidrocarbonada menor será también su resistencia a la biodegradación, por lo que la rotura previa de los compuestos con un peso molecular relativamente alto (a partir de 15-20 carbonos) o bien de aquéllos alcanos que presenten ramificaciones o estructuras cíclicas (cicloalcanos), puede favorecer su biodegradación en mezclas complejas de hidrocarburos (HCs) sometidas a un posterior tratamiento biológico. Este tratamiento biológico deberá ser llevado a cabo preferiblemente por un consorcio o mezcla de microorganismos que en conjunto permitan degradar un amplio espectro de hidrocarburos. De la misma manera se pueden atacar los compuestos aromáticos mono o policíclicos, los cuales podrían ser más fácilmente biodegradados en el caso de que los anillos fuesen atacados previamente por otros medios.

Los procesos de oxidación avanzados (POAs), como vía para promover la rotura inicial de las moléculas de mayor tamaño en otras más pequeñas, pueden ser una opción interesante para el tratamiento previo de mezclas complejas de hidrocarburos, ya que facilitarían de una manera significativa el desarrollo de los procesos biológicos que fuesen aplicados posteriormente. De hecho, existen estudios que evidencian un aumento en la biodegradación de compuestos recalcitrantes, tales como dinitrotolueno y 4-nitroanilina, en efluentes sometidos previamente a un tratamiento de oxidación con peróxido de hidrógeno y ozono (Saupe et al., "Ozonation of 2,4-dinitrotoluene and 4-nitroaniline as well as improved dissolved organic carbon removal by sequential ozonation-biodegradation", (1998), Wat. Environ. Res., 70; 146-154). Gutiérrez et al. también encontraron un aumento en el índice de biodegradabilidad en aguas de formación tras un tratamiento con ozono (Gutiérrez et al., "Efecto de la aplicación de ozono sobre la

- biodegradabilidad de aguas de formación”, (2002), *Multiciencias* 2; 50-54). Un pretratamiento similar condujo a una mejora en la biodegradabilidad de alpechín, residuo de conocida resistencia al ataque bacteriano (Beltrán de Heredia et al., “Treatment of black-olive waste-waters by ozonation and aerobic biological degradation”, (2000), *Wat. Res.* 34; 3314-3522). Los POAs han ido adquiriendo un mayor protagonismo en el tratamiento de aguas residuales y los estudios sobre sus posibles aplicaciones han aumentado considerablemente en los últimos años. Se han mostrado eficaces también en el tratamiento de pesticidas (Prado et al., “Comparison of different advanced oxidation processes involving ozone to eliminate atrazine”, (1999), *Ozone Science and Engineering*, 21; 39-52), productos farmacéuticos (Quispe et al., “Degradación de compuestos farmacéuticos en agua por ozonización”, (2008), *Rev. Soc. Quim. Perú*, 74; 260-268), compuestos orgánicos clorados, tales como clorobencenos (Cortés et al., “Estudio de degradación química de clorobencenos mediante técnicas de oxidación avanzadas”, (1997), *Medio Ambiente-RETEMA*, 58; 70-74) y derivados del cloroetileno (Kubasake et al., “Destruction rate of volatile organochlorine compounds in water by ozonation with UV radiation”, (1991), *Wat. Res.* 25; 1199-1203). Un aditivo habitual en los combustibles es el metil tert-butil éter (MTBE), el cual ha sido también tratado con éxito mediante una mezcla de peróxido de hidrógeno y ozono (Safarzadeh-Amiri et al., “O₃/H₂O₂ treatment of methyl-tert-butyl ether (MBTE) in contaminated waters”, (2001), *Wat. Res.* 35; 3706-3714).
- Los POAs presentan como principales ventajas que: a) pueden aplicarse para el tratamiento de casi la totalidad de aguas residuales que incorporen compuestos orgánicos recalcitrantes, b) son susceptibles de ser usados de forma individual o bien combinados entre ellos mismos o con tratamientos de agua convencionales y c) son idóneos para la eliminación de compuestos formados durante otros tratamientos previos, ya que son efectivos incluso a muy bajas concentraciones de contaminante (Domènech et al., “Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes”, (2001), RED CYTED VIII-G, Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires, Capítulo 1, 3-26). Estos tratamientos se basan en general en el fuerte poder oxidante asociado a los radicales libres (R·), especies químicas transitorias que se caracterizan por poseer electrones desapareados en la molécula, lo cual les confiere una gran reactividad y por consiguiente, unos tiempos de vida media extremadamente cortos (Glaze et al., “The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation”, (1987), *Ozone Science and Engineering*, 9; 335-352). Destaca especialmente el radical hidroxilo (OH·), con un potencial de oxidación de 2,80 V, solo superado por el del flúor, y con capacidad para atacar a prácticamente todos los compuestos orgánicos, siendo su velocidad de reacción del orden de 10⁶-10¹² veces superior a la del ozono (Domènech et al., “Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes”, (2001), RED CYTED VIII-G, Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires, Capítulo 1, 3-26). Aunque los procesos radicalarios son por sí mismos complejas reacciones en cadena, y por lo tanto, autoalimentados, la eficacia en la generación de nuevos radicales libres puede acelerarse mediante un aporte adicional de energía, generalmente en forma de radiación ultravioleta (UV), normalmente a longitudes de onda (λ) de 254 nm o inferiores (POAs fotoquímicos).
- La presente invención se relaciona, por tanto, con la implementación de un sistema de tratamiento *in-situ* de residuos acuosos contaminados con hidrocarburos mediante un tratamiento biológico del contaminante que, opcionalmente, puede verse complementado con diversos pretratamientos de naturaleza fisicoquímica o fotoquímica o bien con diferentes combinaciones de éstos. Esto disminuye de forma notable los costes asociados a la gestión de los residuos al tiempo que significa una desaparición efectiva del contaminante y facilita la reutilización de estas aguas para otras actividades o usos.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Los inventores han identificado bacterias de los géneros *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Pseudoxanthomonas*, con capacidad para degradar alcanos alifáticos con cadenas de 8 a 36 átomos de carbono, compuestos aromáticos mono- y policíclicos de hasta 3 anillos bencénicos (cuando incorporan, por ejemplo, el plásmido TOL (pWW0) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), por lo que pueden utilizarse solas o combinadas con otros microorganismos para degradar alcanos alifáticos, por ejemplo, octano, dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, triacontano, hexatriacontano, etc., compuestos aromáticos mono- y poli-cíclicos de hasta 3 anillos bencénicos, por ejemplo, BTEX, etc., y HAPs, por ejemplo, naftaleno, fenantreno, etc., en un proceso que permite eliminar hidrocarburos en fases acuosas contaminadas. Las bacterias identificadas presentan además capacidad de adhesión a un soporte de material plástico, por lo que pueden ser aplicadas a la biorremediación de fases acuosas contaminadas con hidrocarburos en forma de biofilm o biopelícula adheridos a algún tipo de superficie sólida.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

1. Procedimiento biológico para reducir el contenido de hidrocarburos en un medio acuoso que comprende dichos hidrocarburos

En un aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento biológico para reducir el contenido de hidrocarburos presentes en un medio acuoso que comprende una mezcla de hidrocarburos, en adelante "procedimiento de la invención", en donde dicha mezcla de hidrocarburos comprende

- a) un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, triacontano, hexatriacontano y sus combinaciones;
- b) un hidrocarburo aromático policíclico (HAP) seleccionado del grupo formado por naftaleno y fenantreno, y sus combinaciones; y
- c) un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno y sus combinaciones (BTEX),

comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicho medio acuoso contaminado por dicha mezcla de hidrocarburos con una mezcla bacteriana que comprende

- al menos una bacteria que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, triacontano, hexatriacontano y sus combinaciones;
- al menos una bacteria que degrada un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones; y
- al menos una bacteria que degrada un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno y sus combinaciones (BTEX).

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "reducir el contenido de hidrocarburos presentes en un medio acuoso que comprende una mezcla de hidrocarburos" incluye tanto la eliminación prácticamente total de los hidrocarburos presentes en dicho medio acuoso que comprende dicha mezcla de hidrocarburos como la reducción de la cantidad de hidrocarburos

5 presentes en dicho medio acuoso que comprende dicha mezcla de hidrocarburos, en donde dicha mezcla de hidrocarburos comprende los hidrocarburos cuyo contenido se desea reducir. Ventajosamente, el contenido de hidrocarburos en dicho medio acuoso es reducido, mediante el procedimiento de la invención, hasta niveles permitidos por la legislación o que no resulten nocivos para la salud humana o animal y/o para el medio ambiente. Por tanto, la expresión “reducir el contenido de hidrocarburos presentes en un medio acuoso que comprende una mezcla de hidrocarburos”, en el sentido utilizado en esta descripción, es sinónima o equivalente a degradar hidrocarburos presentes en un medio acuoso que comprende una mezcla de hidrocarburos, en donde dicha mezcla de hidrocarburos comprende la totalidad o parte de los hidrocarburos a degradar.

10 El procedimiento de la invención es un “procedimiento biológico”, es decir, es un procedimiento basado en la capacidad de ciertos microorganismos, generalmente aerobios, para degradar los compuestos de interés, transformándolos en productos de menor peligrosidad o completamente inocuos. Aplicado a la presente invención, el procedimiento biológico de reducción del contenido (o degradación) de los hidrocarburos presentes en un medio acuoso que comprende una mezcla de hidrocarburos es un procedimiento basado en la capacidad de ciertas bacterias aerobias para degradar dichos hidrocarburos, tales como los alcanos alifáticos, HAPs y BTEX contenidos en la mezcla de hidrocarburos, transformándolos en productos de menor peligrosidad o completamente inocuos.

15 En el sentido utilizado en la presente descripción, el término “mezcla de hidrocarburos” incluye cualquier mezcla de hidrocarburos que comprende:

- 25 a) un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, triacontano, hexatriacontano y sus combinaciones;
- 30 b) un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno y fenantreno, y sus combinaciones; y
- c) un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno y sus combinaciones (BTEX)

35 La composición concreta de la mezcla de hidrocarburos puede variar ampliamente a nivel de los hidrocarburos presentes en dicha mezcla, aunque deberá contener, al menos, un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, triacontano, hexatriacontano y sus combinaciones, al menos, un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno y fenantreno, y sus combinaciones, y, al menos, un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno y sus combinaciones (BTEX).

45 Asimismo, la cantidad o concentración de cada hidrocarburo presente en dicha mezcla de hidrocarburos puede variar ampliamente dependiendo, entre otros factores, del origen de la mezcla de hidrocarburos. De hecho, las fracciones mayoritarias de hidrocarburos presentes en dicha mezcla de hidrocarburos también pueden variar ampliamente; no obstante, en una realización particular, las fracciones mayoritarias comprenden las fracciones de los alcanos alifáticos $C_{21}-C_{34}$ y $C_{12}-C_{16}$; es decir, aquellas fracciones de hidrocarburos saturados de cadena lineal que contienen entre 21 y 34 átomos de carbono ($C_{21}-C_{34}$) o entre 12 y 16 átomos de carbono ($C_{12}-C_{16}$) [en el sentido utilizado en esta descripción, la notación “ C_n-C_m ”, donde “n” y “m” son números enteros, se refiere al número de átomos de carbono (“n”, “m”) presentes en el hidrocarburo; así una fracción de alcanos alifáticos $C_{21}-C_{34}$ se refiere a la fracción de alcanos alifáticos que tienen entre 21 y 34 átomos de carbono, ambos inclusive].

El origen de la mezcla de hidrocarburos puede ser muy variado; a modo ilustrativo, dicha mezcla de hidrocarburos puede proceder de instalaciones petroleras, instalaciones aeroportuarias, estaciones de servicio, talleres mecánicos, aparcamientos o zonas de lavado de vehículos, marinas o puertos, etc.

5

En una realización particular, dicha mezcla de hidrocarburos comprende una mezcla de hidrocarburos que puede encontrarse en el petróleo o en sus productos derivados (e.g., gasolinas, gasóleos, fuel-oils, etc.). Aunque puede haber cientos de compuestos en una muestra de petróleo o sus derivados (por ejemplo, alcanos alifáticos, tales como octano, dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, triacontano, hexatriacontano, etc.; HAPs, tales como naftaleno, fenantreno, etc., hidrocarburos aromáticos, tales como BTEX, etc.) no todos los compuestos se encuentran simultáneamente en una determinada muestra de petróleo o sus derivados. Debido a que el petróleo y sus productos derivados incluyen una pluralidad de compuestos químicos, entre ellos numerosos hidrocarburos diferentes, no resulta práctico medirlos o cuantificarlos cada uno de ellos de forma separada; sin embargo, sí resulta útil medir la cantidad de hidrocarburos totales de petróleo o "TPH" (del inglés "Total Petroleum Hydrocarbons") en una determinada muestra de petróleo o sus derivados, o en un medio acuoso que contenga dicha mezcla de hidrocarburos.

10

15

20

25

En el sentido utilizado en la presente descripción, la expresión "medio acuoso que comprende una mezcla de hidrocarburos" incluye cualquier medio acuoso (es decir, cualquier fase líquida que comprende agua) que contiene la mezcla de hidrocarburos previamente definida. En una realización particular, dicho medio acuoso comprende una mezcla de hidrocarburos que comprende, al menos, un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, triacontano, hexatriacontano y sus combinaciones; al menos, un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones, y, al menos, un hidrocarburo seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno y sus combinaciones (BTEX).

30

El origen del medio acuoso que comprende dicha mezcla de hidrocarburos puede ser muy variado; de hecho, prácticamente cualquier medio acuoso que comprenda una mezcla de hidrocarburos tal como la definida previamente puede ser sometida al procedimiento de la invención. A modo ilustrativo, no limitativo, dicho medio acuoso que comprende dicha mezcla de hidrocarburos puede ser un medio acuoso contaminado con una mezcla de hidrocarburos que comprende, al menos, un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, triacontano, hexatriacontano y sus combinaciones; al menos, un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones, y, al menos, un hidrocarburo seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno y sus combinaciones (BTEX), tal como, por ejemplo, aguas residuales recogidas en una unidad separadora de hidrocarburos (SPH), aguas residuales contaminadas con vertidos de dichos hidrocarburos o de fases orgánicas que los contengan, tales como gasoil, gasolina, Jet A1, aguas residuales recogidas en las estaciones de servicio o talleres mecánicos, etc.

35

40

45

La concentración inicial de hidrocarburos presente en el medio acuoso que comprende dicha mezcla de hidrocarburos puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, dicho medio acuoso presenta una concentración inicial de hidrocarburos comprendida entre aproximadamente 100 partes por millón (ppm) y 500.000 ppm o incluso superiores, típicamente entre 150 ppm y 80.000 ppm. La concentración de hidrocarburos totales (TPHs totales) y de cada una de las fracciones indicadas: alifáticos (C₅-C₈, C₈-C₁₀, C₁₀-C₁₂, C₁₂-C₁₆, C₁₆-C₂₁ y C₂₁-C₃₄) y aromáticos (C₈-C₁₀, C₁₀-C₁₂, C₁₂-C₁₆, C₁₆-C₂₁ y C₂₁-C₃₅) puede realizarse por métodos convencionales; en una realización particular, la concentración de TPHs y de cada una de las fracciones indicadas (alifáticos y aromáticos) se determinan mediante un

50

método de separación de cadenas y cuantificación de las distintas fracciones mediante la técnica de cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS). La extracción de los hidrocarburos de la fase acuosa, en una realización particular, se realiza mediante extracción líquido-líquido empleando diclorometano como fase extractante. El contenido en BTEX de las muestras (benceno, tolueno, etilbenceno y formas *o*-, *m*- y *para*- de xilenos) se determina de forma individual para cada uno de los compuestos siguiendo el mismo procedimiento de extracción y medida que el indicado para los TPHs. Las fracciones mayoritarias de los hidrocarburos presentes en dicho medio acuoso que comprende la mezcla de hidrocarburos pueden variar ampliamente; no obstante, en una realización particular, las fracciones mayoritarias comprenden las fracciones de alcanos alifáticos C_{21} - C_{34} y C_{12} - C_{16} . En el Ejemplo 3 se indica la concentración inicial de hidrocarburos (TPHs) presente en un medio acuoso que comprende una mezcla de hidrocarburos procedente de una unidad SPH sometido al procedimiento de la invención, indicando las fracciones mayoritarias presentes así como la distribución porcentual de las distintas fracciones de hidrocarburos.

El procedimiento de la invención comprende poner en contacto el medio acuoso que comprende una mezcla de hidrocarburos, tal como se ha definido previamente, con una mezcla bacteriana, en adelante "mezcla bacteriana de la invención", que comprende

- al menos una bacteria que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, triacontano, hexatriacontano y sus combinaciones;
- al menos una bacteria que degrada un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones; y
- al menos una bacteria que degrada un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno y sus combinaciones (BTEX).

Bacterias que degradan alcanos alifáticos

La mezcla bacteriana de la invención puede contener prácticamente cualquier bacteria que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, triacontano, hexatriacontano y sus combinaciones. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas bacterias incluyen bacterias de los géneros *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, que degradan alcanos alifáticos de 5 a 44 átomos de carbono tal como se indica en los Antecedentes de la Invención, las cepas: *Acinetobacter* sp M-1 (que degrada hidrocarburos de hasta 44 átomos de carbonos), *Acinetobacter calcoaceticus* S30 (que degrada octacosano), *Arthrobacter nicotianae* KCCB35 (que degrada hidrocarburos de hasta 40 átomos de carbono), *Rhodococcus* sp. Q15 (que degrada tanto alcanos alifáticos de 8 a 32 átomos de carbono puros como mezclas de dichos alcanos alifáticos), y *Pseudomonas aeuroginosa* AP-1 (que degrada alcanos alifáticos de entre 11 y 40 átomos de carbono, con un máximo para el eicosano). Ejemplos adicionales incluyen bacterias del género *Pseudomonas* que degradan hidrocarburos alifáticos 5 a 12 átomos de carbono (Whyte et al. "Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways" (1997), Appl. Environ. Microbiol., 63 (9) 3719-3723); cepas de *Pseudomonas fluorescens* que degradan hidrocarburos alifáticos de 14 a 18 átomos de carbono (Sepic et al., "Biodegradation studies of selected hydrocarbons from diesel oil" (1996), Analyst, 121, 1451-1456); cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que degradan hidrocarburos de 16 átomos de carbono (Shreve et al. "Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas*

5 *aeruginosa*" (1995) *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 4 (4), 331-337);
 arqueobacterias halófilas que degradan hidrocarburos alifáticos de 20 átomos de
 carbono (Bertrand et al. "Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic
archaebacterium" (1990), *Letters in Applied Microbiology*, 11(5), 260-263); cepas de
 10 *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* que degradan hidrocarburos alifáticos de 20
 átomos de carbono (Fernández-Linares et al. "Effect of Sodium Chloride Concentration
 on Growth and Degradation of Eicosane by the Marine Halotolerant Bacterium
Marinobacter hydrocarbonoclasticus" (1996), *Systematic and Applied Microbiology*, 19
 (1), 260-263); bacterias del género *Cornybacterium sp. 8* que degradan hidrocarburos
 alifáticos de 20 átomos de carbono (Acquaviva et al., "Effect of a synthetic surfactant on
 phenanthrene and n-eicosane utilization by two pure marine strains grown separately in
 batch cultures with or without sand particles" (2001), *World Journal of Microbiology and
 Biotechnology*, 17 (5), 481-485); la cepa *Acinetobacter calcoaceticus* S30 que degrada
 15 hidrocarburos alifáticos de 28 átomos de carbono (Banwari et al., "Mineralization of
 [14C]octacosane by *Acinetobacter calcoaceticus* S30" (1996), *Canadian Journal of
 Microbiology*, 42 (12), 1225-1231); la cepa *Arthrobacter nicotianae* KCCB35 que
 degrada hidrocarburos alifáticos de 28 y 29 átomos de carbono (Radwan et al., "Uptake
 and utilization of n-octacosane and n-nonacosane by *Arthrobacter nicotianae* KCCB35"
 (1996), *Journal of Applied Bacteriology*, 80, 370-374), etc. Otros ejemplos de bacterias
 20 que degradan hidrocarburos alifáticos de 12, 16 y 20 átomos de carbono han sido
 descritos por Olivera et al., "Alkane biodegradation by a microbial community from
 contaminated sediments in Patagonia, Argentina" (1997), *International Biodeterioration
 & Biodegradation*, 40 (1), 75-79. La mezcla bacteriana de la invención también puede
 25 contener mutantes de dichas bacterias y cepas que conservan la capacidad de
 degradar los hidrocarburos alifáticos correspondientes.

En una realización particular, la mezcla bacteriana de la invención comprende una
 bacteria que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano,
 eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones, tal
 30 como una bacteria del género *Rhodococcus* con capacidad para degradar dichos
 alcanos alifáticos. En una realización concreta, dicha bacteria del género *Rhodococcus*
 que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano,
 eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones es
 35 la bacteria *Rhodococcus sp. BIRD 7*, depositada en la Colección Española de Cultivos
 Tipo (CECT) con número de acceso CECT 8211, o una mutante de la misma que tiene
 la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por
 dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus
 combinaciones. Dicha bacteria *Rhodococcus sp. BIRD 7* (CECT 8211), o una mutante
 40 de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del
 grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano,
 hexatriacontano y sus combinaciones, ha sido aislada y caracterizada por los
 inventores, y constituye un aspecto adicional de la presente invención. Las
 características de dicha bacteria se mencionan en el apartado 2 de esta descripción y
 su obtención en el apartado 3 de esta descripción.

En otra realización particular, la mezcla bacteriana de la invención comprende una
 bacteria que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano,
 hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones, tal como una bacteria del
 género *Bacillus* con capacidad para degradar dichos alcanos alifáticos. En una
 50 realización concreta, dicha bacteria que degrada un hidrocarburo seleccionado del
 grupo formado por octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones
 es la bacteria *Bacillus sp. BIRD 8*, depositada en la CECT con número de acceso CECT
 8210, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar octano,
 hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones. Dicha bacteria *Bacillus sp.*

BIRD 8 (CECT 8210), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, hexadecano, octacosano, triacotano, y sus combinaciones, ha sido aislada y caracterizada por los inventores, y constituye un aspecto adicional de la presente invención. Las características de dicha bacteria se mencionan en el apartado 2 de esta descripción y su obtención en el apartado 3 de esta descripción.

En otra realización particular, la mezcla bacteriana de la invención comprende una bacteria que degrada dodecano, tal como una bacteria del género *Pseudomonas* con capacidad para degradar dicho alcano. En una realización concreta, dicha bacteria que degrada dodecano es la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9, depositada en la CECT con número de acceso CECT 8212, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano. Dicha bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano, ha sido aislada y caracterizada por los inventores, y constituye un aspecto adicional de la presente invención. Las características de dicha bacteria se mencionan en el apartado 2 de esta descripción y su obtención en el apartado 3 de esta descripción.

En otra realización particular, la mezcla bacteriana de la invención comprende una bacteria que degrada hexadecano, tal como una bacteria del género *Pseudomonas* con capacidad para degradar dicho alcano. En una realización concreta, dicha bacteria que degrada hexadecano es la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10, depositada en la CECT con número de acceso CECT 8213, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano. Dicha bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano, ha sido aislada y caracterizada por los inventores, y constituye un aspecto adicional de la presente invención. Las características de dicha bacteria se mencionan en el apartado 2 de esta descripción y su obtención en el apartado 3 de esta descripción.

En otra realización particular, la mezcla bacteriana de la invención comprende una bacteria que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones, tal como una bacteria del género *Acinetobacter* con capacidad para degradar dichos alcanos alifáticos. En una realización concreta, dicha bacteria que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones es la bacteria *Acinetobacter sp.* BIRD 11, depositada en la CECT con número de acceso CECT 8214, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano. Dicha bacteria *Acinetobacter sp.* BIRD 11 (CECT 8214), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones, ha sido aislada y caracterizada por los inventores, y constituye un aspecto adicional de la presente invención. Las características de dicha bacteria se mencionan en el apartado 2 de esta descripción y su obtención en el apartado 3 de esta descripción.

Bacterias que degradan HAPs

La mezcla bacteriana de la invención puede contener prácticamente cualquier bacteria que degrada un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas bacterias incluyen bacterias de los géneros *Acidovorax*, *Enterobacter*, *Mycobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Stenotrophomonas*, tal como se indica en los Antecedentes de la Invención. Ejemplos adicionales incluyen bacterias del género *Pseudomonas* que degradan naftaleno (Whyte et al. "Biodegradation of petroleum

hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways" (1997), Appl. Environ. Microbiol., 63 (9) 3719-3723); la cepa *Mycobacterium gilvum* VM552 que degrada fenantreno (Wick et al., "Influence of the growth substrate on the micolic acid profiles on *Mycobacterium*" (2002), Environmental Microbiology, 4 (10), 612-616); la cepa *Novosphingobium* sp. LH128 que degrada fenantreno (Bastiaens et al., "Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbent carriers" (2000), Applied and Environmental Microbiology, 66, 1834-1843); la cepa *Sphingomonas* sp. 2MP11 que degrada fenantreno (Acquaviva et al., "Effect of a synthetic surfactant on phenanthrene and n-eicosane utilization by two pure marine strains grown separately in batch cultures with or without sand particles" (2001), World Journal of Microbiology and Biotechnology, 17 (5), 481-485); etc. Ejemplos adicionales de bacterias que degradan naftaleno y fenantreno han sido descritas por Cerniglia, en "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons" (1992), Biodegradation, 3 (2-3), 351-368. La mezcla bacteriana de la invención también puede contener mutantes de dichas bacterias y cepas que conservan la capacidad de degradar los HAPs correspondientes.

En una realización particular, la mezcla bacteriana de la invención comprende una bacteria que degrada un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones, tal como una bacteria del género *Pseudoxanthomonas* con capacidad para degradar dichos HAPs. En una realización concreta, dicha bacteria del género *Pseudoxanthomonas* que degrada un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno y sus combinaciones es la bacteria *Pseudoxanthomonas* sp. BIRD 3, depositada en la CECT con número de acceso CECT 7607, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno y sus combinaciones. Dicha bacteria *Pseudoxanthomonas* sp. BIRD 3 (CECT 7607), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno y sus combinaciones, ha sido aislada y caracterizada por los inventores, y constituye un aspecto adicional de la presente invención. Las características de dicha bacteria se mencionan en el apartado 2 de esta descripción y su obtención en el apartado 4 de esta descripción.

Bacterias que degradan hidrocarburos aromáticos

La mezcla bacteriana de la invención puede contener prácticamente cualquier bacteria que degrada un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno y sus combinaciones (BTEX). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas bacterias incluyen bacterias del género *Pseudomonas*, tales como la cepa *Pseudomonas putida* KT2440 que degrada tolueno y xilenos (Nelson et al., "Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440" (2002), Environmental Microbiology, 4 (12), pags 799-808), la cepa *Pseudomonas putida* DOT-T1E que degrada tolueno (Ramos et al., "Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. Journal of Bacteriology" (1998), 180 (13), 3323-3329; Rojas et al., "Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E" (2001), Journal of Bacteriology, 183 (13), 3967-3973), la cepa *Pseudomonas putida* CCM I 852 que degrada benceno, tolueno y xilenos (Otenio et al., "Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCM I 852" (2005) , Brazilian Journal of Microbiology, 36, 258-261); la cepa *Pseudomonas putida* AY-10 que degrada benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (Young Lee et al., "Characterization biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes by the newly isolated bacterium *Pseudomonas putida* AY-10 in rhizosphere of wastewater treatment reed" (2011), 3rd International Conference on Chemical,

Biological and Environmental Engineering. IPCBEE vol. 20, IACSIT Press, Singapore, 37-41); bacterias que incorporan el plásmido TOL (pWW0) de *Pseudomonas putida* que confiere capacidad para degradar BTEX (Abril et al, Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansión of the substrate range of the pathway, 1989; J. Bacteriol., 171; 6782-6790); etc. La incorporación de dicho plásmido TOL (pWW0) en una bacteria puede realizarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante un mecanismo de conjugación bacteriano durante el cual se produce de una forma natural la transferencia de material genético desde una célula donadora a otra célula receptora; durante la conjugación, la célula donadora transmite parte de su material genético, en este caso un plásmido, a la célula receptora, transmitiéndole nuevas capacidades, que en el caso particular del plásmido TOL (pWW0), consiste en la degradación de hidrocarburos aromáticos tales como benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno, y sus combinaciones. La transferencia de información entre células donadoras y receptoras ocurre de una forma natural mediante el contacto directo entre ambas (Abril et al, Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansión of the substrate range of the pathway (1989), J. Bacteriol., 171; 6782-6790). En una realización particular, la bacteria que incorpora el plásmido TOL (pWW0) es la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212) a la que se la ha incorporado dicho plásmido TOL (pWW0) mediante un mecanismo de conjugación bacteriano como el mencionado previamente. En otra realización particular, la bacteria que incorpora el plásmido TOL (pWW0) es la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213) a la que se la ha incorporado dicho plásmido TOL (pWW0) mediante un mecanismo de conjugación bacteriano como el mencionado previamente. La mezcla bacteriana de la invención también puede contener mutantes de dichas bacterias y cepas que conservan la capacidad de degradar los hidrocarburos aromáticos correspondientes.

En una realización particular, la mezcla bacteriana de la invención comprende:

- a) al menos, una bacteria que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Rhodococcus* con capacidad para degradar dichos alcanos alifáticos, tal como la bacteria *Rhodococcus sp.* BIRD 7 (CECT 8211), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones;
- b) al menos, una bacteria que degrada un hidrocarburo seleccionado del grupo formado por octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Bacillus* con capacidad para degradar dichos alcanos alifáticos, tal como la bacteria *Bacillus sp.* BIRD 8 (CECT 8210), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones;
- c) al menos, una bacteria que degrada dodecano, por ejemplo, una bacteria del género *Pseudomonas* con capacidad para degradar dicho alcano, tal como la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano;
- d) al menos, una bacteria que degrada hexadecano, por ejemplo, una bacteria del género *Pseudomonas* con capacidad para degradar dicho alcano, tal como la

bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano;

- 5 e) al menos, una bacteria que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Acinetobacter* con capacidad para degradar dichos alcanos alifáticos, tal como la bacteria *Acinetobacter sp.* BIRD 11 (CECT 8214), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones;
- 10
- f) al menos, una bacteria que degrada un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Pseudoxanthomonas* con capacidad para degradar dicho HAP, tal como la bacteria *Pseudoxanthomonas sp.* BIRD 3 (CECT 7607), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones; y
- 15
- g) al menos, una bacteria que degrada un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno y sus combinaciones (BTEX), por ejemplo, una bacteria del género *Pseudomonas* con capacidad para degradar dicho hidrocarburo aromático, tal como *Pseudomonas putida* KT2440, *Pseudomonas putida* DOT-T1E, *Pseudomonas putida* CCM I 852, *Pseudomonas putida* AY-10, etc., y/o una bacteria que incorpora el plásmido TOL (pWW0) de *P. putida* que confiere capacidad para degradar BTEX, tal como, por ejemplo, la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212) a la que se la ha incorporado dicho plásmido TOL (pWW0), y/o la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213) a la que se la ha incorporado el plásmido TOL (pWW0), y, por tanto, tienen capacidad para degradar, además, BTEX.
- 20
- 25
- 30

En otra realización particular, cuando la bacteria que incorpora el plásmido TOL (pWW0), que confiere capacidad para degradar BTEX, es (i) la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano, o (ii) la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano, la mezcla bacteriana de la invención comprende:

35

- a) al menos, una bacteria que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Rhodococcus* con capacidad para degradar dichos alcanos alifáticos, tal como la bacteria *Rhodococcus sp.* BIRD 7 (CECT 8211), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones;
- 40
- 45
- b) al menos, una bacteria que degrada un hidrocarburo seleccionado del grupo formado por octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Bacillus* con capacidad para degradar dichos alcanos alifáticos, tal como la bacteria *Bacillus sp.* BIRD 8 (CECT 8210), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones;
- 50
- c) al menos, una bacteria que degrada dodecano, por ejemplo, una bacteria del género *Pseudomonas* con capacidad para degradar dicho alcano, tal como la bacteria

Pseudomonas sp. BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano;

- 5 d) al menos, una bacteria que degrada hexadecano, por ejemplo, una bacteria del género *Pseudomonas* con capacidad para degradar dicho alcano, tal como la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano;
- 10 e) al menos, una bacteria que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Acinetobacter* con capacidad para degradar dichos alcanos alifáticos, tal como la bacteria *Acinetobacter sp.* BIRD 11 (CECT 8214), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones; y
- 15 f) al menos, una bacteria que degrada un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Pseudoxanthomonas* con capacidad para degradar dicho HAP, tal como la bacteria *Pseudoxanthomonas sp.* BIRD 3 (CECT 7607), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones;
- 20

25 en donde, al menos, una de dichas bacterias c) *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano, o d) *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano, incorpora el plásmido TOL (pWW0), que confiere capacidad para degradar un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno y sus combinaciones (BTEX).

30

En una realización más particular, dicha bacteria que incorpora el plásmido TOL (pWW0) es la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano. En otra realización más particular, dicha bacteria que incorpora el plásmido TOL (pWW0) es la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano. En otra realización más particular, las bacterias que incorporan el plásmido TOL (pWW0) son las bacterias *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano, y *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano.

35

40

Adicionalmente, si se desea, la mezcla bacteriana de la invención puede contener microorganismos con capacidad de adhesión a superficies plásticas o minerales (e.g. poliespán, vermiculita, piedra pómez, etc.), microorganismos productores de biosurfactantes, etc. El experto en la materia conoce ejemplos ilustrativos de dichos microorganismos. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos microorganismos incluyen microorganismos pertenecientes a los géneros *Agromyces*, *Delftia*, etc.

45

En una realización particular, las bacterias presentes en la mezcla bacteriana de la invención están formando un consorcio bacteriano, en adelante "consorcio bacteriano de la invención". Un "consorcio bacteriano" es una asociación natural de dos o más poblaciones bacterianas, de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo, donde todos se benefician de las actividades de los demás (Ramos et al, "The behavior of bacteria designed for biodegradation" (1994), Nature Biotechnology, 12, 1349-1356). La asociación refleja estilos de vida sinérgicos o sintróficos en el que el crecimiento y el flujo

50

cíclico de nutrientes se conduce más efectiva y eficientemente que en poblaciones individuales (López, Domínguez & García, (2007). Arreglo estructural de un consorcio microbiano de interés alimentario en la producción del vinagre. Trabajo presentado en el octavo Congreso Nacional de Microscopía, Octubre, México). Funcionalmente, un consorcio bacteriano supera la suma de sus partes; sus miembros mantienen la compatibilidad metabólica y ecológica siempre y cuando las transformaciones ambientales que se generan permitan que ellos coexistan cercanamente. Un consorcio bacteriano puede desempeñar funciones complicadas que poblaciones individuales no podrían; además, la vida en asociación puede generar mayor resistencia a las fluctuaciones del ambiente y promover la estabilidad de los miembros, en el tiempo. Estos rasgos distintivos dependen de dos características. Primero, los miembros de un consorcio se comunican el uno con el otro. Ya sea por el intercambio de sustancias o por señales moleculares, cada población detecta y responde a la presencia de otras dentro del consorcio, ejerciendo sobre ellas un control positivo o negativo en su crecimiento y/o metabolismo. Aquí, "comunicación" se refiere a interacciones físico-químicas en las cuales el emisor, el canal y el receptor de la información están identificados. Esta comunicación permite la segunda característica importante, la división del trabajo. La producción total de un consorcio depende de la combinación de tareas desempeñadas por los constituyentes individuales, es decir, por las poblaciones microbianas involucradas. Otra importante característica de los consorcios es su habilidad para desempeñar funciones que requieren múltiples pasos.

En una realización particular, dicho consorcio bacteriano de la invención comprende:

- a) al menos, una bacteria que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Rhodococcus* con capacidad para degradar dichos alcanos alifáticos, tal como la bacteria *Rhodococcus sp.* BIRD 7 (CECT 8211), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones;
- b) al menos, una bacteria que degrada un hidrocarburo seleccionado del grupo formado por octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Bacillus* con capacidad para degradar dichos alcanos alifáticos, tal como la bacteria *Bacillus sp.* BIRD 8 (CECT 8210), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones;
- c) al menos, una bacteria que degrada dodecano, por ejemplo, una bacteria del género *Pseudomonas* con capacidad para degradar dicho alcano, tal como la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano;
- d) al menos, una bacteria que degrada hexadecano, por ejemplo, una bacteria del género *Pseudomonas* con capacidad para degradar dicho alcano, tal como la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano;
- e) al menos, una bacteria que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Acinetobacter* con capacidad para degradar dichos alcanos alifáticos, tal como la bacteria *Acinetobacter sp.* BIRD 11 (CECT 8214), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un

alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones;

- 5 f) al menos, una bacteria que degrada un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones, por ejemplo una bacteria del género *Pseudoxanthomonas* con capacidad para degradar dicho HAP, tal como la bacteria *Pseudoxanthomonas* sp. BIRD 3 (CECT 7607), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones; y
- 10 g) al menos, una bacteria que degrada un hidrocarburo aromático, por ejemplo una bacteria del género *Pseudomonas* con capacidad para degradar dicho hidrocarburo aromático, tal como (i) la bacteria *Pseudomonas* BIRD 9 (CECT 8212) con el plásmido TOL (pWW0), o una mutante de la misma con capacidad para degradar un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno, y sus combinaciones, (ii) la bacteria *Pseudomonas* BIRD 10 (CECT 8213) con el plásmido TOL (pWW0), o una mutante de la misma con capacidad para degradar un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno, y sus combinaciones, o (iii) ambas bacterias (i) y (ii).
- 15
- 20

En otra realización concreta, dicho consorcio bacteriano de la invención comprende:

- 25 a) al menos, la bacteria *Rhodococcus* sp. BIRD 7 (CECT 8211), o una mutante de la misma que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones;
- 30 b) al menos, la bacteria *Bacillus* sp. BIRD 8 (CECT 8210), o una mutante de la misma que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones;
- 35 c) al menos, la bacteria *Pseudomonas* sp. BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que degrada dodecano;
- 40 d) al menos, la bacteria *Pseudomonas* sp. BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que degrada hexadecano;
- 45 e) al menos, la bacteria *Acinetobacter* sp. BIRD 11 (CECT 8214), o una mutante de la misma que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones;
- f) al menos, la bacteria *Pseudoxanthomonas* sp. BIRD-3 (CECT 7607), o una mutante de la misma que degrada un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno y sus combinaciones; y
- 50 g) al menos, una bacteria que degrada un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno, y sus combinaciones, en donde dicha bacteria se selecciona del grupo formado por (i) la bacteria *Pseudomonas* BIRD 9 (CECT 8212) con el plásmido TOL (pWW0), o una mutante de la misma con capacidad para degradar un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno, y sus combinaciones, (ii) la bacteria *Pseudomonas* BIRD 10 (CECT 8213) con el plásmido TOL (pWW0), o una mutante de la misma con capacidad para

degradar un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno, y sus combinaciones; y (iii) combinaciones de dichas bacterias (i) y (ii).

- 5 En otra realización particular, cuando la bacteria que incorpora el plásmido TOL (pWW0), que confiere capacidad para degradar BTEX, es (i) la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano, o (ii) la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano, el consorcio bacteriano de la invención comprende:
- 10
- 15 a) al menos, una bacteria que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Rhodococcus* con capacidad para degradar dichos alcanos alifáticos, tal como la bacteria *Rhodococcus sp.* BIRD 7 (CECT 8211), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones;
- 20 b) al menos, una bacteria que degrada un hidrocarburo seleccionado del grupo formado por octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Bacillus* con capacidad para degradar dichos alcanos alifáticos, tal como la bacteria *Bacillus sp.* BIRD 8 (CECT 8210), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones;
- 25 c) al menos, una bacteria que degrada dodecano, por ejemplo, una bacteria del género *Pseudomonas* con capacidad para degradar dicho alcano, tal como la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano;
- 30 d) al menos, una bacteria que degrada hexadecano, por ejemplo, una bacteria del género *Pseudomonas* con capacidad para degradar dicho alcano, tal como la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano;
- 35 e) al menos, una bacteria que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Acinetobacter* con capacidad para degradar dichos alcanos alifáticos, tal como la bacteria *Acinetobacter sp.* BIRD 11 (CECT 8214), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones; y
- 40 f) al menos, una bacteria que degrada un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Pseudoxanthomonas* con capacidad para degradar dicho HAP, tal como la bacteria *Pseudoxanthomonas sp.* BIRD 3 (CECT 7607), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones;
- 45
- 50

en donde, al menos, una de dichas bacterias c) *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano, o d) *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar

hexadecano, incorpora el plásmido TOL (pWW0), que confiere capacidad para degradar un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno y sus combinaciones (BTEX).

- 5 En una realización más particular, dicha bacteria que incorpora el plásmido TOL (pWW0) es la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano. En otra realización más particular, dicha bacteria que incorpora el plásmido TOL (pWW0) es la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano. En otra realización
- 10 más particular, las bacterias que incorporan el plásmido TOL (pWW0) son las bacterias *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano, y *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano.
- 15 Adicionalmente, si se desea, el consorcio bacteriano de la invención puede contener microorganismos con capacidad de adhesión a superficies plásticas o minerales (e.g. poliespán, vermiculita, piedra pómez, etc.), microorganismos productores de biosurfactantes, etc. El experto en la materia conoce ejemplos ilustrativos de dichos microorganismos. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos microorganismos incluyen microorganismos pertenecientes
- 20 a los géneros *Agromyces*, *Delftia*, etc.

En una realización particular, las bacterias presentes en la mezcla bacteriana de la invención, o en el consorcio bacteriano de la invención, están adheridas a un soporte sólido inerte formando un biofilm (película biológica) bacteriano y constituyendo de ese modo un soporte activo

25 (“soporte activo de la invención”), en donde dicho soporte sólido inerte comprende un material que tiene una densidad inferior a la del agua. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de materiales con densidad inferior a la del agua utilizados en la elaboración de dicho soporte sólido inerte incluyen materiales plásticos, polixpan, vermiculita, arlita (arcilla expandida), espuma de poliuretano, virutas de madera, etc. Características adicionales de dicho soporte activo de la invención y de su obtención se mencionan en el apartado 5 de esta descripción y se incorporan

30 aquí por referencia.

El procedimiento de la invención comprende poner en contacto dicho medio acuoso que comprende una mezcla de hidrocarburos con una mezcla bacteriana de la invención bajo

35 condiciones apropiadas para el desarrollo y crecimiento de las bacterias presentes en la mezcla bacteriana de la invención, o en el consorcio bacteriano de la invención, con el fin de que estas puedan realizar su función de degradar los hidrocarburos presentes en la mezcla de hidrocarburos a degradar. Dichas condiciones incluyen la operación en condiciones aerobias así como la selección de temperatura y nutrientes para que las bacterias presentes en la

40 mezcla bacteriana de la invención, o en el consorcio bacteriano de la invención, puedan desarrollar su actividad degradadora de hidrocarburos.

En caso de que fuese necesario, el medio acuoso que comprende la mezcla de hidrocarburos junto con la mezcla bacteriana de la invención, o en el consorcio bacteriano de la invención,

45 puede ser suplementado con una fuente de carbono y/o con una fuente de nitrógeno y/o nutrientes esenciales, con el fin de facilitar la supervivencia de las bacterias presentes en la mezcla bacteriana de la invención, o en el consorcio bacteriano de la invención. A modo ilustrativo, para optimizar el procedimiento de la invención, pueden añadirse cantidades adecuadas de solución de micronutrientes junto con cantidades apropiadas de magnesio,

50 cobalto, molibdeno y otros metales esenciales, típicamente en el orden de concentración micromolar (μM). En cualquier caso, la elección y cantidad de nutrientes y/o micronutrientes a añadir al medio acuoso contaminado será función de la composición de dicho medio acuoso y de la demanda bacteriana de cada caso particular. El experto en la materia puede tomar las medidas oportunas para ajustar tales condiciones.

Si fuera necesario las bacterias presentes en la mezcla bacteriana de la invención, o en el consorcio bacteriano de la invención, pueden ser sometidas a un tratamiento previo de aclimatación al medio acuoso que comprende la mezcla de hidrocarburos con el fin de poder realizar el procedimiento de la invención. Las condiciones para aclimatar dichas bacterias a los hidrocarburos presentes en la mezcla de hidrocarburos presente en el medio acuoso dependen, en general, de diversos factores, por ejemplo, de la naturaleza del hidrocarburo (alcano alifático, HAP, aromático, etc.) presente en la mezcla de hidrocarburos, de su contenido en dicha mezcla, etc. Durante esta etapa de aclimatación previa, al igual que durante el desarrollo del procedimiento de la invención, puede ser necesario aportar una solución de nutrientes y/o micronutrientes con el fin de favorecer el metabolismo de las bacterias presentes en la mezcla bacteriana de la invención, o en el consorcio bacteriano de la invención, capaces de degradar dichos hidrocarburos.

Durante el procedimiento de la invención, la degradación de algunos hidrocarburos (por ejemplo, de cadena más larga (mayor peso molecular)) por parte de algunas bacterias presentes en la mezcla bacteriana de la invención, o en el consorcio bacteriano de la invención, puede generar otros hidrocarburos (por ejemplo, de cadena más corta (menor peso molecular)) que pueden ser degradados por otras bacterias presentes en dicha mezcla bacteriana de la invención, por lo que el procedimiento de la invención permite degradar y reducir la cantidad de hidrocarburos presentes en la mezcla de hidrocarburos presente en el medio acuoso a tratar, tal como se pone de manifiesto en los Ejemplos 10-13 que acompañan a la presente descripción. En general, dichas bacterias mineralizan los hidrocarburos (alcanos alifáticos, HAPs, aromáticos) llevándolos a dióxido de carbono y agua como productos finales.

En una realización particular, se mide la concentración de hidrocarburos (e.g., TPHs) presente en el medio acuoso contaminado a tratar para comprobar el funcionamiento del procedimiento de la invención y de las bacterias que degradan los hidrocarburos de manera que, en caso de que la eficacia del procedimiento de la invención decaiga, tomar las medidas oportunas conocidas por los técnicos en la materia para aumentar la eficacia, por ejemplo, aportando nutrientes, etc.

En una realización particular, el procedimiento (biológico) de la invención puede ir precedido de un tratamiento físico-químico o fotoquímico del medio acuoso que comprende la mezcla de hidrocarburos a tratar antes de proceder a realizar el tratamiento biológico proporcionado por esta invención. Preferentemente, dicho tratamiento físico-químico o fotoquímico del medio acuoso que comprende la mezcla de hidrocarburos pertenece al tipo de procesos de oxidación avanzados (POAs). El término “proceso de oxidación avanzado” o “POAs”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un proceso que implica la generación y uso de especies transitorias con un alto poder oxidante, principalmente radicales hidroxilo (OH·), los cuales actúan como iniciadores del proceso de oxidación del contaminante (hidrocarburo) (Glaze, Drinking water treatment with ozone (1987), Environ. Sci. Technol., 21; 224-230). Estos radicales hidroxilo pueden ser también generados por medios fotoquímicos (luz solar incluida) y poseen una alta efectividad para la oxidación de materia orgánica.

En una realización concreta, dicho tratamiento físico-químico comprende poner en contacto el medio acuoso que comprende dicha mezcla de hidrocarburos con un agente oxidante, en donde dicho agente oxidante es un agente oxidante que oxida y degrada al menos uno de los hidrocarburos presentes en dicha mezcla de hidrocarburos. Aunque prácticamente cualquier agente oxidante que cumpla tales condiciones puede ser utilizado, en una realización específica, dicho agente oxidante se selecciona del grupo formado por peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ozono (O₃) y sus combinaciones; por tanto, en una realización concreta el agente oxidante es peróxido de hidrógeno (Ejemplo 3); en otra realización concreta el agente oxidante es ozono (Ejemplo 4); y en otra realización concreta el agente oxidante comprende peróxido de

5 hidrógeno y ozono (Ejemplo 5). Cuando el agente oxidante es el peróxido de hidrógeno, este puede ser suministrado por cualquier sistema apropiado para suministrar peróxido de hidrógeno a un medio acuoso; no obstante, en una realización particular, el peróxido de hidrógeno se suministra mediante un sistema de spray o aspersor, manual o automático, de aire comprimido.

10 En otra realización particular, el procedimiento de la invención puede ir precedido de un tratamiento fotoquímico del medio acuoso que comprende la mezcla de hidrocarburos a tratar antes de proceder a realizar el tratamiento biológico proporcionado por esta invención. En una realización concreta, dicho tratamiento fotoquímico comprende poner en contacto el medio acuoso que comprende dicha mezcla de hidrocarburos con (i) un agente oxidante, en donde dicho agente oxidante es un agente oxidante que oxida y degrada al menos uno de los hidrocarburos presentes en dicha mezcla de hidrocarburos, y con (ii) una radiación ultravioleta (UV). Aunque prácticamente cualquier agente oxidante que cumpla tales condiciones puede ser utilizado, en una realización específica, dicho agente oxidante se selecciona del grupo formado por peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ozono (O_3) y sus combinaciones. La longitud de onda (λ) de la radiación UV puede variar dentro de un amplio intervalo, típicamente entre 172 nm y 436 nm, en función del agente oxidante elegido; así, en una realización particular, cuando el agente oxidante es peróxido de hidrógeno (que presenta un máximo de absorción a una λ de 220 nm), se pueden usar lámparas de Xe/Hg que emiten radiación UV en un intervalo comprendido entre 210 nm y 240 nm o lámparas de mercurio de baja presión que emiten una radiación policromática de 220 nm a 436 nm, con un pico de emisión destacado a 254 nm (Ejemplo 6); alternativamente, cuando el agente oxidante es ozono (que presenta una capacidad de absorción superior a la del peróxido de hidrógeno), se pueden usar lámparas que emiten radiación UV a una λ comprendida entre 280 nm y 330 nm o lámparas de mercurio de baja presión que emiten una radiación policromática de 220 nm a 436 nm, con un pico de emisión destacado a 254 nm (Ejemplo 7); asimismo, cuando el agente oxidante comprende peróxido de hidrógeno y ozono, se pueden usar lámparas de mercurio de baja presión que emiten una radiación policromática de 220 nm a 436 nm, con un pico de emisión destacado a 254 nm (Ejemplo 8). Alternativamente, puede emplearse el ultravioleta de vacío como generador de radicales libres a partir de la fotólisis del agua, mediante lámparas de excímeros de Xe a una λ de 172 nm.

35 Por tanto, en una realización particular, la invención proporciona un procedimiento para reducir, en condiciones aeróbicas, el contenido en hidrocarburos (e.g., TPHs) en un medio acuoso que comprende una mezcla de dichos hidrocarburos, que comprende:

- 40 - someter dicho medio acuoso que comprende dicha mezcla de hidrocarburos a un tratamiento físico-químico o fotoquímico tal como se ha indicado previamente para obtener un "medio acuoso oxidado"; y
- poner en contacto dicho medio acuoso oxidado con una mezcla bacteriana de la invención.

45 En una realización concreta, las bacterias presentes en dicha mezcla bacteriana de la invención están formando un consorcio bacteriano.

50 En otra realización concreta, las bacterias presentes en dicha mezcla bacteriana de la invención, o en dicho consorcio bacteriano de la invención, están adheridas a un soporte sólido inerte formando un biofilm bacteriano y constituyendo un soporte activo de la invención, en donde dicho soporte sólido inerte comprende un material que tiene una densidad inferior a la del agua, tal como se ha mencionado previamente. El soporte activo de la invención puede añadirse al medio acuoso contaminado a tratar en cantidad suficiente como para cubrir de forma eficiente la totalidad o parte de la superficie del medio acuoso contaminado a tratar.

En caso necesario, se adicionan, tal como se ha comentado previamente, al medio acuoso contaminado la cantidad adecuada de nutrientes y/o micronutrientes necesarios para un eficaz desarrollo de la actividad biológica. El tipo y cantidad de nutrientes será particular en cada caso, y vendrá determinado por la demanda bacteriana.

Una vez finalizado el tratamiento biológico, se retira el soporte activo de la invención del medio acuoso contaminado.

2. Bacterias

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el aislamiento e identificación de un total de 5 bacterias pertenecientes a los géneros *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* (2 cepas) y *Acinetobacter*, con capacidad para degradar alcanos alifáticos (C_nH_{2n+2}) con longitudes de cadena comprendidas entre 8 y 36 átomos de carbono, así como con el aislamiento e identificación de una bacteria perteneciente al género *Pseudoxanthomonas*, con capacidad para degradar un HAP. Dichas bacterias se caracterizan por su capacidad para utilizar uno o más de dichos compuestos como única fuente de carbono y energía, lo que les permite desarrollarse y colonizar sitios con una alta contaminación en dichos hidrocarburos, facilitando su biodegradación.

El término "alcano alifático", tal como aquí se utiliza, se refiere a un compuesto químico constituido únicamente por átomos de carbono e hidrógeno, unidos exclusivamente por enlaces simples, y que responden a la fórmula general C_nH_{2n+2} , siendo "n" el número de átomos de carbono en la molécula. En general, este tipo de compuestos se encuentran presentes en el petróleo, así como en combustibles derivados de dicha fuente, principalmente gasolina, gasoil, queroseno, etc. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos alcanos alifáticos incluyen octano (n=8), dodecano (n=12), hexadecano (n=16), eicosano (n=20), docosano (n=22), tetracosano (n=24), octacosano (n=28), triacontano (n=30), hexatriacontano (n=36), etc.

La expresión "capacidad de degradar un (hidrocarburo)" o "que degrada un (hidrocarburo)", aplicada a una bacteria, tal como se utiliza en esta descripción, significa que dicha bacteria es capaz de utilizar dicho hidrocarburo (e.g., un alcano alifático) como fuente de carbono, y, en consecuencia, produce la degradación de dicho alcano alifático. Todos los procesos de biodegradación citados en la presente invención son de naturaleza aeróbica y precisan, por tanto, de la presencia de oxígeno molecular para su progreso. El mecanismo habitual de biodegradación de los alcanos alifáticos requiere para su inicio la acción de una enzima alcano hidroxilasa específica para la degradación de alcanos alifáticos. Un posterior sistema enzimático constituido por una serie de enzimas conduce a la generación de intermedios del metabolismo central que son finalmente respirados por los microorganismos (Ri-He Peng et al., Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons (2008), FEMS Microbiol. Rev., 32; 927-955).

La capacidad de una bacteria para degradar un alcano alifático puede determinarse por cualquier procedimiento convencional; por ejemplo inoculando dicha bacteria en un medio que contenga el alcano alifático de interés como única fuente de carbono y energía, y llevando a cabo la incubación de dicho cultivo bajo las condiciones apropiadas de agitación y temperatura. Un recuento de las bacterias viables o un seguimiento de la densidad óptica del cultivo a una longitud de onda de 660 nm (OD_{660}), tal y como se describe en el Ejemplo 1, proporcionará información adecuada sobre el crecimiento de la bacteria. Bajo estas condiciones, un aumento de cualquiera de los dos parámetros será indicativo de que la bacteria es capaz de emplear dicho alcano alifático como fuente de carbono y energía. Alternativamente, la aparición de color en el cultivo es indicativo de la metabolización del compuesto considerado.

En un aspecto, la invención proporciona una bacteria del género *Rhodococcus* (*Rhodococcus* sp. BIRD 7), depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) el 25 de septiembre de 2012, con número de acceso CECT 8211, que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones. Ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que dicha cepa *Rhodococcus* sp. BIRD 7 (CECT 8211) (i) es capaz de crecer utilizando dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano o hexatriacontano como única fuente de carbono (Ejemplo 1), o en mezclas de hidrocarburos donde se hallen presentes dichos compuestos (Ejemplos 9 y 10), y (ii) tiene capacidad de adhesión a un soporte de material plástico (Ejemplo 2), lo que facilita su aplicación *in-situ* para el tratamiento de medios acuosos que comprenden mezclas de hidrocarburos. Un cultivo biológicamente puro de dicha bacteria *Rhodococcus* sp. BIRD 7 (CECT 8211), o de una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones, constituye un aspecto adicional de la presente invención.

En el sentido utilizado en la presente descripción, un “cultivo biológicamente puro (de una bacteria)” se refiere a un cultivo en el que la bacteria en cuestión se encuentra en una proporción igual o superior al 99,999% respecto al resto de posibles bacterias que eventualmente pudieran estar presentes en dicho cultivo.

En otro aspecto, la invención proporciona una bacteria del género *Bacillus* (*Bacillus* sp. BIRD 8), depositada en la CECT el 25 de septiembre de 2012, con número de acceso CECT 8210, que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones. Ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que dicha cepa *Bacillus* sp. BIRD 8 (CECT 8210) (i) es capaz de crecer utilizando octano, hexadecano, octacosano o triacontano como única fuente de carbono (Ejemplo 1), o en mezclas de hidrocarburos donde se hallen presentes dichos compuestos (Ejemplos 9 y 10), y (ii) tiene capacidad de adhesión a un soporte de material plástico (Ejemplo 2), lo que facilita su aplicación *in-situ* para el tratamiento de medios acuosos que comprenden mezclas de hidrocarburos. Un cultivo biológicamente puro de dicha bacteria *Bacillus* sp. BIRD 8 (CECT 8210), o de una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones, constituye un aspecto adicional de la presente invención.

En otro aspecto, la invención proporciona una bacteria del género *Pseudomonas* (*Pseudomonas* sp. BIRD 9), depositada en la CECT el 25 de septiembre de 2012, con número de acceso CECT 8212, que degrada dodecano, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano. Ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que dicha cepa *Pseudomonas* sp. BIRD 9 (CECT 8212) (i) es capaz de crecer utilizando dodecano como única fuente de carbono (Ejemplo 1), o en mezclas de hidrocarburos donde se hallen presentes dichos compuestos (Ejemplos 9 y 10), y (ii) tiene capacidad de adhesión a un soporte de material plástico (Ejemplo 2), lo que facilita su aplicación *in-situ* para el tratamiento de medios acuosos que comprenden mezclas de hidrocarburos. Un cultivo biológicamente puro de dicha bacteria *Pseudomonas* sp. BIRD 9 (CECT 8212), o de una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano, constituye un aspecto adicional de la presente invención.

En otro aspecto, la invención proporciona una bacteria del género *Pseudomonas* (*Pseudomonas* sp. BIRD 10), depositada en la CECT el 25 de septiembre de 2012, con número de acceso CECT 8213, que degrada hexadecano, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano. Ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que dicha cepa *Pseudomonas* sp. BIRD 10 (CECT 8213) (i) es capaz de crecer utilizando hexadecano como única fuente de carbono (Ejemplo 1), o en mezclas de hidrocarburos donde se hallen presentes dichos compuestos (Ejemplos 9 y 10), y (ii) tiene capacidad de adhesión a un soporte de material plástico (Ejemplo 2), lo que facilita su aplicación *in-situ* para el tratamiento de medios acuosos que comprenden mezclas de hidrocarburos. Un cultivo biológicamente puro de dicha bacteria *Pseudomonas* sp. BIRD 10 (CECT 8213), o de una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano, constituye un aspecto adicional de la presente invención.

En otro aspecto, la invención proporciona una bacteria del género *Acinetobacter* (*Acinetobacter* sp. BIRD 11), depositada en la CECT el 25 de septiembre de 2012, con número de acceso CECT 8214, que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano, y sus combinaciones, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano, y sus combinaciones. Ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que dicha cepa *Acinetobacter* sp. BIRD 11 (CECT 8214) (i) es capaz de crecer utilizando dodecano, hexadecano, eicosano, docosano o tetracosano como única fuente de carbono (Ejemplo 1), o en mezclas de hidrocarburos donde se hallen presentes dichos compuestos (Ejemplos 9 y 10), y (ii) tiene capacidad de adhesión a un soporte de material plástico (Ejemplo 2), lo que facilita su aplicación *in-situ* para el tratamiento de medios acuosos que comprenden mezclas de hidrocarburos. Un cultivo biológicamente puro de dicha bacteria *Acinetobacter* sp. BIRD 11 (CECT 8214), o de una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano, y sus combinaciones, constituye un aspecto adicional de la presente invención.

El término “hidrocarburo aromático policíclico” o “HAP”, tal como aquí se utiliza se refiere a un compuesto químico orgánico que se compone de anillos aromáticos simples que se han unido, y no contiene heteroátomos ni lleva sustituyentes. En general, se encuentran HAPs en el petróleo, el carbón y en depósitos de alquitrán y también como productos de la utilización de combustibles (ya sean fósiles o biomasa). Como contaminantes han despertado preocupación debido a que algunos compuestos han sido identificados como carcinógenos, mutágenos y teratógenos. Ejemplos ilustrativos de estos compuestos incluyen antraceno, benzo[a]pireno, coranuleno, coroneno, criseno, fenantreno, naftaceno, naftaleno, pentaceno, pireno, trifenileno, ovaleno, etc. La condición de aromaticidad puede hacerse extensible a sistemas policíclicos que incluyan varios anillos bencénicos condensados, como por ejemplo los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Ejemplos ilustrativos de estos compuestos incluyen naftaleno ($C_{10}H_8$), fenantreno ($C_{14}H_{10}$), pireno ($C_{20}H_{12}$), etc.

La expresión “capacidad de degradar (un HAP)” o “que degrada (un HAP)”, aplicada a una bacteria, tal como se utiliza en esta descripción, significa que dicha bacteria es capaz de utilizar un HAP como fuente de carbono, y en consecuencia, produce la degradación de dicho HAP. Todos los procesos de biodegradación proporcionados por la presente invención son de naturaleza aeróbica y precisan por tanto de la presencia de oxígeno molecular para su progreso. El mecanismo habitual de biodegradación de los HAPs requiere la acción de enzimas que degradan hidrocarburos aromáticos y enzimas que generan intermedios del metabolismo central que son finalmente respirados por los microorganismos.

La capacidad de una bacteria para degradar un HAP puede determinarse por cualquier procedimiento convencional; por ejemplo inoculando dicha bacteria en un medio que contenga

5 el HAP de interés como única fuente de carbono y energía, y llevando a cabo la incubación de dicho cultivo bajo las condiciones apropiadas de agitación y temperatura. Un recuento de las bacterias viables o un seguimiento de la densidad óptica del cultivo a una longitud de onda de 660 nm (OD_{660}), tal y como se describe en el Ejemplo 1, proporcionará información adecuada sobre el crecimiento de la bacteria. Bajo estas condiciones, un aumento de cualquiera de los dos parámetros será indicativo de que la bacteria es capaz de emplear dicho HAP como fuente de carbono y energía. Alternativamente, la aparición de color en el cultivo es indicativo de la metabolización del compuesto considerado.

10 En otro aspecto, la invención proporciona una bacteria del género *Pseudoxanthomonas* (*Pseudoxanthomonas* sp. BIRD 3), depositada en la CECT el 9 de septiembre de 2009, con número de acceso CECT 7607, que degrada un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno y fenantreno, y sus combinaciones, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno y fenantreno, y
15 sus combinaciones. Ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que dicha cepa *Pseudoxanthomonas* sp. BIRD 3 (CECT 7607) (i) es capaz de crecer utilizando naftaleno o fenantreno como única fuente de carbono (Ejemplo 1), o en mezclas de hidrocarburos donde se hallen presentes dichos compuestos (Ejemplos 9 y 10), y (ii) tiene capacidad de adhesión a un soporte de material plástico (Ejemplo 2), lo que facilita su aplicación *in-situ* para el
20 tratamiento de medios acuosos que comprenden mezclas de hidrocarburos. Un cultivo biológicamente puro de dicha bacteria *Pseudoxanthomonas* sp. BIRD 3 (CECT 7607), o de una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones, constituye un aspecto adicional de la presente invención.

25 En otra realización particular, se contempla el empleo de una bacteria que degrada un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, α -xileno, m -xileno, p -xileno, y sus combinaciones (BTEX), tal como una bacteria que incorpora el plásmido TOL (pWW0). En una realización concreta, dicha bacteria que degrada dicho hidrocarburo aromático es la bacteria *Pseudomonas* sp. BIRD 9 (CECT 8212), que incorporado
30 el plásmido TOL (pWW0), y, por tanto, tiene capacidad para degradar BTEX además de dodecano, o la bacteria *Pseudomonas* sp. BIRD 10 (CECT 8213) que incorpora el plásmido TOL (pWW0), y, por tanto, tiene capacidad para degradar BTEX además de hexadecano. La incorporación del plásmido TOL (pWW0) a las cepas BIRD 9 (CECT 8212) y BIRD 10 (CECT
35 8213) puede llevarse a cabo por métodos convencionales, por ejemplo, mediante un mecanismo de conjugación bacteriano, tal como se ha mencionado previamente.

40 El término “hidrocarburo aromático”, tal como aquí se utiliza se refiere a un compuesto químico que cumple la Ley de Hückel sobre la distribución de electrones π en el anillo. Todos los compuestos derivados del benceno se consideran como hidrocarburos aromáticos, siempre y cuando se mantenga intacto el característico anillo bencénico. Ejemplos ilustrativos de estos compuestos incluyen tolueno ($C_6H_5(CH_3)$), etilbenceno ($C_6H_5(CH_2-CH_3)$), xilenos ($C_6H_4(CH_3)_2$), etc.

45 La expresión “capacidad de degradar (un hidrocarburo aromático)” o “que degrada (un hidrocarburo aromático)”, aplicada a una bacteria, tal como se utiliza en esta descripción, significa que dicha bacteria es capaz de utilizar un hidrocarburo aromático como fuente de carbono, y en consecuencia, produce la degradación de dicho hidrocarburo aromático. Todos los procesos de biodegradación proporcionados por la presente invención son de naturaleza
50 aeróbica y precisan por tanto de la presencia de oxígeno molecular para su progreso. El mecanismo habitual de biodegradación de los hidrocarburos aromáticos requiere para su inicio la acción de una enzima mono- o di-oxigenasa específica para la degradación de hidrocarburos aromáticos. Un posterior sistema enzimático constituido por una serie de enzimas conduce a la

generación de intermedios del metabolismo central que son finalmente respirados por los microorganismos (Ri-He Peng et al., citado *supra*).

5 La capacidad de una bacteria para degradar un hidrocarburo aromático puede determinarse por cualquier procedimiento convencional; por ejemplo inoculando dicha bacteria en un medio que contenga el hidrocarburo aromático de interés como única fuente de carbono y energía, y llevando a cabo la incubación de dicho cultivo bajo las condiciones apropiadas de agitación y temperatura. Un recuento de las bacterias viables o un seguimiento de la densidad óptica del cultivo a una longitud de onda de 660 nm (OD_{660}), tal y como se describe en el Ejemplo 1, 10 proporcionará información adecuada sobre el crecimiento de la bacteria. Bajo estas condiciones, un aumento de cualquiera de los dos parámetros será indicativo de que la bacteria es capaz de emplear dicho hidrocarburo aromático como fuente de carbono y energía. Alternativamente, la aparición de color en el cultivo es indicativo de la metabolización del compuesto considerado.

15 En otro aspecto, la invención proporciona un cultivo que comprende una mezcla bacteriana de la invención, o un consorcio bacteriano de la invención. Las características de dicha mezcla bacteriana de la invención, así como las de dicho consorcio bacteriano de la invención, han sido definidas previamente y se incorporan aquí por referencia.

20 3. Aislamiento de bacterias con capacidad de degradar alcanos alifáticos

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para el aislamiento de una bacteria que degrada un alcano alifático, en adelante "procedimiento de aislamiento de la invención para bacterias degradadoras de alcanos alifáticos", que comprende las siguientes etapas:

- 25 a) añadir a una muestra sospechosa de contener una o más bacterias degradadoras de alcanos alifáticos, seleccionada entre muestra líquida y una muestra de una suspensión de suelo, una fuente de carbono que comprende uno o más de los alcanos alifáticos susceptibles de ser degradados por las bacterias presentes en dicha muestra;
- 30 b) incubar el medio o suspensión resultante de la etapa a) bajo condiciones que permitan el crecimiento de bacterias capaces de degradar dichos uno o más alcanos alifáticos;
- 35 c) una vez observada turbidez en el medio resultante de la etapa b) preparar nuevos cultivos líquidos que comprenden medio mineral mínimo M9 y la fuente de carbono correspondiente, comprendiendo dicha fuente de carbono un alcano alifático susceptible de ser degradado por las bacterias presentes en el medio resultante en la etapa b), e inocular con una alícuota del medio resultante en la etapa b);
- 40 d) incubar la suspensión resultante de la etapa c) bajo condiciones que permitan el crecimiento de dicha bacteria capaz de degradar uno o más alcanos alifáticos;
- 45 e) repetir las etapas c) y d) las veces que se considere necesario para favorecer el crecimiento de bacterias degradadoras de alcanos alifáticos;
- 50 f) sembrar diluciones seriadas de los medios resultantes en las etapas b), d) y similares en placas de medio sólido selectivo suplementadas con la correspondiente fuente de carbono;

- g) incubar las placas sembradas en la etapa f) durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 4 días a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C;
- 5 h) aislar y purificar las colonias de las bacterias que, obtenidas tras la incubación de la etapa f), son capaces de utilizar uno o más alcanos alifáticos como única fuente de carbono en condiciones aeróbicas; y
- 10 i) seleccionar, y, opcionalmente, si se desea, caracterizar, las cepas de las colonias aisladas y purificadas en la etapa f).

Brevemente, la muestra utilizada en la etapa a) del procedimiento de aislamiento de la invención para bacterias degradadoras de alcanos alifáticos puede ser cualquier muestra de suelo o agua sospechosas de contener bacterias con capacidad para degradar un alcano alifático, por ejemplo, una muestra de suelo, tal como un suelo contaminado con hidrocarburos, como consecuencia, por ejemplo, de un derrame de combustible o afectado por la fuga de un tanque de almacenamiento de combustible que comprende dichos hidrocarburos, o bien una muestra de suelo o agua procedente de alguna instalación en la que se manipulen combustibles que comprenden dichos hidrocarburos, como por ejemplo, refinerías, estaciones de servicio o lavado, aeropuertos, zonas de aparcamiento, etc. A la suspensión o medio se le añade una fuente de carbono que comprende un alcano alifático susceptible de ser degradado por dicha bacteria. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de compuestos que pueden usarse como fuente de carbono incluyen cualquier alcano alifático (C_nH_{2n+2}), por ejemplo, octano (n=8), dodecano (n=12), hexadecano (n=16), eicosano (n=20), docosano (n=22), tetracosano (n=24), octacosano (n=28), triacontano (n=30), hexatriacontano (n=36), etc., o mezclas complejas de hidrocarburos donde se hallen presentes esos compuestos, tales como gasoil, gasolina, Jet A1, etc., lo que permitirá seleccionar bacterias capaces de metabolizar dichos alcanos alifáticos.

La suspensión o medio resultante de la etapa a) se incuba bajo condiciones que permitan el crecimiento de dicha bacteria capaz de degradar uno o más de dichos alcanos alifáticos (etapa b)). Dichas condiciones dependen, en general, de la bacteria. No obstante, en una realización particular, dichas condiciones comprenden incubar la suspensión a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C, de 7 a 15 días, en condiciones aeróbicas.

Una alícuota de la suspensión o medio obtenido en la etapa b) se emplea para inocular un nuevo cultivo preparado exclusivamente con medio mineral mínimo M9 y que incorpora, al menos, un alcano alifático como única fuente de carbono (etapa c)) susceptible de ser degradado por las bacterias presentes en el medio resultante en la etapa b). La sucesiva repetición de los pasos de aislamiento (etapas c) y d)) favorece el crecimiento preferente de las bacterias capaces de degradar al menos un alcano alifático.

A continuación, se siembran diluciones seriadas de las suspensiones o medios obtenidos en los pasos b), d) y similares, en placas de medio sólido selectivo que contienen al menos el alcano alifático o mezcla de alcanos alifáticos añadido en las etapas a), c) y similares como única fuente de carbono. Las placas se cultivan a una temperatura comprendida entre 25 °C y 30°C, y durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 4 días (etapa f)).

Posteriormente, se procede a aislar y purificar las colonias de bacterias que, obtenidas tras la incubación de la etapa g), son capaces de utilizar el hidrocarburo empleado como única fuente de carbono (etapa h), y a continuación, si se desea, se procede a seleccionar y, opcionalmente, caracterizar las cepas (etapa i)), aisladas y purificadas en la etapa h). En la práctica, resulta recomendable caracterizar las bacterias con el fin de identificar dichas bacterias así como sus respectivas fuentes de carbono (Ejemplo 1).

Mediante el procedimiento de aislamiento de la invención para bacterias degradadoras de alcanos alifáticos, utilizando como fuente de carbono un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, triacontano y hexatriacontano, previamente descrito se han aislado las bacterias:

- 5
- *Rhodococcus sp.* BIRD 7 (CECT 8211), que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones;
 - *Bacillus sp.* BIRD 8 (CECT 8210), que degrada octano, hexadecano, octacosano, 10 triacontano, tetracontano y sus combinaciones;
 - *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), que degrada dodecano;
 - *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), que degrada hexadecano; y
 - *Acinetobacter sp.* BIRD 11 (CECT 8214), que degrada un alcano alifático 15 seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones.

4. Aislamiento de bacterias con capacidad de degradar HAPs

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para el aislamiento de una bacteria 20 que degrada un hidrocarburo aromático policíclico (HAP), en adelante "procedimiento de aislamiento de la invención para bacterias degradadoras de HAPs", que comprende las siguientes etapas:

- a) añadir a cada uno de los pocillos de una placa de fondo profundo el medio de 25 cultivo que se desee emplear en el aislamiento de dicha bacteria;
- b) añadir a cada pocillo el HAP para el que se desee realizar la búsqueda de bacterias que degradan dicho HAP;
- c) 30 inocular los pocillos con alícuotas procedentes de muestras acuosas o suspensiones de suelos sospechosas de contener bacterias degradadoras de HAPs;
- d) 35 incubar las placas de fondo profundo bajo condiciones que permitan el crecimiento de bacterias capaces de degradar un HAP;
- e) preparar nuevos medios líquidos, preparados con el mismo medio que el añadido en la etapa a), y el HAP para el que se desee buscar bacterias que 40 degradan dicho HAP;
- f) inocular los medios resultantes de la etapa e) con alícuotas procedentes de aquellos pocillos de la placa de fondo profundo que hayan presentado turbidez o coloración durante el desarrollo de la etapa d);
- g) 45 incubar los cultivos resultantes de la etapa e) bajo condiciones que permitan el crecimiento de bacterias capaces de degradar un HAP;
- h) sembrar diluciones seriadas de los cultivos resultantes de la etapa g) en 50 placas de medio sólido selectivo suplementadas con el HAP correspondiente;
- i) incubar los medios sólidos resultantes de la etapa h) bajo condiciones que permitan el crecimiento de bacterias capaces de degradar un HAP;

j) aislar y purificar las colonias de las bacterias que, obtenidas tras la incubación de la etapa i), son capaces de utilizar un HAP como única fuente de carbono en condiciones aeróbicas; y

5 k) seleccionar y, opcionalmente, si se desea, caracterizar las cepas de las colonias aisladas y purificadas en la etapa j).

En la etapa a) se añade a cada uno de los pocillos de una placa de fondo profundo, tal como una placa Deep-Well, un volumen adecuado del medio de cultivo que se desee emplear para
10 aislar las bacterias que degraden el HAP, tal como medio mineral mínimo M9, o cualquier otro medio de cultivo que se desee emplear en el aislamiento de dichas bacterias, y, a continuación, a cada uno de dichos pocillos se añade el HAP para el que se desee realizar la búsqueda de bacterias que lo degradan. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de compuestos que pueden usarse como fuente de carbono en la búsqueda de bacterias degradadoras de HAPs incluyen
15 naftaleno (C₁₀H₈), fenantreno (C₁₄H₈), antraceno (C₁₄H₈), pireno (C₂₀H₁₂), etc., o mezclas complejas de hidrocarburos donde se hallen presentes estos compuestos, lo que permitirá seleccionar bacterias capaces de metabolizar dichos HAPs.

Brevemente, las muestras utilizadas para la inoculación de los cultivos en la etapa c) pueden
20 ser cualquier muestra de suelo o agua sospechosas de contener bacterias con capacidad para degradar un HAP. Por ejemplo, una muestra de suelo, tal como un suelo contaminado con uno o más HAPs, como consecuencia, por ejemplo, de un derrame de combustible o afectado por la fuga de un tanque de almacenamiento de combustible, o bien una muestra de suelo o agua procedente de alguna instalación en la que se manipulen combustibles que comprenden dichos
25 HAPs, como por ejemplo, refinerías, estaciones de servicio o lavado, aeropuertos, zonas de aparcamiento, etc.

La suspensión o medio resultante de la etapa c) se incuba bajo condiciones que permitan el
30 crecimiento de una bacteria capaz de degradar un HAP (etapa d)). Dichas condiciones dependen, en general, de la bacteria. No obstante, en una realización particular, dichas condiciones comprenden incubar la suspensión a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C, de 15 a 40 días, en condiciones aeróbicas.

Una alícuota de la suspensión o medio obtenido en la etapa d) se emplea para inocular un
35 nuevo cultivo preparado exclusivamente con el medio utilizado en la etapa a), por ejemplo, medio mineral mínimo M9 o cualquier otro medio de cultivo que se desee emplear, al que se le añade al menos un HAP como única fuente de carbono (etapa f)).

Los cultivos resultantes de la etapa f) se incuban en condiciones que permitan el crecimiento
40 de bacterias degradadoras de HAPs (etapa g)), y, a continuación, se siembran diluciones seriadas de las suspensiones o medios obtenidos en la etapa g) en placas de medio sólido que incorporen el HAP de interés como única fuente de carbono. Las placas se cultivan a una temperatura comprendida entre 25°C y 30°C, y durante un periodo de tiempo comprendido entre 2 y 7 días (etapa h)).

Posteriormente, se procede a aislar y purificar las colonias de bacterias que, obtenidas tras la
45 incubación de la etapa i), son capaces de utilizar el HAP como única fuente de carbono (etapa j)). A continuación, si se desea, se procede a seleccionar y, opcionalmente, caracterizar las cepas (etapa k)), aisladas y purificadas en la etapa j).

50 Mediante un procedimiento como el procedimiento de aislamiento de la invención para bacterias degradadoras de HAPs como el descrito previamente se pudo aislar la bacteria *Pseudoxanthomonas* sp. BIRD 3 (CECT 7607) que degrada un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno y sus combinaciones.

5. Soporte activo

5 Las bacterias proporcionadas por esta invención presentan la capacidad de desarrollar mecanismos de adhesión que les confieren la capacidad de formar un biofilm o biopelícula bacteriana sobre una superficie de un material inerte con capacidad para flotación. Una vez iniciada la formación del biofilm o biopelícula bacteriana, estas bacterias favorecen la adhesión del resto de bacterias que no presenten dicha capacidad. Las bacterias adheridas al soporte inerte conservan su capacidad para degradar alcanos alifáticos (y, en su caso, hidrocarburos aromáticos) o HAPs, por lo que pueden ser empleados, en combinación con dicho soporte, para el tratamiento de medios acuosos que comprenden mezclas de dichos hidrocarburos.

15 Ventajosamente, para la puesta en práctica de la presente invención se seleccionarán bacterias que presenten la capacidad de desarrollar mecanismos de adhesión que les confieren la capacidad de formar un biofilm o biopelícula bacteriana sobre una superficie de material plástico inerte o de cualquier otro material con capacidad para la flotación.

20 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un soporte activo, en adelante "soporte activo de la invención", que comprende un soporte sólido inerte y un biofilm (biopelícula) bacteriano.

Dicho soporte debe cumplir algunas características específicas, tales como:

- a) debe ser sustancialmente inerte (es decir, no debe afectar adversamente a las bacterias que tienen que ser soportadas sobre dicho soporte), y
- 25 b) debe ser un material con densidad inferior a la del agua, y, por tanto, con su flotabilidad, facilite el contacto de la bacteria con el hidrocarburo, el cual, por razones de densidad, se encuentra preferentemente distribuido de forma heterogénea sobre la superficie del medio acuoso que comprende la mezcla de hidrocarburos.

30 Ventajosamente, dicho soporte inerte y con una densidad inferior a la del agua, poseerá una elevada superficie específica con el fin de que pueda disponer de una elevada capacidad de fijación de dichas bacterias; en general, cuanto mayor sea la superficie específica del soporte más superficie habrá para que se pueda desarrollar la actividad bacteriana. Aunque la superficie específica puede variar dentro de un amplio intervalo, en una realización particular, la superficie específica está comprendida entre $100 \text{ m}^2/\text{m}^3$ y $3.000 \text{ m}^2/\text{m}^3$, típicamente entre $250 \text{ m}^2/\text{m}^3$ y $2.000 \text{ m}^2/\text{m}^3$, ventajosamente entre $500 \text{ m}^2/\text{m}^3$ y $1.500 \text{ m}^2/\text{m}^3$.

40 Prácticamente cualquier soporte que cumpla dichas condiciones puede ser utilizado en la puesta en práctica de la presente invención. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de materiales que pueden ser empleados como soporte incluyen tanto productos naturales como sintéticos, por ejemplo, arlita o LECA (arcilla expandida), vermiculita, etc., materiales plásticos, tales como espumas de poliuretano (BULPREN[®], FILTREN[®]), o poliestireno expandido (Kaldness K1[®]) o incluso "poliespán". Otros materiales naturales tales como piedra pómez, virutas de madera, serrín, etc. también son susceptibles de ser empleados como soporte. Las densidades de los materiales indicados oscilan entre $0,4 \text{ g}/\text{cm}^3$ y $0,95 \text{ g}/\text{cm}^3$ y sus áreas específicas abarcan desde $500 \text{ m}^2/\text{m}^3$ a los $1500 \text{ m}^2/\text{m}^3$ dependiendo del material considerado (Andersson et al., "Assessment of carrier materials for biofilm formation and denitrification" (2008), Vatten, 64, 201-207).

50 Dicho biofilm bacteriano comprende las bacterias proporcionadas por esta invención, bien en forma de cultivos biológicamente puros o bien en forma de mezclas bacterianas, por ejemplo, en forma de mezclas bacterianas de la invención o de un consorcio bacteriano de la invención.

Las características de dicha mezcla bacteriana de la invención, o de dicho consorcio bacteriano de la invención, ya han sido mencionadas previamente y se incorporan aquí por referencia.

- 5 Así, en una realización particular, dicho biofilm bacteriano es un film formado por una bacteria seleccionada del grupo formado por *Rhodococcus sp.* BIRD 7 (CECT 8211), *Bacillus sp.* BIRD 8 (CECT 8210), *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), *Acinetobacter sp.* BIRD 11 (CECT 8214), y *Pseudoxanthomonas sp.* BIRD 3 (CECT 7607), y cualquiera de sus mezclas.
- 10 En otra realización particular, dicho biofilm bacteriano es un film formado por una mezcla bacteriana, o por un consorcio bacteriano, que comprende *Rhodococcus sp.* BIRD 7 (CECT 8211), *Bacillus sp.* BIRD 8 (CECT 8210), *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), *Acinetobacter sp.* BIRD 11 (CECT 8214), y *Pseudoxanthomonas sp.* BIRD 3 (CECT 7607). En otra realización particular, dicha mezcla
- 15 bacteriana, o dicho consorcio bacteriano, comprende, además, una bacteria que degrada un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, α -xileno, *m*-xileno, *p*-xileno, y sus combinaciones, tal como una bacteria que incorpora el plásmido TOL (pWW0) de *P. putida* que confiere capacidad para degradar BTEX, por ejemplo, una bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212) que incorpora el plásmido TOL (pWW0)
- 20 y/o una bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213) que incorpora el plásmido TOL (pWW0), con lo que tienen capacidad además para degradar BTEX.

- El soporte activo de la invención se puede obtener por métodos convencionales que comprenden la adhesión al soporte inerte de la mezcla bacteriana de la invención. En una
- 25 realización particular, la adhesión al soporte de la mezcla bacteriana de la invención, o del consorcio bacteriano de la invención, se realiza mediante un cultivo secuencial de las bacterias en unos reactores apropiados, por ejemplo, unos reactores de polietileno de 30 L de capacidad, y en presencia del volumen adecuado de soporte para cubrir la superficie de la fase acuosa. Dicho cultivo secuencial comienza con la inoculación del medio de cultivo con las bacterias que
- 30 presentan mayor capacidad de adhesión al soporte inerte: *Rhodococcus sp.* BIRD 7 (CECT 8211), *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212) y *Acinetobacter sp.* BIRD 11 (CECT 8214). Una vez formado un biofilm inicial con esas bacterias, el medio se inocula con aquellas bacterias con menor capacidad para la adhesión al soporte inerte: *Bacillus sp.* BIRD 8 (CECT 8210), *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213) y *Pseudoxanthomonas sp.* BIRD 3 (CECT 7607). Las
- 35 condiciones creadas por el biofilm formado inicialmente favorecen la adhesión de estas últimas bacterias. El cultivo se mantiene en condiciones estáticas y a temperatura ambiente durante un período de aproximadamente 2 semanas o bien hasta observar un adecuado crecimiento del biofilm. Tanto el soporte inerte como los reactores de polietileno fueron sometidos antes de su
- 40 empleo a procesos de esterilización, por ejemplo, mediante autoclavado durante 20 min a 121°C en el caso de los soportes y en estufa a 90°C durante 1 hora en el caso de los reactores.

- Las bacterias adheridas al soporte inerte (soporte activo de la invención) mantienen su capacidad para degradar alcanos alifáticos o HAPs, por lo que el soporte activo de la invención puede ser utilizado en el tratamiento de medios acuosos que comprenden uno o más de dichos
- 45 hidrocarburos, por ejemplo, aguas contaminadas con esos hidrocarburos, tales como, por ejemplo, aguas residuales recogidas en una SPH, aguas residuales contaminadas con vertidos de dichos hidrocarburos o de fases orgánicas que los contengan, tales como gasoil, gasolina, Jet A1, etc.

- 50 En una realización particular, la mezcla bacteriana de la invención, o el consorcio bacteriano de la invención, presente en el soporte activo de la invención comprende:

- a) al menos, una bacteria que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano,

- 5 hexatriacontano y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Rhodococcus* con capacidad para degradar dichos alcanos alifáticos, tal como la bacteria *Rhodococcus sp.* BIRD 7 (CECT 8211), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones;
- 10 b) al menos, una bacteria que degrada un hidrocarburo seleccionado del grupo formado por octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Bacillus* con capacidad para degradar dichos alcanos alifáticos, tal como la bacteria *Bacillus sp.* BIRD 8 (CECT 8210), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones;
- 15 c) al menos, una bacteria que degrada dodecano, por ejemplo, una bacteria del género *Pseudomonas* con capacidad para degradar dicho alcano, tal como la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano;
- 20 d) al menos, una bacteria que degrada hexadecano, por ejemplo, una bacteria del género *Pseudomonas* con capacidad para degradar dicho alcano, tal como la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano;
- 25 e) al menos, una bacteria que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Acinetobacter* con capacidad para degradar dichos alcanos alifáticos, tal como la bacteria *Acinetobacter sp.* BIRD 11 (CECT 8214), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un
- 30 alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones;
- 35 f) al menos, una bacteria que degrada un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones, por ejemplo una bacteria del género *Pseudoxanthomonas* con capacidad para degradar dicho HAP, tal como la bacteria *Pseudoxanthomonas sp.* BIRD 3 (CECT 7607), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones; y
- 40 g) al menos, una bacteria que degrada un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno, y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Pseudomonas* con capacidad para degradar dicho hidrocarburo aromático, tal como (i) la bacteria *Pseudomonas* BIRD 9 (CECT 8212) con el plásmido TOL (pWW0), o una mutante de la misma con
- 45 capacidad para degradar un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno, y sus combinaciones, (ii) la bacteria *Pseudomonas* BIRD 10 (CECT 8213) con el plásmido TOL (pWW0), o una mutante de la misma con capacidad para degradar un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno, y sus combinaciones, o (iii) ambas bacterias (i) y (ii).
- 50

En otra realización particular, cuando la bacteria que incorpora el plásmido TOL (pWW0), que confiere capacidad para degradar BTEX, es (i) la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano, o (ii) la

bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano, la mezcla bacteriana de la invención, o el consorcio bacteriano de la invención, comprende:

- 5 a) al menos, una bacteria que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Rhodococcus* con capacidad para degradar dichos alcanos alifáticos, tal como la bacteria *Rhodococcus sp.* BIRD 7 (CECT 8211), o una mutante de la misma que
- 10 tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones;
- 15 b) al menos, una bacteria que degrada un hidrocarburo seleccionado del grupo formado por octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Bacillus* con capacidad para degradar dichos alcanos alifáticos, tal como la bacteria *Bacillus sp.* BIRD 8 (CECT 8210), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones;
- 20 c) al menos, una bacteria que degrada dodecano, por ejemplo, una bacteria del género *Pseudomonas* con capacidad para degradar dicho alcano, tal como la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano;
- 25 d) al menos, una bacteria que degrada hexadecano, por ejemplo, una bacteria del género *Pseudomonas* con capacidad para degradar dicho alcano, tal como la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano;
- 30 e) al menos, una bacteria que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Acinetobacter* con capacidad para degradar dichos alcanos alifáticos, tal como la bacteria *Acinetobacter sp.* BIRD 11 (CECT 8214), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones; y
- 35 f) al menos, una bacteria que degrada un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones, por ejemplo, una bacteria del género *Pseudoxanthomonas* con capacidad para degradar dicho HAP, tal como la bacteria *Pseudoxanthomonas sp.* BIRD 3 (CECT 7607), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones;
- 40
- 45

en donde, al menos, una de dichas bacterias c) *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano, o d) *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano, incorpora el plásmido TOL (pWW0), que confiere capacidad para degradar un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno y sus combinaciones (BTEX).

50

En una realización más particular, dicha bacteria que incorpora el plásmido TOL (pWW0) es la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la

capacidad de degradar dodecano. En otra realización más particular, dicha bacteria que incorpora el plásmido TOL (pWW0) es la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano. En otra realización más particular, las bacterias que incorporan el plásmido TOL (pWW0) son las bacterias *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano, y *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano.

Adicionalmente, si se desea, la mezcla bacteriana de la invención, o el consorcio bacteriano de la invención, puede contener microorganismos con capacidad de adhesión a superficies plásticas o minerales (e.g. poliestireno, poliespán, vermiculita, arlita, piedra pómez, etc.), microorganismos productores de biosurfactantes, etc. El experto en la materia conoce ejemplos ilustrativos de dichos microorganismos. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos microorganismos incluyen microorganismos pertenecientes a los géneros *Agromyces*, *Delftia*, etc.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

EJEMPLO 1

Biodegradación bacteriana de alcanos alifáticos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y formas *m*-, *o*- y *para*- de xilenos)

Se estudió la capacidad de algunas bacterias para biodegradar alcanos alifáticos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y formas *m*-, *o*- y *para*- de xilenos).

Las bacterias estudiadas fueron:

- a) *Rhodococcus sp.* BIRD 7 (CECT 8211) [con capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones];
- b) *Bacillus sp.* BIRD 8 (CECT 8210) [con capacidad de degradar octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones];
- c) *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212) [con capacidad de degradar dodecano] que incorpora el plásmido TOL (pWW0) mediante un mecanismo de conjugación bacteriano (Abril et al., Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansión of the substrate range of the pathway (1989), J. Bacteriol., 171; 6782-6790), con lo que tiene capacidad además para degradar BTEX;
- d) *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213) [con capacidad de degradar hexadecano] que incorpora el plásmido TOL (pWW0) mediante un mecanismo de conjugación bacteriano (Abril et al. (1989) citado *supra*), con lo que tiene capacidad además para degradar BTEX;
- e) *Acinetobacter sp.* BIRD 11 (CECT 8214) [con capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones]; y
- f) *Pseudoxanthomonas sp.* BIRD 3 (CECT 7607) [con capacidad de degradar un hidrocarburo aromático policíclico seleccionado del grupo formado por naftaleno y fenantreno y sus combinaciones].

Los alcanos alifáticos empleados para este estudio abarcaron hasta 15 compuestos distintos con cadenas comprendidas entre 8 (C₈H₁₈) y 60 (C₆₀H₁₂₂) átomos de carbono. Como representantes de los HAPs se emplearon naftaleno (C₈H₁₀) y fenantreno (C₁₄H₁₀).

Para alcanos alifáticos y HAPs se emplearon tubos de vidrio Pyrex® de 15 mL de capacidad, a cada uno de los cuales se adicionaron 3 mL de medio mineral mínimo M9 y una única fuente de carbono de entre todas las indicadas. Dicho medio mineral M9 es un medio mínimo sin fuente de carbono cuya composición específica por litro es: 70 g de Na₂HPO₄×12H₂O, 30 g de KH₂PO₄, 10 g de NH₄Cl, 5 g de NaCl, 0,52 g de MgSO₄, 0,006 g de citrato férrico amónico y 2,5 mL de solución A9. La composición específica de la solución A9 por litro es la siguiente: 300 mg de H₃BO₃, 50 mg de ZnCl₂, 30 mg de MnCl₂×4H₂O, 200 mg de CoCl₂, 10 mg de CuCl₂×2H₂O, 20 mg de NiCl₂×6H₂O y 30 mg de NaMoO₄×2H₂O [Abril et al., "Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansión of the substrate range of the pathway", 1989; J. Bacteriol., 171; 6782-6790]. Para los alcanos alifáticos en estado líquido (de 8 a 16 carbonos) se añadió al tubo con el medio mineral mínimo un volumen de 100 μ L de fase orgánica. Para los alcanos alifáticos en estado sólido con cadenas entre 20 y 24 carbonos se añadió al tubo con el medio un volumen de 150 μ L de una disolución en éter dietílico (C₄H₁₀O) del alcano. El resto de alcanos alifáticos (hasta 60 átomos de carbono) y los HAPs (naftaleno y fenantreno) se añadieron en forma de lascas a los tubos, asegurando así una concentración por encima de la solubilidad del compuesto orgánico. Cada tubo fue inoculado entonces con la cepa deseada y mantenido en agitación en un rotatubo Stuart SB3 a unas 40 rpm por un periodo de tiempo de 9 a 13 días. Transcurrido dicho periodo se empleó un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 PharmaSpec para medir la densidad óptica a una longitud de onda de 660 nm (OD_{660nm}) de cada uno de los cultivos, estimándose así el crecimiento de cada cepa. Todos aquellos cultivos con un valor de densidad óptica a 660 nm menor de 0,5 unidades (OD_{660nm} < 0,5 unidades) fueron considerados como resultado negativo. Como control positivo se empleó un cultivo de cada cepa en medio mineral mínimo M9 suplementado con glucosa. Un control negativo sin microorganismo pero con la fuente de carbono correspondiente también fue empleado en estos ensayos.

Para los BTEX se emplearon erlenmeyers de vidrio Pyrex® con tapón de rosca de 100 mL de capacidad. Un volumen de 25 mL de medio mineral mínimo M9 fue inoculado con el microorganismo deseado y la fuente de carbono (mezcla de volúmenes equivalentes de cada uno de los BTEX) fue añadida a un tubo hueco de vidrio en forma de "U" que se colocó en el interior de cada erlenmeyer. Esta disposición permite la evaporación de la fase orgánica, que queda así disponible para su asimilación por el microorganismo, y, al mismo tiempo, evita el contacto directo con éste, disminuyendo posibles efectos tóxicos del compuesto orgánico. El volumen de fase orgánica añadido a cada tubo de vidrio fue de unos 150 μ L y los cultivos se mantuvieron en agitación a unas 50 rpm durante un período de 9-13 días transcurridos los cuales se procedió a medir la densidad óptica del cultivo, tal y como se ha descrito previamente en este Ejemplo 1. Todos aquellos cultivos con un valor de OD_{660nm} < 0,5 unidades fueron considerados como resultado negativo. Como control positivo se empleó un cultivo de cada cepa en medio mínimo mineral M9 suplementado con glucosa. Un control negativo sin microorganismo pero con la fuente de carbono correspondiente también fue empleado en estos ensayos.

Resultados

Para cada una de las bacterias estudiadas se comprobó su capacidad para degradar cada uno de los compuestos orgánicos indicados a continuación; entre paréntesis se indica el valor máximo de densidad óptica alcanzado (OD_{660nm}).

- *Rhodococcus* sp. BIRD 7 (CECT 8211): dodecano (0,827), eicosano (4,450), docosano (4,010), tetracosano (2,280), octacosano (1,510) y hexatriacontano (0,646).
- *Bacillus* sp. BIRD 8 (CECT 8210): octano (0,725), hexadecano (1,580), octacosano (1,105) y triacontano (0,650).

- *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), incorporando el plásmido TOL (pWW0): dodecano (0,654), benceno (1,209), tolueno (1,405), etilbenceno (1,105) y mezcla de xilenos (1,480).
- 5 - *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), incorporando el plásmido TOL (pWW0): hexadecano (5,650), benceno (1,105), tolueno (1,455), etilbenceno (1,201) y mezcla de xilenos (1,520).
- 10 - *Acinetobacter sp.* BIRD 11 (CECT 8214): dodecano (1,314), hexadecano (0,836), eicosano (1,650), docosano (1,830) y tetracosano (0,946).
- *Pseudoxanthomonas sp.* BIRD 3 (CECT 7607): naftaleno (1,182) y fenantreno (0,809).

EJEMPLO 2

15 Estudio de la capacidad de adhesión a un soporte inerte de material plástico

Las bacterias identificadas en el Ejemplo 1 fueron sometidas a un estudio para determinar su capacidad de adhesión a un soporte inerte de material plástico. Para el ensayo de adhesión se emplearon placas multipocillo de material plástico (polipropileno) y 3 diferentes medios líquidos de cultivo:

- a) medio LB (Luria Bertani);
- b) medio mineral mínimo M9 suplementado con glucosa (0,5% p/v); y
- c) medio mineral mínimo M9 suplementado con hexadecano (C₁₆H₃₄; 0,5% v/v) como representante de los alcanos alifáticos.

25 Por cada una de las 6 bacterias a estudiar se prepararon pocillos por triplicado para cada uno de los tres medios ensayados, conteniendo cada uno de ellos un volumen de 90 μ L del medio de cultivo correspondiente. Cada pocillo fue inoculado entonces con un volumen de 10 μ L de un cultivo de la cepa deseada, previamente incubado en condiciones de agitación durante 12-16 h en el medio líquido más apropiado para su crecimiento. Las placas multipocillos fueron incubadas entonces por un periodo de 6 h a una temperatura de 30°C y sometidas a una agitación de 150 rpm. Una vez transcurrido dicho tiempo de incubación, el medio de cultivo fue retirado y sustituido por 150 μ L de cristal violeta (mezcla de N-tetra, N-penta y N-hexametil *p*-rosanilinas) con el fin de teñir los microorganismos que hubiesen quedado adheridos a la placa.

30 Después de unos 15 minutos de contacto, el colorante sobrante se retira de cada pocillo mediante una serie de lavados suaves con agua destilada. Una vez secos, una inspección visual de los pocillos permite distinguir aquellos microorganismos que presenten capacidad de adhesión, la cual viene indicada por existencia de coloración azul en el pocillo. No obstante, este método permite también cuantificar, aunque de forma indirecta, la cantidad de biomasa adherida al pocillo por medida de la densidad óptica (a una longitud de onda entre 500 y 600 nm) mediante un lector de placas ELISA modelo BioTek Synergy.

Los resultados de adhesión, para cada uno de los 6 microorganismos de la invención estudiados, se recogen a continuación. Entre paréntesis se indica el medio de cultivo utilizado (LB para medio Luria Bertani, M9+G para medio mineral mínimo suplementado con glucosa y M9+HD para medio mineral mínimo suplementado con hexadecano). Los valores numéricos delante del medio de cultivo indican la absorción del cristal violeta recuperado de la biomasa. Valores superiores a 0,2 unidades indican una buena adherencia en tanto que los valores de absorción superiores a 0,5 unidades son indicativos de una adhesión excelente.

- 50 - *Rhodococcus sp.* BIRD 7 (CECT 8211): 0,3733 (LB), 0,5978 (M9+G) y 0,0628 (M9+HD).
- *Bacillus sp.* BIRD 8 (CECT 8210): 0,2264 (LB), 0,0918 (M9+G) y 0,0912 (M9+HD).
- *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212): 0,7165 (LB), 0,8390 (M9+G) y 0,3275(M9+HD).

- *Pseudomonas* sp. BIRD 10 (CECT 8213): 0,1231 (LB), 0,5351 (M9+G) y 0,5266 (M9+HD).
- *Acinetobacter* sp. BIRD 11 (CECT 8214): 0,06341 (LB), 0,6763 (M9+G) y 0,7125 (M9+HD).
- 5 - *Pseudoxanthomonas* sp. BIRD 3 (CECT 7607): 0,0671 (LB), 0,2327 (M9+G) y 0,0576 (M9+HD)

Como se deduce de los valores anteriores todas las cepas presentan al menos una condición de cultivo que les permite una buena adhesión a un soporte inerte de material plástico.

10

EJEMPLO 3

Tratamiento fisicoquímico de contaminantes con peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

15 Todos los tratamientos fisicoquímicos con peróxido de hidrógeno (H₂O₂, solución acuosa al 30%) se han llevado a cabo en matraces esféricos de vidrio PYREX[®] con una capacidad de 2 L. Las muestras contaminadas empleadas procedían de una unidad separadora de hidrocarburos (SPH) operativa en el área de prácticas de incendios de una instalación aeroportuaria de la red de AENA (Aeropuertos Españoles y Navegación Aérea). La concentración inicial de hidrocarburos totales de petróleo (TPHs) en las muestras empleadas 20 en estos ensayos osciló en un rango que abarcó desde unas 150 partes por millón (ppm) hasta valores superiores a las 80.000 ppm. Las fracciones mayoritarias fueron las alifáticas C₂₁-C₃₄ y C₁₂-C₁₆, siendo la distribución porcentual de las distintas fracciones de hidrocarburo en las muestras empleadas la indicada a continuación:

- 25 a) Fracciones alifáticas: C₅-C₈ (<1%), C₈-C₁₀ (1-8%), C₁₀-C₁₂ (1-7%), C₁₂-C₁₆ (10-35%), C₁₆-C₂₁ (1-12%) y C₂₁-C₃₄ (60-75%).
- b) Fracciones aromáticas: C₈-C₁₀ (<1%), C₁₀-C₁₂ (1-7%), C₁₂-C₁₆ (1-3%), C₁₆-C₂₁ (1-3%) y C₂₁-C₃₅ (<1%).
- 30 c) Fracción TPHs GRO C₁₀ (compuestos orgánicos en el rango de las gasolineras): 2-25%.
- d) Fracción TPHs DRO C₁₀-C₃₅ (compuestos orgánicos en el rango del diesel): 75-98%.

35 La mezcla de la muestra contaminada con el peróxido de hidrógeno se ha realizado mediante el empleo de un agitador magnético Stuart SB161, en condiciones relativamente suaves de agitación (aproximadamente 70 rpm). El volumen total en cada ensayo ha sido de 1.250 mL. En los distintos ensayos realizados con este oxidante se han probado 4 diferentes concentraciones de peróxido (0,1; 1,0; 5,0 y 15,0% v/v) y 3 distintos tiempos de tratamiento (8, 24 y 48 horas).

40 Los resultados mostraron reducciones comprendidas entre un 40% y un 60% de la concentración inicial de contaminante para tratamientos con peróxido de hidrógeno al 1% v/v durante periodos de 24 y 48 horas.

45 Las concentraciones iniciales y finales de hidrocarburos totales de petróleo en cada ensayo se determinaron mediante el método de separación de cadenas por la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrografía de masas (GC-MS).

EJEMPLO 4

Tratamiento fisicoquímico de contaminantes con ozono (O₃)

50 Todos los tratamientos fisicoquímicos con ozono (O₃) se han llevado a cabo en vasos de vidrio PYREX[®], de 5 L de capacidad. Las muestras contaminadas empleadas procedían de una unidad separadora de hidrocarburos (SPH) operativa en el área de prácticas de incendios de

una instalación aeroportuaria de la red de AENA. El contenido inicial en hidrocarburos totales de petróleo (TPHs), así como la distribución porcentual de las distintas fracciones de hidrocarburos son los ya indicados en el Ejemplo 3 anterior.

5 El ozono, generado mediante un ozonizador ECOLOGYC500, ha sido burbujeado en la muestra mediante el empleo de un difusor de material cerámico. El volumen total de muestra en cada ensayo ha sido de 1.250 mL. Para una mayor eficacia en la difusión del gas, la muestra ha sido agitada en condiciones relativamente enérgicas (aproximadamente 100 rpm) durante todo el tiempo de tratamiento. La concentración de ozono en la muestra ha sido controlada periódicamente mediante medida con fotómetro AQUALYTIC AL200 y ha sido estimada en aproximadamente unos 0,15 mg O₃/L durante la duración de los ensayos. En los distintos ensayos realizados con ozono se han probado 2 diferentes tiempos de aplicación del oxidante (1,5 y 3 horas) y 2 distintos pHs iniciales en la muestra a tratar (7 y 10 unidades de pH). El ajuste previo de pH de la muestra hasta alcanzar un valor de 10 unidades se realizó mediante la adición de un volumen adecuado de una disolución de hidróxido sódico (NaOH) 3N.

Se obtuvieron reducciones del 50% de hidrocarburo para un tiempo de tratamiento de 1,5 horas, y próximas al 100% para tratamientos a 3 horas. En ambos casos el pH inicial de la muestra estuvo en torno a las 7 unidades y no fue necesario por tanto ajuste previo de pH.

Las concentraciones iniciales y finales de hidrocarburos totales de petróleo en cada ensayo se determinaron mediante el método de separación de cadenas por la técnica de GC-MS.

25 **EJEMPLO 5**

Tratamiento físicoquímico de contaminantes con peróxido de hidrógeno y ozono (H₂O₂ + O₃)

30 Todos los tratamientos físicoquímicos con peróxido de hidrógeno (H₂O₂, solución acuosa al 30%) y ozono (O₃) se han llevado a cabo en vasos de vidrio PYREX®, de 5 L de capacidad. Las muestras contaminadas empleadas procedían de una unidad separadora de hidrocarburos (SPH) operativa en el área de prácticas de incendios de una instalación aeroportuaria de la red de AENA. El contenido inicial en hidrocarburos totales de petróleo (TPHs), así como la distribución porcentual de las distintas fracciones de hidrocarburos son los ya indicados en el Ejemplo 3 anterior.

40 El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) ha sido utilizado siempre a una concentración del 1% (v/v). El ozono, generado mediante un ozonizador ECOLOGYC500, ha sido burbujeado en la muestra mediante el empleo de un difusor de material cerámico. El volumen total de muestra en cada ensayo ha sido de 1.250 mL. Para una mayor eficacia en la difusión del gas, la muestra ha sido agitada en condiciones relativamente enérgicas (aproximadamente 100 rpm) durante todo el tiempo de tratamiento. La concentración de ozono en la muestra ha sido controlada periódicamente mediante medida con fotómetro AQUALYTIC AL200 y ha sido estimada en aproximadamente unos 0,15 mg O₃/L durante la duración de los ensayos. En los distintos ensayos realizados de forma simultánea con los dos agentes oxidantes se ha trabajado con dos tiempos de aplicación de peróxido de hidrógeno (5 y 24 horas) y tres distintos tiempos de aplicación de ozono (0,5-1,0 y 1,5 horas).

50 Se obtuvieron reducciones de hidrocarburo comprendidas entre un 80 y un 90% del contenido inicial para tiempos de tratamiento combinado de 5 horas con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y 0,5 horas con ozono (O₃).

Las concentraciones iniciales y finales de hidrocarburos totales de petróleo en cada ensayo se determinaron mediante el método de separación de cadenas por la técnica de GC-MS.

EJEMPLO 6**Tratamiento fotoquímico de contaminantes con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radiación ultravioleta (UV)**

5 Los tratamientos fotoquímicos con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radiación ultravioleta (UV) se han llevado a cabo en un reactor de cuarzo de configuración anular, con una capacidad de 700 mL. Las muestras contaminadas empleadas procedían de una unidad separadora de hidrocarburos (SPH) operativa en el área de prácticas de incendios de una instalación aeroportuaria de la red de AENA. El contenido inicial en hidrocarburos totales de petróleo (TPHs), así como la distribución porcentual de las distintas fracciones de hidrocarburos son los ya indicados en el ejemplo 3 que acompaña a esta invención.

15 El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) ha sido utilizado siempre a una concentración del 1% (v/v). La mezcla de la muestra contaminada con el peróxido de hidrógeno se ha realizado mediante el empleo de un agitador magnético Stuart SB161, en condiciones relativamente suaves de agitación (aproximadamente 70 rpm). La radiación UV fue generada mediante una lámpara de mercurio de baja presión Heraeus TQ150, de 150 vatios de potencia, y emitiendo radiación policromática en el rango de 200 a 600 nm, con un pico de emisión destacado a 254 nm. Para la refrigeración de la lámpara se empleó agua destilada recirculada continuamente mediante una bomba peristáltica PERCOM NM. El volumen total de muestra en cada ensayo ha sido de 650 mL. En los distintos ensayos realizados se ha trabajado con dos tiempos de aplicación de peróxido de hidrógeno (2 y 4 horas) y aporte de radiación ultravioleta durante el 10% del tiempo de tratamiento total, es decir, 12 y 24 minutos respectivamente.

25 Se obtuvieron reducciones de hidrocarburo en torno a un 50% del contenido inicial de contaminante para el tratamiento combinado de 4 horas con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) e irradiación con ultravioleta (UV) durante 24 minutos.

30 Las concentraciones iniciales y finales de hidrocarburos totales de petróleo en cada ensayo se determinaron mediante un método de separación de cadenas por la técnica de GC-MS.

EJEMPLO 7**Tratamiento fotoquímico de contaminantes con ozono (O₃) y radiación ultravioleta (UV)**

35 Los tratamientos fotoquímicos con ozono (O₃) y radiación ultravioleta (UV) se han llevado a cabo en un reactor de cuarzo de configuración anular, con una capacidad de 700 mL. Las muestras contaminadas empleadas procedían de una unidad separadora de hidrocarburos (SPH) operativa en el área de prácticas de incendios de una instalación aeroportuaria de la red de AENA. El contenido inicial en hidrocarburos totales de petróleo (TPHs), así como la distribución porcentual de las distintas fracciones de hidrocarburos son los ya indicados en el Ejemplo 3 anterior.

45 El ozono, generado mediante un ozonizador ECOLOGYC500, ha sido burbujeado en la muestra mediante el empleo de un difusor de material cerámico. La difusión del gas en la fase acuosa se ha favorecido mediante el empleo de un agitador magnético Stuart SB161, en condiciones relativamente enérgicas de agitación (aproximadamente 100 rpm). La concentración de ozono en la muestra ha sido controlada periódicamente mediante medida con fotómetro AQUALYTIC AL200 y ha sido estimada en aproximadamente unos 0,15 mg O₃/L durante la duración de los ensayos. La radiación UV fue generada mediante una lámpara de mercurio de baja presión Heraeus TQ150, de 150 vatios de potencia, y emitiendo radiación policromática en el rango de 200 a 600 nm, con un pico de emisión destacado a 254 nm. Para la refrigeración de la lámpara se empleó agua destilada recirculada continuamente mediante una bomba peristáltica PERCOM NM. El volumen total de muestra en cada ensayo ha sido de

650 mL. En los distintos ensayos realizados se ha trabajado con tres tiempos distintos de tratamiento (15, 30 y 60 minutos) durante los cuales el ozono fue burbujeado de forma continua a la muestra contaminada.

- 5 Se obtuvieron reducciones en torno a un 80% del contenido inicial de hidrocarburos para el tratamientos de 30 minutos y muy cercanas al 100% para tratamientos de 60 minutos, con valores de contaminante por debajo de los límites de cuantificación (LC) del método (LC= 100 μ g TPHs/L) [TPHs: Total petroleum hydrocarbons].
- 10 Las concentraciones iniciales y finales de hidrocarburos totales de petróleo en cada ensayo se determinaron mediante el método de separación de cadenas por la técnica de GC-MS.

EJEMPLO 8

15 Tratamiento fotoquímico de contaminantes con peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ozono (O₃) y radiación ultravioleta (UV)

Los tratamientos fotoquímicos con peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ozono (O₃) y radiación ultravioleta (UV) se han llevado a cabo en un reactor de cuarzo de configuración anular, con una capacidad de 700 mL. Las muestras contaminadas empleadas procedían de una unidad separadora de hidrocarburos (SPH) operativa en el área de prácticas de incendios de una instalación aeroportuaria de la red de AENA. El contenido inicial en hidrocarburos totales de petróleo (TPHs), así como la distribución porcentual de las distintas fracciones de hidrocarburos son los ya indicados en el Ejemplo 3 anterior.

25 El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) ha sido utilizado siempre a una concentración del 1% (v/v). El ozono, generado mediante un ozonizador ECOLOGYC500, ha sido burbujeado en la muestra mediante el empleo de un difusor de material cerámico. La mezcla del peróxido de hidrógeno con la muestra y la difusión del gas en la fase acuosa se han favorecido mediante el empleo de un agitador magnético Stuart SB161, en condiciones relativamente enérgicas de agitación (aproximadamente 100 rpm). La radiación UV fue generada mediante una lámpara de mercurio de baja presión Heraeus TQ150, de 150 vatios de potencia, y emitiendo radiación policromática en el rango de 200 a 600 nm, con un pico de emisión destacado a 254 nm. Para la refrigeración de la lámpara se empleó agua destilada recirculada continuamente mediante una bomba peristáltica PERCOM NM. El volumen total de muestra en cada ensayo ha sido de 650 mL. En los distintos ensayos realizados se ha trabajado con un único tiempo de tratamiento (4 horas) y con burbujeo de ozono e irradiación con ultravioleta durante 30 minutos.

40 Se obtuvieron reducciones de hidrocarburo muy próximas al 100% en el tiempo indicado (4 horas), con concentraciones de contaminante por debajo de los límites de cuantificación del método (LC = 100 μ g TPHs/L).

Las concentraciones iniciales y finales de hidrocarburos totales de petróleo en cada ensayo se determinaron mediante el método de separación de cadenas por la técnica de GC-MS.

45 EJEMPLO 9

Tratamiento físicoquímico de contaminantes con peróxido de hidrógeno y ozono (H₂O₂ + O₃)

50 Una muestra de agua potable contaminada artificialmente con dos tipos de combustible, gasolina y gasoil, fue empleada para la simulación de un tratamiento físicoquímico en un separador de hidrocarburos (SPH) operativo en una estación de servicio. La muestra fue contaminada con un volumen de 1,56 mL de cada uno de los dos combustibles citados y agitada durante un corto periodo de tiempo para favorecer la dispersión del contaminante. La concentración inicial de hidrocarburos totales de petróleo en dicha muestra fue estimada en

378.900 mg TPH/L y la distribución porcentual de las distintas fracciones de hidrocarburo en la muestra empleada es la indicada a continuación:

- 5 a) Fracciones alifáticas: C₅-C₈ (<1%), C₈-C₁₀ (30%), C₁₀-C₁₂ (<1%), C₁₂-C₁₆ (5%), C₁₆-C₂₁ (1,5%) y C₂₁-C₃₄ (7%).
- b) Fracciones aromáticas: C₈-C₁₀ (26%), C₁₀-C₁₂ (18%), C₁₂-C₁₆ (<1%), C₁₆-C₂₁ (<1%) y C₂₁-C₃₅ (<1%).
- 10 c) Fracción TPHs GRO C₁₀ (compuestos orgánicos en el rango de las gasolinas): 85%.
- d) Fracción TPHs DRO C₁₀-C₃₅ (compuestos orgánicos en el rango del diesel): 15%.

15 El ataque de la muestra con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y ozono (O₃) se llevó a cabo en las condiciones experimentales similares a las ya descritas en el Ejemplo 5 anterior. Los ataques con peróxido de hidrógeno y ozono se realizaron de forma simultánea durante 24 y 3 horas respectivamente.

20 La reducción de hidrocarburo obtenida en este ensayo se situó en un 70% aproximadamente.

Las concentraciones iniciales y finales de hidrocarburos totales de petróleo en cada ensayo se determinaron mediante el método de separación de cadenas por la técnica de GC-MS.

EJEMPLO 10

Tratamiento biológico de contaminantes con un consorcio bacteriano

25 Los tratamientos biológicos se han realizado en reactores esféricos de vidrio PYREX[®], con una capacidad de 2 L. Las muestras contaminadas empleadas procedían de una unidad separadora de hidrocarburos (SPH) operativa en el área de prácticas de incendios de una instalación aeroportuaria de la red de AENA. El contenido inicial en hidrocarburos totales de petróleo (TPHs), así como la distribución porcentual de las distintas fracciones de hidrocarburos se indican a continuación:

- 35 a) Fracciones alifáticas: C₅-C₈ (<1%), C₈-C₁₀ (1-8%), C₁₀-C₁₂ (1-7%), C₁₂-C₁₆ (10-35%), C₁₆-C₂₁ (1-12%) y C₂₁-C₃₄ (60-75%).
- b) Fracciones aromáticas: C₈-C₁₀ (<1%), C₁₀-C₁₂ (1-7%), C₁₂-C₁₆ (1-3%), C₁₆-C₂₁ (1-3%) y C₂₁-C₃₅ (<1%).
- 40 c) BTEX: benceno (0,5-1,5%), tolueno (1-15%), etilbenceno (0,1-3%) y xilenos (1-15%)
- d) Fracción TPHs GRO C₁₀ (compuestos orgánicos en el rango de las gasolinas): 2-25%.
- 45 e) Fracción TPHs DRO C₁₀-C₃₅ (compuestos orgánicos en el rango del diesel): 75-98%.

Para dichos ensayos, un volumen de muestra de aproximadamente unos 700 mL fue inoculado con un consorcio constituido por las 6 bacterias identificadas en el Ejemplo 1, concretamente:

- 50 a) *Rhodococcus sp.* BIRD 7 (CECT 8211) [con capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones];
- b) *Bacillus sp.* BIRD 8 (CECT 8210) [con capacidad de degradar octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones];

- 5 c) *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212) [con capacidad de degradar dodecano] que incorpora el plásmido TOL (pWW0), con lo que tiene capacidad además para degradar BTEX;
- 10 d) *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213) [con capacidad de degradar hexadecano] que incorpora el plásmido TOL (pWW0), con lo que tiene capacidad además para degradar BTEX;
- 15 e) *Acinetobacter sp.* BIRD 11 (CECT 8214) [con capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones]; y
- 20 f) *Pseudoxanthomonas sp.* BIRD 3 (CECT 7607) [con capacidad de degradar un hidrocarburo aromático policíclico seleccionado del grupo formado por naftaleno y fenantreno y sus combinaciones].

15 Para la formación de este consorcio, y, con unas 24 horas de antelación al comienzo del tratamiento, cada una de las 6 bacterias previamente indicadas fue cultivada previamente en unos 3 mL de medio Luria Bertani (LB). Una vez crecidas, cada uno de los cultivos fue ajustado a un valor de densidad óptica (OD_{660nm}) situado entre 0,05 y 0,2 unidades, tras lo cual un volumen de 0,3 mL de cada uno de estos preinóculos fue añadido a la muestra contaminada. Para favorecer el desarrollo de la masa bacteriana, el medio fue suplementado con nutrientes adecuados (fosfatos, nitrógeno, oligoelementos, etc.) y con un inductor gratuito, no asimilable por los microorganismos, y cuya función es la de activar y/o acelerar las rutas de degradación de los alcanos alifáticos, acortando así los tiempos de aclimatación necesarios. Estos ensayos biológicos fueron llevados a cabo tanto en condiciones estáticas como de agitación suave (aproximadamente 70 rpm) mediante el empleo de un agitador magnético Stuart SB161.

25 Las reducciones de hidrocarburos totales de petróleo (TPHs) observadas en estos ensayos se situaron entre el 80% y el 90% de la cantidad inicial de contaminante, tras tratamientos biológicos por un período de tiempo comprendido entre los 15 y 20 días. Para el conjunto de los BTEX se observaron disminuciones entre el 80% y el 95% del contenido inicial.

30 Las concentraciones iniciales y finales de hidrocarburos totales de petróleo en cada ensayo se determinaron mediante el método de separación de cadenas por la técnica de GC-MS.

EJEMPLO 11

35 Tratamiento fisicoquímico-biológico de contaminantes con peróxido de hidrógeno y un consorcio bacteriano

40 Para los tratamientos biológicos con tratamiento fisicoquímico previo de la muestra, muestras contaminadas con una mezcla compleja de hidrocarburos fueron sometidas a un pretratamiento fisicoquímico de oxidación mediante un ataque con peróxido de hidrógeno a una concentración final del 1 % v/v, por un periodo de tiempo de aproximadamente 24 horas, tras lo cual dichas muestras fueron sometidas a un tratamiento biológico según lo descrito en el Ejemplo 10 anterior. Las muestras contaminadas empleadas procedían de una unidad separadora de hidrocarburos (SPH) operativa en el área de prácticas de incendios de una instalación aeroportuaria de la red de AENA. El contenido inicial en hidrocarburos totales de petróleo (TPHs), así como la distribución porcentual de las distintas fracciones de hidrocarburos son los ya indicados en el Ejemplo 3 anterior.

50 El sistema se mantuvo en agitación suave (aproximadamente 70 rpm) durante los 20 días de duración de cada ensayo biológico. Durante el ataque con peróxido de hidrógeno se apreció en las muestras una reducción próxima a un 50% del hidrocarburo inicialmente presente. El posterior tratamiento biológico aumentó hasta el 98% la cantidad de hidrocarburo desaparecida lográndose porcentajes de reducción ligeramente superiores a los obtenidos en los ensayos exclusivamente biológicos descritos en el Ejemplo 10 anterior.

Las concentraciones iniciales y finales de hidrocarburos totales de petróleo en cada ensayo se determinaron mediante el método de separación de cadenas por la técnica de GC-MS.

5

EJEMPLO 12

Tratamiento biológico de contaminantes con un soporte activo que comprende un consorcio bacteriano

10 Se realizó un tratamiento biológico *in-situ* de la fase acuosa contaminada con hidrocarburo presente en el separador de hidrocarburos (SPH) del área de extinción de incendios de una instalación aeroportuaria de la red de AENA. El contenido inicial en hidrocarburos totales de petróleo (TPHs), así como la distribución porcentual de las distintas fracciones de hidrocarburos son los ya indicados en el Ejemplo 3 anterior.

15 Dicho tratamiento se llevó a cabo mediante la adición al separador de un soporte activo proporcionado por esta invención. Este soporte, fabricado en polietileno de alta densidad, tiene forma de rueda dentada con un diámetro aproximado de 14 mm. Presenta una densidad aproximada de $0,96 \text{ g/cm}^3$, lo cual le confiere capacidad de flotación en fases acuosas y gracias a su forma proporciona un aumento significativo de la superficie disponible para el crecimiento bacteriano, estimado en $650 \text{ m}^2/\text{m}^3$. El área del separador objeto del tratamiento fue la zona comprendida entre la placa deflectora de entrada y la placa filtrante, con una superficie aproximada de unos $0,5 \text{ m}^2$ ($0,53 \times 0,80 \text{ m}$). En esta zona se añadieron unos 40 L de cultivo y suficiente soporte activo para cubrir completamente la superficie de trabajo indicada. El ensayo tuvo una duración de 40 días durante los cuales dicho soporte activo fue ampliamente colonizado por el consorcio bacteriano identificado en el Ejemplo 10 anterior.

20 Para un cultivo a mayor escala del consorcio formado por las 6 bacterias previamente identificadas se utilizaron reactores de 30 L de capacidad con cierre hermético, cada uno de los cuales fue llenado con unos 15 L de medio mineral mínimo M9 e inoculado con un consorcio bacteriano constituido por los microorganismos de la invención, preparados de forma análoga a lo indicado en el ejemplo 10 que acompaña a esta invención. Posteriormente se añadió a cada reactor un volumen de aproximadamente 1 L de soporte, suficiente para cubrir toda la superficie del líquido. Los reactores se mantuvieron en reposo y a temperatura ambiente durante 15 días para permitir la colonización del soporte plástico por parte del consorcio. Transcurrido este tiempo el conjunto cultivo/soporte estuvo listo para su aplicación en el separador.

30 Una vez finalizado el ensayo, el soporte activo fue retirado del separador y la concentración final de TPHs en la fase acuosa del separador fue determinada mediante el método habitual según lo descrito en los Ejemplos anteriores. Los resultados obtenidos en este ensayo indicaron un porcentaje de desaparición del contaminante superior al 95%.

EJEMPLO 13

Tratamiento físicoquímico-biológico de contaminantes con peróxido de hidrógeno y un soporte activo que comprende un consorcio bacteriano

45 Se realizó un tratamiento *in-situ* de la fase acuosa contaminada con hidrocarburo presente en el separador de hidrocarburos (SPH) del área de extinción de incendios de una instalación aeroportuaria de la red de AENA. El contenido inicial en hidrocarburos totales de petróleo (TPHs), así como la distribución porcentual de las distintas fracciones de hidrocarburos son los ya indicados en el Ejemplo 3 anterior.

El área del separador objeto del tratamiento fue la zona comprendida entre la placa deflectora de entrada y la placa filtrante, con una superficie aproximada de unos $0,5 \text{ m}^2$ ($0,53 \times 0,80 \text{ m}$). El

tratamiento consistió en un pretratamiento físicoquímico del residuo con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) durante 48 horas, seguido de un posterior tratamiento biológico en las condiciones ya indicadas en el Ejemplo 12. El volumen de peróxido de hidrógeno añadido a la zona de actuación fue de aproximadamente unos 2,5 litros. El agente oxidante se distribuyó de forma superficial sobre la fase acuosa contaminada mediante el uso de un sistema aspersor manual de aire comprimido tipo mochila. Este sistema permite una mayor distribución y dispersión del agente oxidante sobre la superficie a tratar. Tras 15 días de tratamiento el soporte activo fue retirado del separador y el contenido en hidrocarburos totales de petróleo se determinó de la forma habitual. La reducción de contaminante en este ensayo se estimó en algo más del 98% con respecto al contenido inicial transcurridos 15 días desde el comienzo del tratamiento biológico.

EJEMPLO 14

Determinación de la cinética de degradación de un hidrocarburo aromático policíclico (HAP) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para determinar las cinéticas de biodegradación de naftaleno y fenantreno, 200 mg de cada uno de estos HAPs se disolvieron en metanol para disponer de una disolución stock de 20 mg HAP/mL. Por otro lado, se prepararon una serie de erlenmeyers de 150 mL con tapón de rosca, a los que se añadió un volumen de 15 mL de medio mineral mínimo M9. A cada uno de los matraces se añadió entonces un volumen de 80 μ L del stock de HAP previamente preparado, para obtener una concentración inicial de aproximadamente 105 μ g HAP/mL. Tras 1 hora de agitación para favorecer la homogeneización del medio, éste fue inoculado con 0,15 mL de un preinóculo de la cepa bacteriana *Pseudoxanthomonas sp.* BIRD 3 (CECT 7607). Este preinóculo se preparó con 24 horas de antelación a la inoculación de los medios de forma análoga a lo indicado anteriormente en el ejemplo 10 que acompaña a esta invención. Los cultivos fueron incubados durante toda la duración del ensayo a 150 rpm y 30°C de temperatura. Controles sin inocular se prepararon también de la misma forma para descartar la desaparición abiótica del hidrocarburo. No se llevaron a cabo pruebas similares para el resto de las bacterias identificadas en el Ejemplo 1 ya que los estudios preliminares (Ejemplo 1) habían dado resultados negativos para la biodegradación de naftaleno y fenantreno.

Con la periodicidad deseada, erlenmeyers por duplicado fueron empleados para la determinación de la concentración de HAP. Para ello, a cada uno de los erlenmeyers se añadieron 15 mL de metanol, y la mezcla cultivo/metanol fue mantenida en agitación durante 2 horas para permitir la extracción del HAP. Tras la agitación, se tomó una alícuota de 4 mL de mezcla que fue añadida a un tubo de vidrio Pyrex® de 15 mL de capacidad que contenía otros 4 mL de metanol. El tubo fue agitado enérgicamente durante 2 minutos mediante vórtex. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 4.000 rpm durante un período de 5 minutos para separar la biomasa presente. Un volumen de aproximadamente 1 mL de sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de nylon de 0,22 μ m, tras lo cual la muestra quedó lista para su inyección en el sistema cromatográfico. El equipo empleado fue un Agilent Technologies 1200 Series, equipado con sendos detectores de matriz de diodos (DAD) y de fluorescencia (FLD). La columna cromatográfica empleada fue una ZORBAX Eclipse PAH (5 μ m, 4.6x150 mm) especialmente recomendada para la determinación de estos compuestos. Para la determinación de los HAPs de forma individual se operó con una fase móvil acetonitrilo/agua en régimen isocrático (60/40) y un flujo de 2 mL/min. Los resultados indicaron una degradación del 100% del naftaleno inicial en un periodo de 48 horas y de aproximadamente un 95% de fenantreno inicial en un periodo de unas 96 horas

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento biológico para reducir el contenido de hidrocarburos presentes en un medio acuoso que comprende una mezcla de hidrocarburos, en donde dicha mezcla de hidrocarburos comprende

10 a) un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, triacontano, hexatriacontano y sus combinaciones;

b) un hidrocarburo aromático policíclico (HAP) seleccionado del grupo formado por naftaleno y fenantreno, y sus combinaciones; y

15 c) un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno y sus combinaciones (BTEX),

comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicho medio acuoso contaminado por dicha mezcla de hidrocarburos con una mezcla bacteriana que comprende

20 - al menos una bacteria que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, triacontano, hexatriacontano y sus combinaciones; y

25 - al menos una bacteria que degrada un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones; y

30 - al menos una bacteria que degrada un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno y sus combinaciones (BTEX).

35 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha mezcla bacteriana comprende una bacteria del género *Rhodococcus* que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones.

40 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicha bacteria del género *Rhodococcus* que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones es la bacteria *Rhodococcus* sp. BIRD 7, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 8211, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones.

45 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha mezcla bacteriana comprende una bacteria del género *Bacillus* que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones.

50 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicha bacteria del género *Bacillus* que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones es la bacteria *Bacillus* sp. BIRD 8, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 8210, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha mezcla bacteriana comprende, además, una bacteria del género *Pseudomonas* que degrada dodecano.

5 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicha bacteria del género *Pseudomonas* que degrada dodecano es la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 8212, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano.

10 8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha mezcla bacteriana comprende, además, una bacteria del género *Pseudomonas* que degrada hexadecano.

15 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicha bacteria del género *Pseudomonas* que degrada hexadecano es la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 8213, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano.

20 10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha mezcla bacteriana comprende una bacteria que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones.

25 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicha bacteria del género *Acinetobacter* que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones es la bacteria *Acinetobacter sp.* BIRD 11, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 8214, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones.

30 12. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha mezcla bacteriana comprende una bacteria del género *Pseudoxanthomonas* que degrada un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones.

35 13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que dicha bacteria del género *Pseudoxanthomonas* que degrada un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones, es la bacteria *Pseudoxanthomonas sp.* BIRD-3, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 7607, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dicho HAP.

40 14. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha bacteria que degrada dicho hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno, y sus combinaciones (BTEX), es una bacteria que incorpora el plásmido TOL (pWW0).

45 15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que dicha bacteria que incorpora el plásmido TOL (pWW0) es la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212) que incorpora dicho plásmido TOL (pWW0), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano e incorpora dicho plásmido TOL (pWW0), o la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), que incorpora dicho plásmido TOL (pWW0), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano e incorpora dicho plásmido TOL (pWW0).

50 16. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha mezcla bacteriana comprende:

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- a) al menos una bacteria del género *Rhodococcus* que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones;
 - b) al menos, una bacteria del género *Bacillus* que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones;
 - c) al menos una bacteria del género *Pseudomonas* que degrada dodecano;
 - d) al menos una bacteria del género *Pseudomonas* que degrada hexadecano;
 - e) al menos una bacteria del género *Acinetobacter* que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones;
 - f) al menos una bacteria del género *Pseudoxanthomonas* que degrada un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones; y
 - g) al menos una bacteria que incorpora el plásmido TOL (pWW0) que degrada un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno, y sus combinaciones (BTEX).
17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que dicha mezcla bacteriana comprende:
- a) al menos la bacteria *Rhodococcus sp.* BIRD 7 (CECT 8211), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones;
 - b) al menos la bacteria *Bacillus sp.* BIRD 8 (CECT 8210), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones;
 - c) al menos la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano;
 - d) al menos la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano;
 - e) al menos la bacteria *Acinetobacter sp.* BIRD 11 (CECT 8214), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones;
 - f) al menos la bacteria *Pseudoxanthomonas sp.* BIRD-3 (CECT 7607), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones; y
 - g) al menos una bacteria seleccionada del grupo formado por (i) la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano, que incorpora el plásmido TOL (pWW0), (ii) la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que

tiene la capacidad de degradar hexadecano, que incorpora el plásmido TOL (pWW0), y (iii) una combinación de las bacterias (i) y (ii).

5 18. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que dicha mezcla bacteriana comprende:

- 10 a) al menos la bacteria *Rhodococcus sp.* BIRD 7 (CECT 8211), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones;
- 15 b) al menos la bacteria *Bacillus sp.* BIRD 8 (CECT 8210), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones;
- c) al menos la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano;
- 20 d) al menos la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano;
- e) al menos la bacteria *Acinetobacter sp.* BIRD 11 (CECT 8214), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones; y
- 25 f) al menos la bacteria *Pseudoxanthomonas sp.* BIRD-3 (CECT 7607), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones;
- 30

en donde, al menos, una de dichas bacterias c) *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano, o d) *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano, incorpora el plásmido TOL (pWW0), que confiere capacidad para degradar un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno y sus combinaciones (BTEX).

35

40 19. Procedimiento según la reivindicación 1, 17 ó 18, en el que dicha mezcla bacteriana es un consorcio bacteriano.

20. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que dicho consorcio bacteriano comprende:

- 45 a) al menos una bacteria del género *Rhodococcus* que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones;
- b) al menos, una bacteria del género *Bacillus* que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones;
- 50 c) al menos una bacteria del género *Pseudomonas* que degrada dodecano;
- d) al menos una bacteria del género *Pseudomonas* que degrada hexadecano;

e) al menos una bacteria del género *Acinetobacter* que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones;

5

f) al menos una bacteria del género *Pseudoxanthomonas* que degrada un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones; y

10

g) al menos una bacteria que incorpora el plásmido TOL (pWW0) que degrada un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno, y sus combinaciones (BTEX).

21. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que dicho consorcio bacteriano comprende:

15

a) al menos la bacteria *Rhodococcus sp.* BIRD 7 (CECT 8211), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones;

20

b) al menos la bacteria *Bacillus sp.* BIRD 8 (CECT 8210), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones;

25

c) al menos la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano;

d) al menos la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano;

30

e) al menos la bacteria *Acinetobacter sp.* BIRD 11 (CECT 8214), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones;

35

f) al menos la bacteria *Pseudoxanthomonas sp.* BIRD-3 (CECT 7607), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno y sus combinaciones; y

40

g) al menos una bacteria seleccionada del grupo formado por (i) la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano, que incorpora el plásmido TOL (pWW0), (ii) la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano, que incorpora el plásmido TOL (pWW0), y (iii) una combinación de las bacterias (i) y (ii).

45

22. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que dicho consorcio bacteriano comprende:

50

a) al menos la bacteria *Rhodococcus sp.* BIRD 7 (CECT 8211), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones;

- b) al menos la bacteria *Bacillus sp.* BIRD 8 (CECT 8210), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones;
- 5 c) al menos la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano;
- d) al menos la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano;
- 10 e) al menos la bacteria *Acinetobacter sp.* BIRD 11 (CECT 8214), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones; y
- 15 f) al menos la bacteria *Pseudoxanthomonas sp.* BIRD-3 (CECT 7607), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones;

20 en donde, al menos, una de dichas bacterias c) *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano, o d) *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano, incorpora el plásmido TOL (pWW0), que confiere capacidad para degradar un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno y sus combinaciones (BTEX).

25

23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que dichas bacterias están adheridas a un soporte sólido inerte formando un biofilm bacteriano, en donde dicho soporte sólido inerte comprende un material que tiene una densidad inferior a la del agua.

30

24. Procedimiento según la reivindicación 23, en el que dicho soporte sólido inerte comprende un material seleccionado del grupo formado por arcilla expandida, vermiculita, espuma de poliuretano, poliestireno expandido, piedra pómez, virutas de madera, serrín, y combinaciones de los mismos.

35

25. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, que comprende someter dicho medio acuoso que comprende dicha mezcla de hidrocarburos a un tratamiento fisicoquímico previo al tratamiento biológico, comprendiendo dicho tratamiento físicoquímico poner en contacto dicho medio acuoso con un agente oxidante con capacidad para degradar al menos un hidrocarburo presente en dicha mezcla de hidrocarburos.

40

26. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, que comprende someter dicho medio acuoso que comprende dicha mezcla de hidrocarburos a un tratamiento fotoquímico previo al tratamiento biológico, comprendiendo dicho tratamiento fotoquímico poner en contacto dicho medio acuoso con un agente oxidante con capacidad para degradar al menos un hidrocarburo presente en dicha mezcla de hidrocarburos, y una radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda (λ) adecuada en función del agente oxidante.

45

27. Procedimiento según la reivindicación 25 ó 26, en el que dicho agente oxidante se selecciona del grupo formado por peróxido de hidrógeno, ozono y sus combinaciones.

50

28. Procedimiento según la reivindicación 27, en el que dicho peróxido de hidrógeno se suministra mediante un sistema de spray o aspersor, manual o automático, de aire comprimido.

29. Una bacteria del género *Rhodococcus* (*Rhodococcus* sp. BIRD 7), depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 8211, que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones.
30. Una bacteria del género *Bacillus* (*Bacillus* sp. BIRD 8), depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 8210, que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones.
31. Una bacteria del género *Pseudomonas* (*Pseudomonas* sp. BIRD 9), depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 8212, que degrada dodecano, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano.
32. Una bacteria del género *Pseudomonas* (*Pseudomonas* sp. BIRD 10), depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 8213, que degrada hexadecano, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano.
33. Una bacteria del género *Acinetobacter* (*Acinetobacter* sp. BIRD 11), depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 8214, que degrada un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones.
34. Una bacteria del género *Pseudoxanthomonas* (*Pseudoxanthomonas* sp. BIRD 3), depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 7607, que degrada un hidrocarburo aromático policíclico (HAP) seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno y sus combinaciones, o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno y sus combinaciones.
35. Bacteria según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 34, que tiene, además, capacidad para desarrollar mecanismos de adhesión a la superficie de un material con una densidad inferior a la del agua.
36. Un cultivo biológicamente puro de una bacteria según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 35.
37. Un cultivo que comprende una mezcla de las bacterias definidas en las reivindicaciones 29 a 35.
38. Cultivo según la reivindicación 37, en el que dicha mezcla bacteriana comprende:
- a) al menos la bacteria *Rhodococcus* sp. BIRD 7 (CECT 8211), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del

grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones;

- 5 b) al menos la bacteria *Bacillus sp.* BIRD 8 (CECT 8210), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones;
- 10 c) al menos la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano;
- 15 d) al menos la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano;
- 20 e) al menos la bacteria *Acinetobacter sp.* BIRD 11 (CECT 8214), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones; y
- f) al menos la bacteria *Pseudoxanthomonas sp.* BIRD-3 (CECT 7607), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un HAP.

25 39. Cultivo según la reivindicación 36, 37 ó 38, en el que dicha mezcla bacteriana comprende, además, una bacteria que degrada un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno, y sus combinaciones.

30 40. Cultivo según la reivindicación 39, en el que dicha bacteria que degrada dicho hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno, y sus combinaciones, es una bacteria que incorpora el plásmido TOL (pWW0).

35 41. Cultivo según la reivindicación 40, en el que dicha bacteria que incorpora el plásmido TOL (pWW0) es la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212) que incorpora dicho plásmido TOL (pWW0), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano e incorpora dicho plásmido TOL (pWW0), o la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), que incorpora dicho plásmido TOL (pWW0), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano e incorpora dicho plásmido TOL (pWW0).

40 42. Cultivo según cualquiera de las reivindicaciones 36 a 41, en el que dicha mezcla bacteriana forma un consorcio bacteriano.

43. Un consorcio bacteriano que comprende:

- 45 a) al menos la bacteria *Rhodococcus sp.* BIRD 7 (CECT 8211), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones;
- 50 b) al menos la bacteria *Bacillus sp.* BIRD 8 (CECT 8210), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones;
- c) al menos la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano;

- d) al menos la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano;
- 5 e) al menos la bacteria *Acinetobacter sp.* BIRD 11 (CECT 8214), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones;
- 10 f) al menos la bacteria *Pseudoxanthomonas sp.* BIRD-3 (CECT 7607), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno y sus combinaciones; y
- 15 g) al menos una bacteria seleccionada del grupo formado por (i) la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano, que incorpora el plásmido TOL (pWW0), (ii) la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano, que incorpora el plásmido TOL (pWW0), y (iii) una combinación de las bacterias (i) y (ii).
- 20 44. Consorcio bacteriano según la reivindicación 43, que comprende:
- a) al menos la bacteria *Rhodococcus sp.* BIRD 7 (CECT 8211), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, eicosano, docosano, tetracosano, octacosano, hexatriacontano y sus combinaciones;
- 25 b) al menos la bacteria *Bacillus sp.* BIRD 8 (CECT 8210), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar octano, hexadecano, octacosano, triacontano, y sus combinaciones;
- 30 c) al menos la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano;
- 35 d) al menos la bacteria *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano;
- 40 e) al menos la bacteria *Acinetobacter sp.* BIRD 11 (CECT 8214), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un alcano alifático seleccionado del grupo formado por dodecano, hexadecano, eicosano, docosano, tetracosano y sus combinaciones; y
- 45 f) al menos la bacteria *Pseudoxanthomonas sp.* BIRD-3 (CECT 7607), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar un HAP seleccionado del grupo formado por naftaleno, fenantreno, y sus combinaciones;

en donde, al menos, una de dichas bacterias c) *Pseudomonas sp.* BIRD 9 (CECT 8212), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar dodecano, o d) *Pseudomonas sp.* BIRD 10 (CECT 8213), o una mutante de la misma que tiene la capacidad de degradar hexadecano, incorpora el plásmido TOL (pWW0), que confiere capacidad para degradar un hidrocarburo aromático seleccionado del grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno y sus combinaciones (BTEX).

50

- 5 45. Un soporte sólido activo que comprende un soporte sólido inerte y un biofilm bacteriano, en donde dicho soporte sólido inerte comprende un material con una densidad inferior a la del agua, y dicho biofilm bacteriano comprende un cultivo biológicamente puro según la reivindicación 36 de cada una de las bacterias definidas en las reivindicaciones 29 a 35, o un cultivo bacteriano según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 42, o un consorcio bacteriano según la reivindicación 43 ó 44.