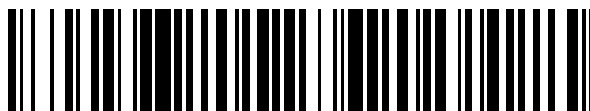


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 412**

51 Int. Cl.:

C02F 3/34

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2008** **E 08709469 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014** **EP 2125640**

54 Título: **Biorremediación**

30 Prioridad:

20.02.2007 GB 0703271

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.11.2014

73 Titular/es:

**MICROBIAL SOLUTIONS LIMITED (100.0%)
The Christian Building, Oxford University,
Begbroke Science Park, Yarnton
Oxford OX5 1PF, GB**

72 Inventor/es:

**THOMPSON, IAN, P. y
VAN DER GAST, CHRISTOPHER, JOHN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 523 412 T3

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

DESCRIPCIÓN

Biorremediación

La presente divulgación se refiere al uso de consorcios de microorganismos en el tratamiento de residuos industriales, a preparaciones de tales consorcios y a biorreactores y sistemas de tratamiento que los contienen.

- 5 Los fluidos de trabajo de metales (MWF) son un componente esencial de las instalaciones de fabricación pesadas (que incluye el motor de automóvil, transmisión y plantas de estampado). En concreto, se utilizan como refrigerantes y lubricantes para corte de metales y molienda, y operaciones de perforación. Los residuos de MWF contribuyen a la gran mayoría de los compuestos orgánicos en las aguas de desecho producidas por dichas plantas de fabricación.
- 10 Los MWF se formulan típicamente para incluir productos químicos que inhiben la corrosión de los metales y la actividad microbiana (biocidas), al mismo tiempo que lubrican y enfrían el proceso de cortado del metal. Puede ser un ambiente extremo para los microbios, con una alta alcalinidad (pH en el intervalo de 9 a 11) y temperaturas extremas cuando el fluido está en uso.
- 15 En el Reino Unido, se producen anualmente 400 millones de litros de residuos de MWF, y las cifras mundiales se estiman en $22,4 \times 10^9$ litros al año [1]. Una vez que los MWF basados en aceite se han convertido en agotados operativamente, se tratan normalmente mediante medidas tales como la ultrafiltración. Esta tecnología establecida se utiliza en muchas industrias, incluyendo las de teñido, alimentos y cosméticos. La alta presión del flujo transversal del fluido a través de tubos de membrana (tamaños de poro de 0,01-0,1 μm) provoca que las moléculas más pequeñas penetren a través de las membranas y las moléculas más grandes de aceite sean retenidas [2] para su eliminación o posterior procesamiento o tratamiento.
- 20 Métodos de separación y concentración para el tratamiento in situ se han aplicado normalmente a los efluentes de MWF. Sin embargo, un mayor uso de formulaciones modernos sintéticas miscibles en agua ha aumentado la incidencia de las cargas de contaminación en el efluente final, ya que muchos de los componentes sintéticos son fácilmente permeables a través de las membranas de filtración. Estos compuestos (incluyendo agentes antimicrobianos y otros xenobióticos) pueden ser potencialmente tóxicos para la vida acuática y han causado
- 25 grandes problemas en las plantas de tratamiento de aguas negras por la sobrecarga y la muerte de los microorganismos, lo que origina multas sustanciales para la empresa infractora [1]. Con la implementación de varias directivas de la Unión Europea y directivas federales de los Estados Unidos que regulan la descarga de efluentes, por ejemplo, se está convirtiendo cada vez en más importante para la industria de fabricación el asumir mayores niveles de responsabilidad por los residuos que produce [3-6], y encontrar métodos alternativos para tratar sus efluentes de desecho.
- 30 Una solución para manejarse el efluente acuoso producido es añadir una etapa de tratamiento biológico después del tratamiento inicial de separación. Sin embargo, el tamaño de poro de las membranas utilizadas en la ultrafiltración ($\leq$ 0,1 micras) produce la eliminación de la biomasa microbiana autóctona y, así, es necesario volver a inocular los residuos con las comunidades microbianas apropiadas al pasar el efluente a un biorreactor. Típicamente, se han
- 35 utilizado comunidades indefinidas de lodos activados. Actualmente, los biorreactores establecidos para la eliminación de los MWF se operan habitualmente utilizando un enfoque de "caja negra", inoculados con comunidades microbianas indefinidas de aguas negras, una fuente muy heterogénea y potencialmente peligrosa, que bien pueden albergar patógenos. Esto, combinado con la necesidad del pre-tratamiento por ultrafiltración, hace el proceso completo consumidor de tiempo, costoso y potencialmente peligroso para el medio ambiente.
- 40 La bioaumentación con cultivos microbianos definidos, o cepas seleccionadas especializadas, es controversial y no es una técnica ampliamente aceptada, siendo vista como una solución universal a los problemas de biorremediación en general, o como inútil y costosa [7]. Hay muchos ejemplos de bioaumentación exitosa de una gran variedad de habitats y sistemas, incluyendo; suelo [8, 9]; aguas subterráneas [10]; y aguas de desecho industrial [11, 12]. Independientemente de la opinión, el paso necesario de pre-tratamiento de separación de los MWF de desecho, tal
- 45 como la ultrafiltración, elimina cualquier biomasa microbiana autóctona junto con la fracción de aceite residual de las aguas de desecho y, así, es necesario volver a inocular el residuo cuando pasa al sistema del biorreactor.
- 50 Los MWF vienen en tres tipos; sintético, semi-sintético, y basado en aceite. Los dos primeros son más fáciles en cuanto a trabajar con ellos, pero los resultados de los MWF basados en aceite son sustancialmente superiores, por lo general debido a la longitud más larga de cadena presente en los aceites de origen natural. Esta misma propiedad es una gran desventaja cuando se va a eliminar el MWF de desecho, y no existe un tratamiento conocido para bioremediación de los MWF basados en aceite que no implique el pre-tratamiento fisicoquímico del MWF para eliminar el aceite, u otro lubricante, antes de que los microorganismos sean añadidos.

Biotechnology Progress, **19**, 1156-1161, describe el uso de una suspensión bacteriana para degradar MWF sintéticos. La reducción máxima de la demanda química de oxígeno fue de sólo el 80% después de cuatro días. Además, el consorcio indicado en este documento no es capaz de digerir MWF basados en aceite o semi-sintéticos.

5 Biotechnology and Bioengineering, **89**, 3, 357-366, describe un sistema bacteriano de suspensión que se utiliza para degradar un MWF ultrafiltrado, semi-sintético que tiene una baja demanda química de oxígeno.

Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, **29**, 20-27, describe un método para aislar los microbios para su uso potencial en el tratamiento de los MWF. El método comprende el crecimiento de cultivos en placas que contienen componentes de MWF.

10 Polish Journal of Environmental Studies, **14**, 1, 73-79, describe el uso de múltiples microorganismos para reducir la demanda química de oxígeno de un MWF diluido. Los microorganismos se describen como inmovilizados, pero tuvieron que ser reemplazados cada tres días. Una reducción de DQO a 2.000 a partir de un punto de partida bajo de 15.000 tomó dos semanas. Este proceso no es práctico desde un punto de vista industrial, ya que a) el MWF tiene que ser diluido y neutralizado, b) el cultivo tiene que ser reemplazado continuamente, y c) el punto final toma demasiado tiempo en alcanzarse.

15 Se describe un consorcio de microorganismos que es capaz de digerir MWF no tratado de todas las fuentes (sintéticas, semisintéticas y basados en aceite).

20 Sorprendentemente, se ha descubierto ahora que los microorganismos seleccionados de entre los que se encuentran en asociación con los MWF semisintéticos son capaces de ser utilizados en el tratamiento de los MWF de desecho sin ningún fraccionamiento previo o separación previa o cualquier otra forma de proceso de pre-tratamiento que se requiera.

25 Los aspectos y realizaciones de la presente invención se establecen en las reivindicaciones. La presente divulgación proporciona un método para reducir la demanda química de oxígeno (DQO) de los fluidos de trabajo de metales (MWF) de desecho sin tratar, que comprende poner en contacto el MWF con un consorcio de microorganismos capaces de crecer en los MWF semisintéticos no tratados, en donde el consorcio tiene al menos cuatro miembros que se seleccionan de al menos uno de cada uno de *Agrobacterium spp.*, *Comamonas spp.*, *Methylobacterium spp.*, y *Microbacterium spp.*

30 La demanda química de oxígeno (DQO) es una medida de la cantidad de oxígeno que sería necesario para oxidar los componentes de los materiales tales como los efluentes de desecho, y generalmente se considera que es una medida del contenido orgánico de dichos materiales. DQO se mide en mg l^{-1} . El nivel actualmente tolerado para la DQO de las aguas de desecho en el Reino Unido es de 2.000 mg l^{-1} , aunque es probable que este nivel se reduzca.

35 Tal como se usa en este documento, el término 'de desecho', tal como se utiliza en relación con los MWF, indica un MWF después de ser usado. Los MWF se proporcionan generalmente como concentrados que deben ser diluidos a entre aproximadamente 6% a 12% p/v en agua antes de su uso. Los métodos de la invención son adecuadas para tratar los concentrados diluidos sin un tratamiento adicional, tal como ultrafiltración o pasos de dilución adicionales. De hecho, se prefiere que el MWF a ser tratado no haya sido ultrafiltrado.

40 Tal como se usa aquí, el término 'no tratados' indica que el MWF no ha sido filtrado, ultrafiltrado, fraccionado, separado por cualquier otro medio, tratado químicamente, o de otra forma procesado, con posterioridad a su uso normal y antes de ponerse en contacto con el consorcio. El MWF de desecho puede ser tratado para mejorar la capacidad del consorcio para reducir la DQO del MWF de desecho, o para facilitar la manipulación de los mismos, y dicho tratamiento puede implicar el calentamiento y/o dilución. La neutralización por tratamiento ácido/álcali adecuado para mejorar el medio ambiente para el consorcio puede ser deseable. En general, tales tratamientos no son necesarios, y es una ventaja de la invención que los MWF de desecho puedan ser utilizados en los métodos de la invención inmediatamente después de su uso y sin ningún tipo de pre-tratamiento.

45 El consorcio para el uso en la invención puede ser utilizado en cualquier manera adecuada, y puede ser añadido directamente, preferiblemente como un cultivo, al MWF de desecho, que puede ser tratado con el consorcio en cubas, tanques o depósitos, preferiblemente con agitación mecánica mientras la DQO se reduce, preferiblemente de una manera análoga a una planta de aguas negras. El MWF de desecho también puede ser procesado junto con el consorcio de cualquier otra forma deseada, tal como por procesamiento continuo a través de una serie de tanques o depósitos, o a través de tuberías, y dejar que sea liberado en el medio ambiente una vez que la DQO se haya reducido suficientemente.

50 El cultivo del consorcio puede ser recogido del MWF procesado para la reutilización, si se desea.

Se ha encontrado que los consorcios forman una biopelícula particularmente eficaz capaz de reducir los niveles de DQO en exceso de 50.000 mg l^{-1} a 2.000 mg l^{-1} o menos en cuestión de días.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para reducir la demanda química de oxígeno (DQO) de los fluidos de trabajo de metales (MWF) de desecho, preferiblemente sin ser tratados, lo que comprende poner en contacto los MWF con una biopelícula, en donde la biopelícula tiene al menos cuatro miembros que se seleccionan de al menos uno de cada uno de *Agrobacterium spp.*, *Comamonas spp.*, *Methylobacterium spp.*, y *Microbacterium spp.*, dicha biopelícula es capaz de crecer en los MWF semi-sintéticos no tratados.

Como se usa en este documento, "no tratados" indica que el MWF no se ha diluido, filtrado, ultrafiltrado, o de otra forma tratado después de su uso principal en la elaboración de metal y antes de ponerse en contacto con la biopelícula.

El término 'biopelícula' se utiliza en este documento para describir una comunidad de microorganismos que, en conjunto, son capaces de una mayor reducción de DQO de un MWF dado, y preferiblemente de todos los MWF, que pudiera lograrse por el efecto acumulativo de cada uno de los miembros de la familia individualmente. Para mayor comodidad, generalmente nos referiremos de aquí en adelante a las biopelículas, pero se apreciará que esto incluye una referencia a los consorcios de la divulgación, a menos que de otro modo sea evidente por el contexto.

Debido a que las biopelículas son comunidades, en lugar de asociaciones sueltas de microorganismos individuales, por lo general, son capaces de resistir las perturbaciones de las condiciones tales como la variación de la temperatura, el pH o la carga contaminante. Las biopelículas son autosuficientes en condiciones permisivas, y las biopelículas de la presente divulgación se seleccionan preferiblemente para que sean autosuficientes en un MWF semi-sintético, preferiblemente Hysol X®. Condiciones permisivas también implicará preferentemente una temperatura de entre 10° C y 37° C, y/o un pH de entre 6 y 9, aunque las temperaturas y los pH fuera de este rango sean frecuentemente suficientes para permitir el crecimiento, aunque este no puede ser tan grande como cuando estos parámetros están en los intervalos preferidos. Asimismo, se prefiere que las biopelículas de la divulgación sean capaces de crecer en todos los MWF disponibles comercialmente, tanto cuando los MWF se han preparado para su uso como una vez de desecho. Se apreciará que las biopelículas de la divulgación son particularmente preferidas para uso con los MWF de desecho.

Las biopelículas se seleccionan preferiblemente según su abundancia a través de varios lugares geográficos. Por lo general, no es suficiente simplemente seleccionar los organismos individuales por la velocidad a la que crecen en un MWF de desecho seleccionado, sino que, por ejemplo, se seleccionan organismos que cohabiten, algunos de los cuales muestran sólo un bajo crecimiento en el medio, por sí solo, y que no tienen gran impacto en la degradación del medio, ya que son éstos los que prestan estabilidad a otros miembros del consorcio. La selección solamente de organismos de alto crecimiento también es probable que conduzca a la selección de agentes patógenos, tales como *Enterobacter* o verdaderas *pseudomonas*, lo que sería peligroso para el medio ambiente una vez que el MWF tratado fuera liberado.

Los consorcios preferidos de la divulgación son aquellos que son capaces de crecer en condiciones extremas, tales como pH 9, 10° C y una DQO de entre 50.000 y 100.000 mg l⁻¹.

En un aspecto alternativo, la presente divulgación proporciona un biorreactor adecuado para reducir la demanda química de oxígeno (DQO) de fluidos de trabajo de metales (MWF) de desecho preferiblemente no tratados, el biorreactor comprende una biopelícula que tiene al menos cuatro miembros que se seleccionan de al menos uno de *Agrobacterium spp.*, *Comamonas spp.*, *Methylobacterium spp.*, y *Microbacterium spp.*, dicha biopelícula es capaz de crecer en los MWF semi-sintéticos no tratados.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para la reducción de la demanda química de oxígeno (DQO) de los residuos de MWF sin tratar, que comprende poner en contacto el MWF con una biopelícula o biorreactor como se definió. Este aspecto es particularmente adecuado para los MWF sintéticos, así como semi-sintéticos y los MWF basados en aceite.

Los MWF a ser tratados por biopelículas o biorreactores de la presente divulgación están preferiblemente sin tratar. Pasos del tratamiento pueden emplearse como se señala en este documento, y pueden implicar el calentamiento si la temperatura ambiente puede originar el catabolismo lento desde la biopelícula, por ejemplo, cuando la temperatura cae por debajo de aproximadamente 10° C, y/o dilución, preferiblemente con agua, para diluir los lodos para un mejor acceso al biorreactor, por ejemplo.

Es una ventaja particular de la presente invención que los biorreactores sean autosostenibles y que, salvo un hecho, como un evento tóxico, la biopelícula no necesite sustitución, incluso después de que un número de lotes han sido tratados. De hecho, como se ilustra en los Ejemplos adjuntos, la eficacia de las biopelículas y biorreactores de la divulgación generalmente aumenta con el tiempo, ya que la biopelícula se estabiliza y los miembros establecen un equilibrio.

El término "biorreactor" se utiliza en este documento para describir un aparato adaptado para soportar una biopelícula de la invención y para permitir que la biopelícula se ponga en contacto con el MWF de desecho. Tales biorreactores también se pueden usar para el tratamiento de cualquier otro residuo líquido susceptible a la degradación por las biopelículas de la divulgación, pero están destinados principalmente para el tratamiento de los MWF de desecho.

El biorreactor de la invención comprenderá generalmente uno o más soportes para la biopelícula que puede formar una película sobre él, y en donde el soporte está adaptado para proporcionar un área de superficie significativa para la exposición al MWF. El biorreactor comprenderá generalmente un lumen o depósito en el que se introduce el MWF, con la biopelícula que se proporciona sobre el soporte a lo largo de toda, o de una parte sustancial, de la luz del depósito. En cualquiera de los casos, generalmente es preferible conservar el MWF en el biorreactor durante un período suficiente para llevar la DQO al nivel objetivo. Como se describe a continuación, un nivel objetivo adecuado es de 2.000 mg l⁻¹, o menos, pero puede seleccionarse cualquier valor objetivo adecuado. También puede ser deseable operar los biorreactores en secuencia, de manera que el MWF o bien se recicla a través de biorreactores o bien es alimentado a través de biorreactores en secuencia hasta que un nivel de DQO objetivo se alcanza.

Como se señaló anteriormente, los biorreactores de la divulgación también se pueden adaptar para un rendimiento continuo.

La naturaleza precisa del biorreactor no es importante para la presente invención, y puede ser deseable utilizar una matriz abierta que pueda ser sumergida en MWF inmóvil o con movimiento lento del MWF, por ejemplo. También estará claro para la persona experta que, a medida que la biopelícula crece, no sólo se extenderá para cubrir la superficie disponible dentro del biorreactor, sino que también impregnará el MWF, de modo que los residuos tratados contendrán una cantidad sustancial del consorcio que compone la biopelícula. Por esta razón, es importante evitar el uso de agentes patógenos en la biopelícula en la medida de lo posible.

Por lo tanto, la presente divulgación proporciona además una biopelícula y/o biorreactor como se define en este documento, en donde la biopelícula no contiene sustancialmente patógenos, y preferiblemente no contiene patógenos en absoluto.

Se apreciará que la presente invención proporciona el uso de un biorreactor, como se definió en este documento, en la reducción de la DQO del MWF de desecho. La divulgación además proporciona un aparato para uso como un biorreactor de la presente invención y una preparación bacteriana adecuada para sembrar dicho aparato para proporcionar un biorreactor de la presente invención. Además se proporciona un líquido residual tratado por un método o biorreactor de la presente invención, especialmente donde dichos residuos es MWF de desecho, y más especialmente donde la DQO de los residuos es de 2.000 mg l⁻¹ o inferior.

La presente divulgación también proporciona un método para la reducción de la demanda química de oxígeno (DQO) de fluidos de trabajo de metales (MWF) de desecho, que comprende poner en contacto los MWF con una combinación de microorganismos capaces de crecer en los MWF semi-sintéticos no tratados.

Los MWF de desecho son los que se han utilizado, tal como se describe anteriormente, y son apropiados para su eliminación. El método de la invención puede ser utilizado en MWF no utilizados, pero se apreciará que esto no será normalmente contemplado, ya que se despediciarían los MWF que de otro modo podrían ser utilizados para su propósito establecido.

También se proporciona un método para reducir la demanda química de oxígeno (DQO) de un MWF destinado a la eliminación, que comprende poner en contacto el MWF con una combinación de microorganismos capaces de crecer en MWF semi-sintético no tratado.

Si bien se prefiere particularmente usar MWF semi-sintéticos y basados en aceite, ya sea que son de desecho o destinados a ser eliminados, la presente invención también es aplicable a MWF sintéticos.

La DQO de los MWF a base de aceite, tales como Shell Dromus B®, puede superar los 60.000 mg l⁻¹. Estos altos niveles de contaminación orgánica también han sido previamente asociados con la imposibilidad de utilizar cualquier forma de biorremediación, ya que la alta carga contaminante prohíbe el crecimiento.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para la reducción de la demanda química de oxígeno (DQO) de un MWF que tiene una DQO de 15.000 o mayor, y preferiblemente 20.000 o mayor, y lo más preferiblemente incluso hasta 95.000 o 100.000 o mayor, que comprende poner en contacto el MWF con una biopelícula o biorreactor como se definió. Este aspecto es particularmente adecuado para los MWF sintéticos, así como semi-sintéticos y MWF basados en aceite.

Es una ventaja particular de los métodos de la presente invención que es posible reducir la DQO de los MWF por debajo de 2.000 mg l⁻¹, y preferiblemente por debajo de 1.000 mg l⁻¹, y lo más preferiblemente a 500 mg l⁻¹ o por

debajo. En realizaciones preferidas, como se ilustra en los ejemplos adjuntos, se consigue esta reducción en 2 días o menos, en condiciones adecuadas, como se describe a continuación en este documento.

Es una ventaja adicional de la presente invención que los métodos también reducen la toxicidad de MWF como se mide por la prueba de bioluminiscencia del *Vibrio fischeri*.

- 5 Las combinaciones de microorganismos utilizadas en los métodos de la presente divulgación también se denominan en el presente documento como consorcios, y cada consorcio comprende al menos 4 bacterias como se definieron.

Los microorganismos de los consorcios típicamente pueden incluir protozoos, bacterias y/o hongos, pero excelentes resultados se han obtenido con consorcios de solo bacterias. Por lo tanto, los miembros de cada consorcio generalmente se denominan en este documento bacterias, aunque se apreciará que cualquiera de dichas referencias incluye la referencia a cualquier microorganismo adecuado, a menos que sea otro modo evidente por el contexto.

Los miembros preferidos de cada consorcio se aíslan de los MWF naturalmente obtenidos de lugares geográficamente distintos. Las bacterias más preferidas son aquellas que ocurren en cada muestra ensayada, pero se prefiere que las bacterias seleccionadas se produzcan en al menos una pluralidad de MWF probados.

- 15 Las bacterias seleccionadas para su uso en los métodos de la presente divulgación pueden ser seleccionadas según los parámetros adecuados, pero los parámetros preferidos incluyen, al menos, la capacidad degradante, la tolerancia a los co-contaminantes, y la extensión geográfica.

El número de bacterias en cualquier consorcio dado no es crítico para la presente invención, pero el número mínimo es cuatro, aunque se prefiere cinco.

- 20 No hay ningún límite en particular para el número de miembros que cualquier consorcio pueda tener, pero se prefiere generalmente constituir un consorcio para su uso en el método de la presente divulgación a partir de preparaciones o cultivos individuales de los miembros del consorcio con el fin de que los miembros no compitan en la ausencia de MWF. Se apreciará, por lo tanto, que la restricción de los números de los miembros proporcionará una ventaja logística, aunque no debería ser inferior a cuatro miembros.

- 25 En los Ejemplos adjuntos, se seleccionaron cinco bacterias para constituir un consorcio. Estas fueron *Agrobacterium radiobacter*, *Comamonas testosteroni*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Microbacterium esteraromaticum* y *Microbacterium saperdae*. Estas cinco bacterias se depositaron en el NCIMB (Bucksburn, Aberdeen, Reino Unido) el 20 de febrero de 2007.

Un consorcio particularmente preferido tiene las cinco de estas bacterias presentes.

- 30 Es una ventaja particular de la presente invención que los consorcios preferidos demuestren efectos sinérgicos, ya que el crecimiento del consorcio y la reducción de la toxicidad supera el crecimiento de cualquier cepa de bacteria sola en circunstancias similares.

Se apreciará que las bacterias para su inclusión en un consorcio de la presente invención se seleccionan de *Agrobacterium spp.*, *Comamonas spp.*, *Methylobacterium spp.*, *Microbacterium spp.*, y mezclas de las mismas. Se apreciará que cualquier bacteria seleccionada debe ser capaz de crecimiento en el MWF para el tratamiento en presencia de los otros miembros del consorcio, y preferiblemente en ausencia de otros miembros del consorcio. Consorcios preferidos son capaces de crecer en un MWF basado en aceite.

- Los métodos de la presente invención generalmente se llevan a cabo durante un tiempo y bajo condiciones tales que la DQO se reduce a un nivel deseado. La cantidad de tiempo dependerá de parámetros tales como la naturaleza del MWF, el nivel de partida de DQO, la temperatura y el pH, pero generalmente estará entre cinco y veinte días. Más específicamente, un tiempo de aproximadamente ocho a aproximadamente catorce días es a menudo suficiente, aunque incluso de 2-4 o 5, preferiblemente de 3-4 y más preferiblemente de 3 días es suficiente.

El MWF no necesita ningún tratamiento antes del contacto con un consorcio de la divulgación, aunque pre-tratamientos que no sean excesivamente tóxicos, y preferiblemente no tóxicos en absoluto, a la biopelícula se pueden aplicar si se desea. Después de su uso, un MWF de desecho o gastado tendrá generalmente una DQO de alrededor de 100.000 o menos, con un promedio preferido de alrededor de 50.000-60.000, y consorcios de la divulgación han demostrado ser capaces de tratar tales MWF. Sin embargo, puede ser deseable diluir el MWF para ayudar en la reducción más rápida de la DQO, por ejemplo, o puede ser deseado diluir el MWF tratado.

- Los métodos de la presente invención pueden llevarse a cabo en un intervalo de pHs. Los MWF a menudo tienen un pH natural que es bastante alto, en la región de pH 9, y se ha establecido que los métodos de la invención están optimizados alrededor de aproximadamente un pH neutro, siendo preferible un pH de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 7, ambos inclusive.

Sin embargo, otra ventaja inesperada de la presente invención es que los métodos también reducen el pH del MWF desde el intervalo alcalino normal hacia la neutralidad. Aunque no es esencial, esto es particularmente preferido cuando se utiliza Shell Dromus®.

5 Es posible calentar el MWF durante el tratamiento con el consorcio, pero esto puede resultar caro, y no es necesario. Sin embargo, si se desea calentar el MWF de desecho, entonces es posible utilizar temperaturas de hasta 40° C, pero preferiblemente no superior a 37° C, pero las temperaturas de entre 10 y 30° C son generalmente aceptables con una temperatura óptima de aproximadamente 28° C. Cualquier temperaturas fuera de este intervalo se puede seleccionar de acuerdo con el consorcio utilizado y de las condiciones ambientales.

10 El método utilizado para tratar el MWF puede ser cualquiera que sea adecuado. Por ejemplo, una preparación del consorcio se puede añadir directamente al MWF y dejarse reposar durante un período de tiempo adecuado, tal como dos semanas. Al final de este tiempo, una muestra del fluido se puede tomar con el fin de inocular el siguiente lote. El inconveniente de este proceso es que la eficacia del consorcio a menudo tiende a estar reducida después de un número de ciclos, y después debe añadirse más cultivo. El proceso puede ser asistido por agitación y/o aireación. Este proceso puede ser utilizado para sembrar un biorreactor, por ejemplo.

15 Se prefiere el uso de biorreactores y, como se ha descrito anteriormente, éstos pueden tener cualquier forma estándar. Las bacterias preferidas de la presente divulgación se ha encontrado que recubren soportes estándar sin condiciones especiales. Sin embargo, generalmente es ventajoso preparar el consorcio deseado y después exponer el consorcio al soporte. Se prefiere particularmente mezclar el consorcio con medio de crecimiento, que puede ser el MWF cuando el biorreactor se siembra primeramente.

20 La ventaja del biorreactor es doble. Usando el biorreactor, se ha encontrado que el consorcio retiene su potencia incluso después de un número de ciclos, e incluso parece ser sustancialmente más eficaz en algunas circunstancias, como se ilustra en los Ejemplos adjuntos. El uso de un biorreactor también parece aumentar sustancialmente el efecto de desintoxicación o depuración del MWF, de tal manera que la reducción de la DQO no sólo es más rápida, sino más pronunciada. Una reducción a 2.000 mg l⁻¹ se puede ver a menudo en sólo uno o dos días usando un
25 biorreactor, y esto es una ventaja particular de la presente invención.

Lo que es particularmente sorprendente es que los métodos de la presente invención pueden ser practicados sobre los MWF, en particular sobre los MWF basados en aceite, que no han sido fraccionados o filtrados o, preferiblemente, tratados de cualquier otro modo antes del tratamiento, reduciendo así sustancialmente los gastos y molestias.

30 Se apreciará que los métodos de la presente invención se pueden usar para el tratamiento de cualquier MWF, o cualquier otro efluente industrial de naturaleza similar, pero que es particularmente ventajoso que los MWF basados en aceite no tratados puedan ser tratados.

Se prefiere el uso de un biorreactor de la invención para tratar los MWF basados en aceite, particularmente los MWF basados en aceite no tratados y lo más preferiblemente sin filtrar.

35 Los consorcios de la presente divulgación tienen la ventaja de ser capaces de crecer de forma natural en el MWF, pero también son capaces de ser utilizados para la bio-aumentación. Este enfoque ha dado lugar a un tratamiento que es capaz de sobrepasar muy sustancialmente la realización de cualquier otro tipo de inóculo en términos de capacidad de degradación. Estudios de biorreactores a largo plazo muestran que no sólo los consorcios bacterianos de la divulgación persisten con el tiempo, sino que también pueden mantener con eficacia el tratamiento de
40 diferentes tipos de aguas de desecho de fluidos de trabajo de metales (incluidos los fluidos completos basados en aceite) a distintos niveles de demanda química de oxígeno (carga de contaminación).

Los siguientes ejemplos son para propósitos ilustrativos, y no son limitantes de la invención en modo alguno, aunque las realizaciones preferidas se ilustran en este documento.

Experimental

45 En los Ejemplos adjuntos, se seleccionaron cinco bacterias para constituir un consorcio. Estas fueron *Agrobacterium radiobacter* (NCIMB 41462 (5-BA-A), *Comamonas testosteroni* (NCIMB 41463 (1-BTZ-0)), *Methylobacterium mesophilicum* (NCIMB 41464 (20-BTZ-N)), *Microbacterium esteraromaticum* (NCIMB 41465 (15-BTZ-N)) y *Microbacterium saperdae* (NCIMB 41466 (1-TEA-C)). Estas cinco bacterias se depositaron en el NCIMB (National
50 Collections of Industrial Food and Marine Bacteria, Bucksburn, Aberdeen, Reino Unido) el 20 de febrero 2007, bajo el Tratado de Budapest. Las letras de los códigos entre paréntesis siguen los números de acceso que reflejan los sustratos a partir de los cuales se originaron las cepas, por ejemplo BA, BTZ o TEA.

Cada cepa se cultivó en placas de cultivo, y una sola colonia se extrajo y se incubó durante la noche a 28° C, antes de ser sembradas y cultivadas de nuevo (durante la noche en un incubador estático a 28° C) para asegurar la

pureza de la cepa. El procedimiento se repitió tantas veces como fue necesario para confirmar que no había otras morfologías, pero por término medio un procedimiento de "estrias en zig zag" fue suficiente. Las bacterias se cosecharon después utilizando técnicas asépticas. Se resuspendieron 50 mg de biomasa bacteriana en un tubo criogénico de almacenamiento con 8 ml de glicerol y 1 ml de caldo de soja triptico (una cuchara sopera). Las muestras se almacenaron después en un congelador por debajo de -70° C. Para sacar un cultivo de almacenamiento, el criotubo se retiró del congelador, se mantuvo en hielo, y se utilizó un asa estéril para extraer las bacterias del cultivo a fin de sembrarlas en las placas de cultivo que se incubaron durante la noche a 28° C.

La selección de las cepas de los miembros del consorcio dependía de tres criterios: A) la capacidad de degradación, B) la tolerancia a los co-contaminantes, y C) abundancia espacial y temporal en los MWF operacionalmente agotados como se describió anteriormente [14, 15]. El objetivo principal fue:

1) construir un consorcio de degradación basado en los criterios descritos anteriormente;

2) probar y comparar el rendimiento de degradación, en sistemas de biorreactores a escala de laboratorio en modo de funcionamiento por lotes, del consorcio bacteriano frente a otros tipos de inóculos (detallado en la sección de resultados); y,

3) determinar cómo mejorar el rendimiento de degradación del consorcio bacteriano construido mediante la optimización de las condiciones del reactor, incluyendo; a) modificación del pH altamente alcalino (pH> 9) de las aguas de desecho del MWF de prueba; b) operación del bioreactor de secuencia de lotes en suspensión libre a largo plazo; y, c) operación del bioreactor de secuencia de lotes de película fija a largo plazo y rendimiento de degradación del consorcio frente a diferentes aguas de desecho de los MWF.

Los datos resultantes y los conocimientos adquiridos a partir de estos estudios a nivel de laboratorio (5 litros de volumen) se utilizaron después como base para desarrollar un sistema de reactor a escala piloto (5.000 litros) en una zona industrial.

1. Crecimiento y selección de consorcios bacterianos

Las bacterias fueron seleccionadas mediante la realización de un programa sistemático de selección basado en tres criterios de selección que reflejan las principales características de la comunidad microbiana. Estos fueron:

1) el predominio numérico de las poblaciones dentro del hábitat de destino (MWF de desecho);

2) la tolerancia a los co-contaminantes (MWF está mezclado químicamente); y

3) la capacidad de degradar los componentes químicos individuales del MWF.

Se llevó a cabo un análisis extenso de la composición de la comunidad y estructura de una formulación única de MWF, tanto temporal como espacialmente a escala mundial utilizando métodos de perfiles moleculares, a fin de identificar las poblaciones microbianas ubicuas en los MWF de desecho. Los ciclos de selección posteriores se basaron entonces en la capacidad de los aislados de tolerar la toxicidad de los co-contaminantes y de catabolizar los componentes químicos individuales del MWF.

Dos consorcios bacterianos se ensamblaron a partir de;

A) Los MWF semi-sintéticos, y

B) Los MWF sintéticos,

A) Consorcio de Hysol semisintético

El efluente acuoso de MWF utilizado fue principalmente un fluido semi-sintético (Hysol X, Castrol Limited, Reino Unido) que se utiliza como refrigerante y lubricante en los procesos de trabajo continuo de metales a gran escala. Antes del tratamiento biológico, el MWF había sido tratado por ultrafiltración (UF), dejando un permeado que contenía los siguientes principales componentes químicos; benzotriazol, boro, ácido cítrico, formaldehído, monoetanolamina, morfina y trietanolamina. Para los estudios de biorreactores el Hysol X permeado se filtró dos veces a través de filtros de 0,2 µm de tamaño de poro (35 mm de diámetro, Millipore, Reino Unido) para eliminar las posibles poblaciones microbianas del fondo que podían haber colonizado el fluido entre las etapas de UF y las de tratamiento biológico.

El objetivo de este enfoque fue determinar la eficacia de una estrategia para la construcción de consorcios microbianos para el tratamiento de efluentes industriales mezclados químicamente. Hysol X semi-sintético MWF fue elegido como las aguas de desecho de prueba, ya que se consideró que representaban un efluente particularmente indeseable. Después de tres etapas de enriquecimiento en caldo mínimo con Hysol X MWF ultrafiltrado como única

- fuelle de nutrientes, los métodos fenotípicos complementarios (dependientes del cultivo) y genotípicos (independientes del cultivo) revelaron que las comunidades microbianas en MWF de desecho tenían una baja diversidad y eran muy similares en la composición de las especies, a pesar de que las muestras procedían de diferentes lugares y usos. De 300 aislamientos bacterianos analizados, sólo 11 géneros y 9 especies fueron identificados utilizando el análisis de éster metílico de ácido graso (FAME) dependiente del cultivo. Los resultados del análisis genotípico por electroforesis en gel de gradiente desnaturalizado (DGGE) fueron congruentes con las observaciones realizadas mediante el análisis de FAME. El potencial metabólico de los aislamientos se evaluó en términos de capacidad de asimilación y tolerancia de los co-contaminantes según lo descrito previamente [14].
- Los cinco aislamientos seleccionados (*Agrobacterium radiobacter*, *Comamonas testosteroni*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Microbacterium esteraromaticum* y *Microbacterium saperdae*) que formaban el consorcio fueron representativos de las poblaciones más abundantes detectadas en muestras separadas geográfica y temporalmente. Además, se ha encontrado sorprendentemente que la capacidad metabólica combinada de las cinco cepas, cuando se cultivan juntas, es mayor que la suma de las cepas individuales cuando crecen por separado en el MWF de desecho ultrafiltrado.
- Identificación microbiana y evaluación fenotípica
- La diversidad fenotípica e identificación de cepas individuales aisladas a partir de MWF se determinó por análisis del éster metílico de ácido graso (FAME), esencialmente como se describe por Thompson *et al* (1993) y van der Gast *et al* (2001). Las muestras fueron inyectadas en un cromatógrafo de gases, modelo Hewlett-Packard 5890 serie II y los picos de ácidos grasos nombrados según el software del Microbial Identification System (MIS) (Microbial ID, Newark, Delaware, Estados Unidos), y los aislados se identificaron usando el MIS 'Aerobe Library'. Se calcularon las similitudes entre los aislados utilizando un coeficiente basado en la distancia euclídiana entre pares de aislamientos. El análisis por algoritmo de agrupamiento se realizó con el programa de MIS "dendrogram program" utilizando el método de grupo de pares no ponderados con medias aritméticas (UPGMA).
- Cribado rápido de la utilización del componente del fluido de trabajo de metales
- Se evaluó la capacidad de las bacterias aisladas del MWF para asimilar componentes del fluido como únicas fuentes de carbono mediante la inoculación de cada aislamiento en pocillos de placas de microtitulación que contenían 100 µl de medio mínimo M9 y 3% v/v de Hysol X permeado como única fuente de carbono. Las placas de microtitulación maestras (que contenían todos los 300 aislamientos bacterianos) fueron incubadas a 28° C durante la noche o hasta que el caldo de los medios se enturbió. Las bacterias se transfirieron desde las placas de microtitulación maestras a los 96 pocillos de placas de microtitulación de fondo plano que contenían medio mínimo M9 y componentes individuales sintéticos de MWF (biocida basado en formaldehído, benzotriazol, ácido cítrico, formaldehído, monoetanolamina, morfina y trietanolamina) añadidos a una concentración de 5 mM, utilizando puntas de 200 µl dispuestas en el mismo patrón que los pocillos en las placas de microtitulación. Las placas se cubrieron con película de sellado de placa (Sigma, Poole, Reino Unido) para evitar la contaminación cruzada o evaporación y se incubaron durante 7 días a 28° C. La densidad óptica se midió cada 24 horas a una longitud de onda de 620 nm utilizando un luminómetro de microplaca LUCY I (Rosys Anthos, Suiza). Este método permite un rápido cribado de todos los 300 aislados bacterianos en cuanto a la tolerancia y la capacidad de asimilar componentes individuales del MWF como fuente de carbono.
- El consorcio que fue aislado constaba de cinco cepas bacterianas: *Agrobacterium radiobacter* (cepa designada 5-BA-A); *Comamonas testosteroni* (1-BTZ-O); *Methylobacterium mesophilicum* (20-BTZ-N); *Microbacterium esteraromaticum* (15-BTZ-N) y *Microbacterium saperdae* (1-TEA-C). Estas cinco cepas reunieron los tres criterios de selección, ya que
- 1) eran omnipresentes en muestras separadas, espacial y temporalmente
 - 2) podían degradar los componentes químicos del MWF,
 - 3) eran tolerantes a co-contaminantes.
- Las cinco cepas se inocularon por separado en frascos cónicos de 250 ml que contenían 100 ml de caldo de soja triptico (10% v/v. Difco, Reino Unido) y aguas residuales de MWF (3% v/v) pre-filtradas (utilizando un filtro de tamaño de 0,2 µm de poro, Millipore, Reino Unido). Los cultivos individuales se incubaron a 28° C en un agitador orbital durante 12 horas (recuento de células aproximadamente 10⁷ células ml⁻¹). Las suspensiones de células se retiraron y se resuspendieron en aguas residuales de MWF, se mezclaron entre sí y se añadieron como un inóculo al 10% v/v a los biorreactores.

Condiciones de inoculación

El consorcio bacteriano se reconstituyó mediante la inoculación de las cepas almacenadas individualmente por separado en matraces cónicos de 250 ml que contenían 50 ml de caldo de soja tríptico (10% v/v, Difco, Reino Unido) y concentrado de MWF fresco (3% v/v). Los monocultivos fueron incubados entonces a 28° C en un agitador orbital durante 12 horas (recuento de células aproximadamente 10^7 células ml⁻¹). Las suspensiones celulares se eliminaron por centrifugación y se resuspendieron en el efluente de MWF, se mezclaron entre sí y se añadieron como un inóculo al 10% v/v a los biorreactores. Los biorreactores de lodos activados, después de la centrifugación, se inocularon con 3 g de biomasa húmeda resuspendida como se ha descrito anteriormente.

B) MEQQEM-COB sintético

El MWF sintético usado (Castrol Limited, Pangbourne, Berks, Reino Unido) se utiliza como refrigerante y lubricante en los procesos de trabajos de metales continuos a gran escala para maquinari carburo de tungsteno y acero. El fluido comprendía ocho componentes químicos principales incluyendo un biocida a base de formaldehído; benzotriazol (pasivador metálico); ácido dodecanodioico, ácido láurico, ácido sebácico y amina (inhibidores de la corrosión); glicerol y propilenglicol (agentes de lubricación). Se suministra como un concentrado y típicamente se diluye con agua para formar un fluido de trabajo del 6% v/v antes de su uso en operaciones de mecanizado.

Muestras de MWF sintético operacionalmente agotado que contenían comunidades microbianas autóctonas se utilizaron como una fuente de cepas para desarrollar inóculos. Estas se originaron en: Corby, Inglaterra; Belfast, Irlanda del Norte; y dos muestras de Swindon, Inglaterra, todas las cuales tenían una historia de aplicación diferente. Se seleccionaron muestras de diferentes lugares con el fin de construir un consorcio que tendría aplicaciones de amplio alcance (por ejemplo, variando la concentración y la aplicación de los residuos de MWF). Las cepas capaces de utilizar MWF sintético fresco como una fuente de nutrientes fueron enriquecidas a partir de cuatro muestras de los MWF operacionalmente agotados, mediante la adición de los fluidos a matraces cónicos de 250 ml que contenían 97 ml de medio mínimo M9 [16], a un pH de 7,5 con 3 ml de concentrado de MWF fresco. Las muestras de MWF operacionalmente agotado (2% v/v) se añadieron a matraces individuales y se incubaron a 28° C en un incubador con agitación orbital a 170 rpm. Después de siete días, muestras de la suspensión de cada matraz al 2% v/v fueron sub-cultivadas en medio fresco (como se describió anteriormente). Después de otros siete días, sub-muestras de cada matraz al 2% v/v se inocularon en matraces que contenían medio mínimo M9 y componentes de MWF individuales a una concentración de 5 mM. Los matraces se incubaron como se describió anteriormente, se diluyeron serialmente alícuotas de 100 ml del medio y se distribuyeron alícuotas de 50 µl en placas sobre agar de medio mínimo M9 (Agar No. 3, Oxoid Reino Unido) que contenía componentes individuales a una concentración de 5 mM. Las placas se incubaron a 28° C durante tres días. Siguiendo el enfoque de Baecker *et al.* (1989) [2], la dilución seriada de muestras más alta que produjo crecimiento en las placas se consideró que consistía en los microorganismos más comunes de las muestras originales. Fue a partir de estas placas que se tomaron todas las colonias y repetidamente se sembraron en estrías en zig zag para obtener cultivos puros [2]. Los cultivos de bacterias puras se transfirieron posteriormente a placas de 10% v/v de caldo de soja tríptico más agar (TSBA) (Oxoid, Reino Unido).

Bibliografía

Baecker, AAW, K. le Roux, y A. von Holy (1989) Microbiological contaminants of metal-working fluids in service. *S Afr J Sci.* **85**: 293-295.

Thompson, IP, MJ Bailey, RJ Ellis, y KJ Purdy. (1993) Subgrouping of bacterial populations by cellular fatty acid composition. *FEMS Microbiol Ecol.* **102**: 75-84.

van der Gast, CJ, CJ Knowles, MA Wright, y IP Thompson. (2001) Identification and characterisation of bacterial populations of an in-use metal-working fluid by phenotypic and genotypic methodology. *Int Biodet Biodeg.* **47**: 113-123

van der Gast, CJ, CJ Knowles, M. Starkey, e IP Thompson (2002) Selection of microbial consortia for treating metal-working fluids. *J Ind Microbiol Biotechnol* **29**: 20-27

2. Investigaciones de degradación y de nutrición

Todos los datos experimentales que se mencionan a continuación se refieren al trabajo realizado con el consorcio derivado del MWF semi-sintético.

1. Dinámica temporal y actividad de degradación del inóculo bacteriano para el tratamiento de residuos de MWF.

Para que los sistemas de biorreactores establecidos sean eficaces en el tratamiento de residuos químicamente mixtos tales como los MWF era esencial que albergaran poblaciones microbianas que pudieran mantener biomasa activa suficiente y degradar cada uno de los componentes químicos presentes. Usando un escenario del peor caso de aguas residuales de MWF para el tratamiento biológico (un MWF semi-sintético fresco [Hysol X, Castrol Limited])

que había sido ultrafiltrado), probamos y comparamos el rendimiento de degradación del consorcio construido frente a otros tipos de inóculos. Todos los estudios fueron realizados en biorreactores sellados de suspensión libre de 5 litros en operación de lote (3 biorreactores replicados más un control abiótico para cada condición de inóculo), donde se mantuvieron la temperatura y el flujo de aire a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $3,33\text{ l min}^{-1}$, respectivamente.

- 5 Tipos de inóculos comparativos incluidos; 1. Lodos activados, una fuente de inóculos de uso común para el tratamiento biológico de los residuos de MWF; 2. Comunidad microbiana autóctona al Hysol X MWF operativamente agotado (pre-ultrafiltración); 3. Un inóculo disponible comercialmente diseñado para tratar las aguas residuales de petróleo y las aguas residuales basadas en MWF; 4. Comunidades microbianas tomadas de un sistema de tratamiento de MWF en una planta de fabricación de automóviles (Dagenham, Reino Unido).

- 10 Después de 14 días de operación la DQO se redujo por:

Lodos activados $17\% \pm 6,7\%$;

Comunidad microbiana autóctona al MWF $11\% \pm 3,9\%$;

El inóculo disponible comercialmente aumentó la carga de contaminación (DQO) por 8% de la carga de DQO inicial de 12.000 mg l^{-1} (Figura 1).

- 15 Inóculo del reactor de Ford $1\% \pm 1,6\%$;

Consortio bacteriano $55\% \pm 1,7\%$.

La Figura 1 muestra el rendimiento de los inóculos en términos de disminución de la DQO (contaminación). Las barras de error representan la desviación estándar de la media ($n = 3$).

- 20 El perfil genotípico de la comunidad mediante DGGE reveló que la dinámica de la comunidad del consorcio bacteriano se mantuvo estable y mantuvo $> 90\%$ de similitud entre todas las muestras replicadas y de punto de tiempo durante la operación de 14 días. La dinámica de las comunidades autóctonas de MWF se conservó, pero la composición de la comunidad cambió con el tiempo. Para las condiciones de inóculos restantes su composición de la comunidad fue muy divergente, donde los perfiles difirieron entre todas las muestras de biorreactor de replicados y de punto de tiempo. En esencia, a diferencia de los otros tipos de inóculos donde el rendimiento fue variable, el
- 25 consorcio demostró un rendimiento consistente.

2. Optimización del rendimiento del consorcio bacteriano y supervivencia.

2a) Efectos de modificaciones del pH en el tratamiento biológico de las aguas residuales de los fluidos de trabajo de metales.

- 30 El objetivo de este estudio fue investigar si la modificación del pH altamente alcalino ($\text{pH} > 9$) de las aguas residuales de los fluidos de trabajo de metales mejoraría el tratamiento biológico por el consorcio bacteriano construido introducido en biorreactores sellados a escala de laboratorio. Los intervalos de pH ensayados fueron de 6, 7, 8 y 9, con tres biorreactores en modo de lote repetidos inoculados con el inóculo bacteriano (más un biorreactor de control abiótico) operados para cada una de las cuatro condiciones de pH. Después de 14 días, la reducción final de la media de la demanda química de oxígeno (DQO) a pH 9 fue de $50\% \pm 1,4\%$; a pH 8, $58\% \pm 1,4\%$; a pH 7, $65\% \pm 1,0\%$; y a pH 6, $75\% \pm 2,7\%$ de la DQO inicial (aproximadamente 10.000 mg l^{-1}), respectivamente.
- 35

- Curiosamente, al cabo de 5 días, el pH en todos los biorreactores inoculados progresó hacia pH 8. Sin embargo, todos los biorreactores de control abiótico se mantuvieron en el pH modificado. El destino del inóculo, determinado mediante electroforesis en gel desnaturalizado de gradiente (DGGE) con análisis de conglomerados de los perfiles de DGGE resultantes, reveló que los inóculos sobrevivieron durante toda la operación de todos los biorreactores con el pH modificado. Medidas de la abundancia bacteriana se determinaron por recuento total DAPI con microscopía. El recuento total DAPI en los biorreactores a pH 6 y 7 aumentó de aproximadamente 3×10^7 a 4×10^9 células ml^{-1} . La abundancia bacteriana dentro de los biorreactores a pH 8 y pH 9 varió poco yendo desde aproximadamente 3×10^7 a 8×10^7 células ml^{-1} . No se detectaron células en ninguno de los biorreactores de control abiótico. Se utilizó PCR de heterogeneidad de longitud (LH-PCR) para realizar un seguimiento de la dinámica de población temporal de las
- 40
- 45 cepas individuales en todos los biorreactores inoculados (Figura 2).

La Figura 2 muestra la composición del consorcio bacteriano determinada por PCR de heterogeneidad de longitud (expresada como % relativo de la abundancia de fragmento LH-PCR), dentro de los biorreactores con el pH modificado durante 14 días. Las barras de error representan la desviación estándar de la media ($n = 3$).

- 50 Solamente los picos correspondientes a las cepas del consorcio se detectaron durante todo el estudio y no se detectaron otros picos a partir de cualquiera de los biorreactores de pH abióticos. Después de 7 días de operación,

se encontró que *M. esteraromaticum* era la población más abundante en todos los biorreactores independientemente del pH.

Por lo tanto, parece que el pH óptimo está en la región de pH 6-7, y que es ventajoso ajustar el pH de aguas residuales de MWF de pH 9 a pH entre 6 y 7, para lograr un tratamiento biológico óptimo.

- 5 Estos resultados se obtuvieron durante un período de 14 días en funcionamiento en modo de lotes. El siguiente paso fue realizar ensayos extensos de biorreactor, en operación en modo de secuencia de lotes, a fin de evaluar el destino a largo plazo y el rendimiento del inóculo.

2b) Estudios de suspensión en modo de secuencia de lotes a largo plazo.

- 10 Se realizaron estudios de tratamiento de aguas residuales de MWF en un biorreactor abierto de 5 litros de volumen en modo de secuencia de lotes (aproximadamente una duración de 14 días por cada secuencia de lotes). El pH se mantuvo a 6 durante toda la operación del biorreactor. Al inicio de cada secuencia, se bombeó 4 l de efluente tratado hacia fuera y se rellenó con MWF Hysol X ultrafiltrado no tratado. El flujo de aire se mantuvo a $3,33 \text{ l min}^{-1}$ y la temperatura se mantuvo a $28^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$. Las cepas individuales fueron incubadas cada una en 100 ml de caldo de soja triptico y 3% v/v MWF Hysol X concentrado fresco a 28°C durante 12 horas (recuento de células = 10^7 células ml^{-1}).
- 15 Las suspensiones de células se retiraron y se resuspendieron en aguas residuales de MWF, se mezclaron entre sí y se añadieron como un 10% v/v de inóculo al biorreactor.

- 20 La demanda química de oxígeno (DQO) dentro del reactor (Figura 3) se redujo; en la primera secuencia (días 0 a 10) en un 86%; segunda secuencia (días 11 a 17), 67%; tercera secuencia (días 18-43), 87%; y en la cuarta secuencia (días 44-55), 21%. La Figura 3 muestra la reducción de la carga contaminante (demanda química de oxígeno) en el reactor de secuencia de lotes durante 55 días de la operación. Las barras de error representan la desviación estándar de la media ($n = 3$).

- 25 El recuento total y de unidades formadoras de colonias ml^{-1} (Figura 4) correlacionó significativamente ($P < 0,05$) con la DQO, mostrando una relación lineal inversa, lo que sugiere que la abundancia bacteriana aumentó en respuesta a la disminución de la carga contaminante. La Figura 4 muestra el recuento total de células (línea negra) y unidades formadoras de colonias ml^{-1} (línea discontinua) en el reactor en secuencia de lotes durante 55 días de operación. Las barras de error representan la desviación estándar de la media ($n = 3$).

- 30 El estudio de huellas digitales genotípicas de la comunidad por DGGE con análisis de algoritmo de agrupamiento de perfiles de las muestras durante los 55 días de operación del biorreactor, reveló que los perfiles eran muy similares ($> 85\%$ de similitud). Aunque el consorcio podría sobrevivir durante el funcionamiento a largo plazo se observó una pérdida en la capacidad de degradación que se reflejó tanto en la disminución de la reducción de DQO con el tiempo (Figura 3) como en la disminución de la capacidad de cultivo celular (Figura 5). La Figura 5 muestra el porcentaje de la capacidad de cultivo de la célula bacteriana dentro del reactor en secuencia de lote durante los 55 días de operación.

- 35 La capacidad de cultivo de las células en el día 0 fue de aproximadamente 77% llegando a 85% en el día 10 (al final de la primera secuencia de lotes). A partir de aquí el porcentaje total de capacidad de cultivo declinó a 4% en el día 55. Por lo tanto, el consorcio bacteriano podría sobrevivir a largo plazo, pero perdió su capacidad de degradación bajo condiciones de suspensión. Sin estar atado por la teoría, esto puede haber sido debido a la afluencia súbita de influjo fresco al principio de cada secuencia de lotes. En suspensión, las células eran vulnerables a cualquier perturbación, tales como puntas en la carga de contaminación. Sin embargo, las comunidades en biopelícula han sido bien documentadas como de ser capaces de resistir las perturbaciones en condiciones tales como la variación de la temperatura, el pH o la carga de contaminación [16]. El siguiente paso fue determinar si el consorcio bacteriano en un reactor de filtro percolador de película fija (biopelícula) en secuencia de lote podría reducir la carga de contaminación consistentemente durante el funcionamiento a largo plazo cuando se expone a tres tipos diferentes de aguas residuales de MWF.

- 45 2c) Estudios de película fija en secuencia de lote con operación a largo plazo utilizando diferentes aguas residuales de MWF.

- 50 Se realizaron estudios de tratamiento de aguas residuales de MWF en un biorreactor de 5 l en secuencia de lotes (aproximadamente 14 días de duración por cada secuencia de lote) relleno con una matriz de soporte de plástico corrugado (longitud de 2,5 cm, 1,5 cm de diámetro; WEBS Ltd, Reino Unido). Al comienzo de cada fase operativa, 4,5 l de efluente tratado se bombeó fuera del biorreactor y se rellenó con un volumen igual de influente fresco de aguas residuales de MWF. El agua residual, contenida dentro del biorreactor, se cicló a través del sistema mediante una bomba peristáltica Watson Marlow 313S (Watson Marlow, Reino Unido), por medio de un distribuidor de pulverización a una tasa de $0,25 \text{ l min}^{-1}$. El flujo de aire dentro del biorreactor se mantuvo a $3,3 \text{ l min}^{-1}$, utilizando bombas de aire de acuario y rociadores de aire (Fisher Scientific, Reino Unido). La temperatura del biorreactor se

mantuvo a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, usando camisas de agua calentada. Las cepas del consorcio se inocularon como se describió anteriormente.

La reducción de la carga de contaminación se midió por la demanda química de oxígeno (DQO) con un valor inicial de DQO del influente, al comienzo de cada fase operativa, de aproximadamente 6.000 mg l^{-1} . La concentración de DQO se fijó a 6.000 mg l^{-1} , puesto que es más representativa de las concentraciones de carga de contaminación de las aguas residuales de MWF generadas por las plantas de fabricación de automóviles. Se emplearon tres aguas residuales de MWF en este estudio;

1) Hysol X como se describió anteriormente, se utilizó en secuencias de lotes 1 a 5 de este estudio.

2) Aguas residuales producidas en una planta de fabricación de repuestos de motor (Bridgend, Gales) utilizado en secuencias de lotes 6 a 10.

3) Aguas residuales Mobil MWF utilizadas en secuencias de lotes 11 a 15.

Durante las primeras cinco secuencias de lotes (días 0 a 79) la carga contaminante se redujo consistentemente en un $85\% \pm 2\%$ (Figura 6A). La carga contaminante de las aguas residuales Ford MWF se redujo en las secuencias de lotes de 6 a 10 (días 80 a 149) por $87,8\% \pm 1,8\%$. En las secuencias de lotes 11 a 15 (días 150-219) la DQO de las aguas residuales Mobil MWF se redujo en un $96,4\% \pm 1,3\%$. Los límites actuales aceptables de DQO para aguas residuales de descarga de MWF, establecidos por las autoridades del agua del Reino Unido, son de aproximadamente 2.000 mg l^{-1} . A este nivel pudieron llegar fácilmente todas las aguas residuales, y las aguas residuales de MWF de Hysol, Ford y Mobil tratadas desde el biorreactor tuvieron cargas de DQO finales de $906 \pm 102,4\text{ mg l}^{-1}$, $754 \pm 97,2\text{ mg l}^{-1}$, y $232,9 \pm 68,8\text{ mg l}^{-1}$, respectivamente (Figura 6). A medida que la DQO disminuyó, también cayó el pH dentro de cada fase de $9,0$ a $7,4$ para las fases de aguas residuales de MWF de Hysol; $9,5$ a $8,0$ para aguas residuales de Ford; y $9,5$ a $7,7$ para aguas residuales de Mobil. La Figura 6B muestra la reducción de la toxicidad con la reducción de la DQO. Se derivó un índice de toxicidad como el recíproco de la producción de luminiscencia del biosensor expresado como un % de la luminiscencia de control del H_2O (es decir, el índice de la toxicidad del control H_2O es de $1/100\% = 0,01$).

La Figura 6 muestra la reducción de la demanda química de oxígeno a lo largo del tiempo dentro del biorreactor de película fija de secuencia de lotes. Las barras de error representan la desviación estándar de la media ($n = 3$). Se utilizaron tres recorridos de fluido separados, y 6A indica la fase 1 a 5, 6B 6 a 10, y 6C 11 a 15.

La legislación relativa a la descarga de aguas residuales puede también ser apretada aún más al incluir la determinación de la toxicidad de los efluentes. En consecuencia, se probó la toxicidad de las aguas residuales que se estaban tratando en el biorreactor, utilizando un biosensor disponible comercialmente, *Vibrio fischeri* y los análisis se realizaron según las instrucciones del fabricante. Cuando se las comparó, la relación entre la demanda química de oxígeno y la producción de luminiscencia del biosensor (% de control de H_2O) exhibió una relación inversa lineal significativa ($P < 0,05$) (Figura 7), lo que sugiere que a medida que la carga de contaminación se reducía en el sistema de biorreactor, la toxicidad del efluente también disminuía. La Figura 7 muestra la relación entre la carga de contaminación (DQO) y la toxicidad del efluente expresada como la producción de luminiscencia del biosensor. La relación que se presenta es significativa a $P < 0,05$. $r =$ coeficiente de correlación.

Se utilizaron los perfiles genotípicos y posterior análisis de algoritmo de agrupamiento para monitorizar el destino del consorcio bacteriano dentro de tanto el hábitat de suspensión como el de biopelícula de los biorreactores en toda la operación de secuencia de lotes de aguas residuales de Hysol, Ford y Mobil (Figura 8). El consorcio bacteriano no sólo sobrevivió sino que fue también dominante en los hábitats de biopelícula y suspensión durante todo el estudio de 219 días, como reveló el análisis de algoritmo de agrupamiento de los perfiles DGGE de las muestras (incluyendo los perfiles de los marcadores del consorcio bacteriano) $> 90\%$ de similitud, independientemente del tipo de aguas

residuales. Variación ($\leq 10\%$) en el agrupamiento podría ser debido a la colonización de cepas bacterianas distintas

de las cepas del consorcio en el sistema de biorreactor abierto. Sin embargo, era evidente, a juzgar por los análisis de los grupos, que estas cepas no se convirtieron en poblaciones establecidas dentro de los hábitats de biopelícula o suspensión a lo largo de todo el estudio. La Figura 8 muestra el análisis de algoritmo de agrupamiento de UPGMA de los perfiles DGGE de las muestras de biopelícula y de suspensión para las fases de secuencia de lotes de aguas residuales de a) Hysol, b) Ford y c) Mobil. Las barras de la escala representan la distancia media entre las muestras en cada dendrograma. Las muestras están marcadas de la siguiente manera: origen de la muestra (BF-Biopelícula o Sus-Suspensión); día muestreado; fase de secuencia de lote entre paréntesis. Se usó una muestra compuesta de las cinco cepas bacterianas del consorcio (Bac CON) como un perfil marcador para cada dendrograma.

3. Tratamiento de MWF completo a base de aceite.

Como se detalló anteriormente, residuos de MWF a base de aceite son típicamente divididos en dos fracciones por métodos de tratamiento físico-químico tales como la ultrafiltración (UF). Anteriormente, la fracción a base de aceite de peso molecular alto se enviaba al vertedero, dejando la fase acuosa como un problema de aguas residuales persistente. El endurecimiento adicional de la legislación de la UE y, en particular, la directiva de residuos de vertedero [17] significa que los fangos de hidrocarburos de la etapa UF ahora se clasifican como residuos peligrosos en el Reino Unido y no pueden ser enviados a los vertederos. Independientemente de la legislación, es deseable no tener que enviar grandes cantidades de residuos a los vertederos si es posible disponer de los residuos de otro modo. Por lo tanto, el siguiente paso fue determinar si los MWF completos a base de aceite pueden ser tratados por el consorcio bacteriano construido para degradar las aguas residuales de MWF acuosas.

Usando condiciones de inoculación similares a las que se describieron anteriormente, se ensayó la capacidad del consorcio bacteriano para degradar los MWF a base de aceite con alto nivel de DQO (Shell Dromus® B) en condiciones de reactor por lotes en suspensión en 3 biorreactores replicados (Figura 9a). Con un DQO inicial de aproximadamente 62.000 mg l^{-1} la carga contaminante se redujo en un 80,3%. El efluente de MWF tratado (con una DQO de aproximadamente 12.000 mg l^{-1}) se utilizó a continuación para un segundo estudio de suspensión por lote (Figura 9b). En los tres reactores replicados la DQO del efluente se redujo en un 80,1% a una carga contaminante final circa 2.363 mg l^{-1} . El control (sin inóculo añadido a los MWF) se mantuvo constante a lo largo de las series de los biorreactores (Figuras 9a y 9b). La Figura 9 muestra la reducción de la carga de contaminación en los biorreactores de suspensión por lotes a partir de concentraciones de DQO (A) altas y (B) medias. La línea negra es la reducción media de DQO de los biorreactores inoculados con el consorcio bacteriano. Las líneas discontinuas muestran los niveles de DQO en los biorreactores control (abióticos). Las barras de error representan la desviación estándar de la media ($n = 3$).

En un experimento adicional, se redujo la DQO desde casi 95.000 a por debajo de 2.000 en 8 días. El líquido fue semi-sintético fresco (peor de los casos) diluido a un nivel inicial de DQO de 95.000, que es en exceso de la DQO promedio del fluido bruto de desecho del trabajo de metales ($\sim 50.000 - 60.000$).

Día	0	2	5	7	8
DQO	94.800	7.512,667	3.246,667	2.985,333	1.834
Desviación estándar	2.107,131	96,7178	74,144	56,4	85

Se inició un estudio a largo plazo, para determinar la eficacia del consorcio bacteriano en el tratamiento de residuos de MWF a base de aceite (Shell Dromus® B) a diferentes niveles iniciales de DQO, usando un biorreactor en secuencia de lotes con película fija (como se describe en 3c anteriormente). El MWF inicialmente se empezó para 5 secuencias de lotes a una carga de contaminación inicial de aproximadamente 6.000 mg l^{-1} y la DQO se redujo a $567 \pm 103 \text{ mg l}^{-1}$ a través de las 5 fases operativas (días 0 a 77) (Figura 10A). La Figura 10B también muestra el cambio en el pH. La Figura 10 muestra la reducción de la demanda química de oxígeno del MWF a base de aceite con el tiempo dentro de un biorreactor en secuencia de lotes con película fija a diferentes cargas de contaminación. Las barras de error representan la desviación estándar de la media ($n = 3$).

Durante las siguientes cinco fases operativas la DQO inicial se elevó a aproximadamente 10.500 mg l^{-1} y se observaron reducciones de $96 \pm 0,2\%$ con excelentes concentraciones finales de DQO de $431 \pm 17 \text{ mg l}^{-1}$ en las cinco fases (días 77 a 152).

Después de esto el reactor se sometió a concentraciones iniciales de contraste de DQO para determinar la capacidad del consorcio bacteriano para manejar cargas de contaminación fluctuantes (no uniformes). La primera fase operativa (días 152 a 167) tuvo una DQO inicial de 20.500 mg l^{-1} y se redujo en un 96,5%, hasta 727 mg l^{-1} . La segunda fase tuvo una carga mucho mayor de DQO de 40.000 mg l^{-1} y se redujo a 446 mg l^{-1} (reducción del 98,5%) después de 34 días (días 167 a 200). La tercera fase (días 200 a 225) tuvo una carga de contaminación insignificante de aproximadamente 500 mg l^{-1} de DQO que se redujo en más del 54% a una concentración final de 206 mg l^{-1} . La cuarta y última fase operativa del estudio del biorreactor a largo plazo (días 225 a 240) empezó con una carga inicial de DQO de 21.000 mg l^{-1} y se redujo en un 98,2% a una carga contaminante final de 373 mg l^{-1} de DQO.

La observación más sorprendente fue que el consorcio bacteriano, desarrollado para degradar aguas residuales de MWF de fase acuosa, pudiera degradar consistentemente fluidos completos a base de aceite con diferentes cargas de DQO hasta bien dentro del límite de descarga de DQO del Reino Unido de 2.000 mg l^{-1} .

4. Shell Dromus basado en aceite

Implementación de los consorcios bacterianos

Se realizaron estudios de biodegradación de MWF a granel en biorreactores sellados de columna de burbuja (5 l de volumen total) rellenos de una matriz de soporte de plástico (que consistía en plástico hueco corrugado de 2,5 m de largo x 1 cm de diámetro).

5 Cada reactor se mantuvo durante un período de 4 semanas antes de la experimentación, durante el cual se permitió que una biopelícula del consorcio bacteriano se estableciera en el biomedio, logrando un contenido bacteriano estable de alrededor de 10% del biorreactor en volumen. Esto se logró mezclando inicialmente el consorcio bacteriano cultivado por separado con fluidos de desecho diluidos (DQO baja), permitiendo que la DQO de los residuos se redujera hasta alrededor de 1.000 mg/l, sacando un tercio de los residuos y añadiendo más fluido en una serie de ciclos a lo largo de las cuatro semanas.

10 Para cada tratamiento, se establecieron biorreactores replicados con un cuarto reactor utilizado como control abiótico. Todos los biorreactores se operaron bajo condiciones de suspensión en proceso de lotes utilizando volúmenes de trabajo de residuos de MWF de 4,5 l. Los residuos de MWF se añadieron al biorreactor manualmente, mediante el vertido dentro, y se vaciaron mediante la apertura de un grifo en la parte inferior del reactor. El flujo de aire dentro de los biorreactores se mantuvo a $3,3 \text{ l min}^{-1}$, utilizando bombas de aire de acuario y rociadores de aire (Fisher Scientific, Reino Unido). La temperatura del reactor se mantuvo a $28^\circ \text{ C} \pm 1^\circ \text{ C}$, usando chaquetas climatizadas de agua.

15 Los biorreactores se inocularon de la siguiente manera. Las cinco cepas se inocularon por separado en frascos cónicos de 250 ml que contenían 100 ml de caldo de soja triptico (10% v/v. Difco, Reino Unido) y aguas residuales de MWF (3 % v/v) pre-filtradas (utilizando un filtro de tamaño de poro de $0,2 \mu\text{m}$, Millipore, Reino Unido). Los cultivos individuales se incubaron a 28° C en un agitador orbital durante 12 horas (recuento de células aproximadamente 10^7 células ml^{-1}). Las suspensiones celulares se mezclaron conjuntamente y se añadieron como un inóculo al 10% v/v (en TSB) a los biorreactores. Las biopelículas bacterianas se desarrollan de forma natural en la matriz de soporte por crecimiento espontáneo sobre la misma, a condición de que los soportes se mantengan húmedos y preferiblemente sumergidos.

25 5. Estudio de degradación del producto semi-sintético

Anteriormente la capacidad de biodegradación del consorcio bacteriano (CB) había sido probada frente a fluidos de trabajo de metales ultra-filtrados (UF), sintéticos, y de emulsión a base de aceite (FTM). Como una extensión de la investigación previa el CB se probó frente a MWF completo semi-sintético. Esto permite la determinación de si el CB es eficaz en el tratamiento de todos los tipos de MWF y si puede tratar MWF de alta carga de contaminación, según lo determinado por la demanda química de oxígeno (DQO). Los estudios de MWF semi-sintéticos se realizaron en biorreactores de 5 litros de secuencia de lotes como se describió anteriormente.

35 El producto semi-sintético usado fue Hysol X® (Castrol) y fue el fluido completo (no la variante ultrafiltrada (UF)). El fluido sintético fue Meqqem-cob® (Castrol). La DQO de partida se ajustó mediante la alteración del porcentaje de concentración inicial del producto concentrado al comienzo de cada fase del proceso por secuencia de lotes, y se aumentó con el fin de establecer la DQO de MWF más alta que el consorcio bacteriano podría tratar. Se preparó una DQO de 50.000 mg l^{-1} para el semi-sintético fresco que se componía de concentrado de MWF semi-sintético en agua al 6%, y que se correspondía con el extremo inferior de las recomendaciones de uso del fabricante. Una DQO de $107.000 \text{ mg l}^{-1}$ era concentrado de MWF semi-sintético en agua a aproximadamente el 12%. De 6% a 12% de concentrado de MWF en agua son los límites de guía del fabricante para hacer un MWF operativo para ese producto (Hysol X® MWF semi-sintético).

40 Desde una DQO inicial de 50.233 mg l^{-1} , la carga de contaminación se redujo en $64,9\% \pm 1,2\%$ dentro de la primera fase por lotes (días 0 a 7) (Figura 11). Para la segunda fase (días 7 a 14) la DQO inicial fue 51.733 mg l^{-1} y la carga de contaminación se redujo en un $80,1\% \pm 0,9\%$. La DQO inicial de la tercera fase (días 14 a 21) fue de 84.067 mg l^{-1} con una reducción del $95,1\% \pm 0,1\%$. Para las fases de carga cuarta (días 21-28) y quinta (días 28 a 36) la DQO inicial fue de 94.800 y $107.933 \text{ mg l}^{-1}$, respectivamente. La reducción final de DQO para la fase 4 y 5 fue de $98,1\% \pm 0,1\%$ y $99,0\% \pm 0,01\%$, respectivamente.

45 La Figura 11 muestra la reducción de la demanda química de oxígeno a través del tiempo dentro del biorreactor de película fija de secuencia de lotes. Las barras de error representan la desviación estándar de la media ($n = 3$).

50 Este estudio demuestra que el consorcio bacteriano puede degradar todos los tipos de MWF. Además, muestra que el consorcio bacteriano puede degradar MWF de demanda química de oxígeno alta, más de 50.000 mg l^{-1} .

6. Deconstrucción del consorcio bacteriano

El objetivo de este estudio fue determinar si las cinco cepas del consorcio bacteriano son esenciales para su capacidad general de biodegradación. Esto se logró probando la capacidad de biodegradación del consorcio bacteriano frente a un MWF sintético y un MWF semi-sintético bajo condiciones de suspensión por lotes. Usando un

diseño factorial, las cepas bacterianas se retiraron posteriormente hasta que el rendimiento de la degradación fue significativamente peor que con todo el consorcio bacteriano.

La Figura 12 muestra el rendimiento del consorcio bacteriano, con y sin eliminación de cepas individuales, para degradar (A) MWF sintético y (B) MWF semi-sintético. Los círculos rellenos representan el consorcio bacteriano (CB); círculos en blanco son CB sin *Comamonas testosteroni*; los triángulos rellenos son CB sin *Agrobacterium radiobacter*; los triángulos en blanco son *Methylobacterium mesophilicum*; los cuadrados en blanco son *Microbacterium saperdae*; los cuadrados rellenos son *Microbacterium esteraromaticum*. Las barras de error representan la desviación estándar de la media ($n = 3$).

La eliminación de cualquiera de las cepas bacterianas del consorcio reduce el rendimiento biodegradativo (Figuras 12A y B). Además, la reducción de DQO después de la eliminación de cualquier cepa de consorcio bacteriano dado se ve afectada negativamente, pero todavía está presente.

En este y en el siguiente ejemplo, el CB y los CBs construidos y seleccionados al azar se probaron frente a un MWF sintético (Meqgem-cob® [Castrol]) y un MWF semi-sintético (Hysol X® [Castrol]). Cada condición fue replicada ($n = 3$). Los experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones de suspensión por lotes con una concentración de inóculo inicial de 10% en volumen por volumen (v/v). Otras condiciones son como se describen en los Ejemplos anteriores.

7. Efecto de la variación de la cepa

El objetivo de este estudio fue determinar si el éxito del consorcio bacteriano es específico de la cepa de las especies constituyentes o si consorcios construidos al azar de la misma especie pero diferente cepa pueden funcionar tan bien o mejor. Se realizaron ensayos de biodegradación utilizando MWFs tanto sintéticos como semi-sintéticos en condiciones de suspensión por lotes. El consorcio bacteriano se ensayó frente a tres consorcios bacterianos construidos al azar (Tabla 1).

Tabla 1 Cepas para el consorcio bacteriano (CB) y los tres consorcios construidos al azar (CBa aleatorio, CBb aleatorio y CBc aleatorio).

Especie	Consortio bacteriano	CBa aleatorio	CBb aleatorio	CBc aleatorio
<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	15-BTZ-N	15-TEA-K	15-CA-G	20-BA-B
<i>Microbacterium saperdae</i>	1-TEA-C	1-MEA-N	1-TEA-J	1-CA-F
<i>Comamonas testosteroni</i>	1-BTZ-O	1-CA-C	20-MEA-J	15-MEA-C
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	20-BTZ-N	20-BTZ-A	5-BTZ-A	1-CA-A
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	5-BA-A	5-BA-I	20-BA-G	1-BTZ-A

Los resultados se muestran en la Figura 13, que muestra el rendimiento del consorcio bacteriano CB (círculos rellenos), en comparación con los tres consorcios construidos al azar: rCBa (triángulos en blanco), rCBb (triángulos rellenos), rCBc (círculos en blanco), cuando se probaron frente a MWF (A) sintético y (B) semi-sintético. Las barras de error representan la desviación estándar de la media ($n = 3$).

La reducción de DQO por el consorcio bacteriano para MWF sintético y semisintético fue $95,9 \pm 0,3\%$ y $97,6 \pm 0,2\%$, respectivamente. Para rCBa, $70,7 \pm 2,7\%$ y $38,3 \pm 0,5\%$; rCBb $44,1 \pm 2,0\%$ y $66,2 \pm 0,9\%$; y rCBc $39,7 \pm 2,1\%$ y $34,8 \pm 1,8\%$. La reducción de DQO por el consorcio bacteriano fue significativamente más alta que la de los consorcios bacterianos construidos al azar (ANOVA $P < 0,0001$ en todos los casos).

Esto muestra que la variación de todas las cepas, mientras que reduce la eficacia, conserva la habilidad de degradar el MWF.

Bibliografía

1. Bio-Wise, *A guide to biological treatment for metalworking fluids disposal*. 2000, Departamento de Comercio e Industria.
2. Enviro-Wise, *Optimising the use of metalworking fluids*. 1999, Departamento de Comercio e Industria.
3. *Effluent limitations guidelines, pretreatment standards, and new source performance standards: Metal products and machinery*; Propuesta de norma, en 40 CFR Partes 433, 438 y 464. 1995, del Registro Federal.

4. *Effluent limitations guidelines, pretreatment standards, and new source performance standards for the metal products and machinery point source category*: Propuesta de norma, en 40 CFR Partes 413, 433, 438, 463, 464, 467 y 471. 2001, del Registro Federal.
5. Comisión Europea, la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, del 23 de octubre de 2000 se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. Official Diary of the European Communities no. L 327 de 22 de diciembre de 2000. 2000: Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas, L-2985 Luxemburgo.
6. Comisión Europea, la Directiva 2000/76/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 4 de diciembre de 2000 relativa a la incineración de residuos. Official Diary of the European Communities, L 332 de 28 de diciembre de 2000. 2000: Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas, L-2985 Luxemburgo.
7. Wagner Döbler, I., *Microbial inoculants: Snake oil or Panacea?*, in *Bioremediation: A critical review*, IM Head, I. Singleton, y MG Milner, editores. 2003, Horizon Scientific Press, Wymondham, Norfolk. páginas 259-289.
8. Beaulieu, M., et al., *Evolution of bacterial diversity during enrichment of PCP-degrading activated soils*. Microbial Ecol, 2000, 40: 345-355.
9. Elvang, AM, et al., *Use of green fluorescent protein and luciferase biomarkers to monitor survival and activity of Arthrobacter chlorophenolicus A6 cells during degradation of 4-chlorophenol in soil*. Environ Microbiol, 2001 3: 32-42.
10. Stucki, G. y M. Thüer, *Experiences of a large-scale application of 1,2-dichloroethane degrading micro-organisms for groundwater treatment*. Environ Sci Technol, 1995. 29: 2339-2345.
11. Wagner Döbler, I., et al., *Removal of mercury from chemical wastewater by micro-organisms in technical scale*. Environ Sci Technol, 2000 2: 4.628 a 4634.
12. van der Gast, CJ, et al., *Bioaugmentation strategies for remediating mixed chemical effluents*. Biotechnol Prog, 2003 19: 1156-1161.
13. Graham, DW y TP Curtis, *Ecological theory and bioremediation*, en *Bioremediation: A critical review*, IM Head, I. Singleton, y MG Milner, editores. 2003, Horizon Scientific Press: Wymondham, Norfolk. p. 61-92.
14. van der Gast, CJ, et al., *Selection of microbial consortia for treating metal working fluids*. J Ind Microbiol Biotechnol., 2002 29: 20-27.
15. van der Gast, CJ, et al., *Bacterial community structure and function in a metal-working fluid*. Environ Microbiol, 2003 5: 453-461.
16. Davies, D., *Understanding biofilm resistance to antimicrobial agents*. Nat Rev Drug Discov, 2003 2: 114-122.
- 17.-Comisión Europea, la Directiva 1999/31/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 26 de abril 1999, relativa al vertido de residuos. Official Diary of the European Communities no. L 182 de 16 de Julio de 1999 1999: Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas, L-2985 Luxemburgo.

REIVINDICACIONES

1. Un método para reducir la demanda química de oxígeno de fluidos de trabajo de metales de desecho, que comprende poner en contacto el fluido de trabajo de metales con una biopelícula, en donde la biopelícula tiene al menos cuatro miembros seleccionados de al menos uno de cada uno de *Agrobacterium spp.*, *Comamonas spp.*, *Methylobacterium spp.*, y *Microbacterium spp.*, como se identifica por análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) dependiente del cultivo, dicha biopelícula es capaz de crecer en fluidos de trabajo de metales semi-sintéticos no tratados, que tienen una demanda química de oxígeno de entre 50.000 y 100.000 mg l⁻¹.
2. Un método según la reivindicación 1, en donde el fluido de trabajo de metales de desecho está sin procesar antes del contacto con dicha biopelícula.
3. Un método según la reivindicación 1 o 2, en donde la biopelícula es capaz de reducir la demanda química de oxígeno de 50.000 mg l⁻¹ o superior en dicho fluido de trabajo de metales de desecho a 2.000 mg l⁻¹ o inferior en 7 días o menos.
4. Un método según la reivindicación 3, en donde la biopelícula es capaz de reducir una demanda química de oxígeno de 50.000 mg l⁻¹ o superior en dicho fluido de trabajo de metales de desecho a 2.000 mg l⁻¹ o inferior en 2 días o menos.
5. Un método según cualquier reivindicación precedente, en donde la biopelícula es autosuficiente en presencia de dicho fluido de trabajo de metales de desecho.
6. Un método según cualquier reivindicación precedente, en donde el número de bacterias en la biopelícula es de cinco.
7. Un método según cualquier reivindicación precedente, en donde la biopelícula tiene *Agrobacterium radiobacter*, *Comamonas testosteroni*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Microbacterium esteraromaticum* y *Microbacterium saperdae*, o mezclas de los mismos, como se identifica por análisis FAME dependiente del cultivo, como miembros.
8. Un método según cualquier reivindicación precedente, en donde la biopelícula tiene *Agrobacterium radiobacter* NCIMB 41462 (5-BA-A), *Comamonas testosteroni* NCIMB 41463 (1-BTZ-0), *Methylobacterium mesophilicum* NCIMB 41464 (20-BTZ-N), *Microbacterium esteraromaticum* NCIMB 41465 (15-BTZ-N) y *Microbacterium saperdae* NCIMB 41466 (1-TEA-C), como se identifica por análisis FAME dependiente del cultivo, como a sus miembros.
9. Un método según cualquier reivindicación precedente, operado a temperaturas de entre 10 y 30° C.
10. Un método según cualquier reivindicación precedente, en donde el fluido de trabajo de metales a ser tratado tiene una demanda química de oxígeno fluctuante.
11. Un biorreactor adecuado para reducir la demanda química de oxígeno de fluidos de trabajo de metales de desecho, el biorreactor comprende una biopelícula que tiene al menos cuatro miembros que se seleccionan de al menos uno de cada uno de *Agrobacterium spp.*, *Comamonas spp.*, *Methylobacterium spp.*, y *Microbacterium spp.*, como se identifica por análisis de FAME dependiente del cultivo, dicha biopelícula es capaz de crecer en los fluidos semi-sintéticos de trabajo de metales no tratados.
12. Un biorreactor según la reivindicación 11, para el tratamiento de fluidos de trabajo de metales de desecho no procesados.
13. Un biorreactor según la reivindicación 11 o 12, en donde la biopelícula es autosuficiente en presencia de dicho fluido de trabajo de metales de desecho.
14. Un biorreactor según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que comprende un depósito para almacenar el fluido de trabajo de metales en contacto con dicha biopelícula.
15. Un biorreactor según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, adaptado para un rendimiento continuo de fluido de trabajo de metales de desecho.
16. Un biorreactor según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en donde el número de bacterias en la biopelícula es de cinco.
17. Un biorreactor según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, en donde la biopelícula tiene *Agrobacterium radiobacter*, *Comamonas testosteroni*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Microbacterium*

esteraromaticum y *Microbacterium saperdae*, o mezclas de los mismos, como se identifica por análisis de FAME dependiente del cultivo, como miembros.

18. Un biorreactor según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, en donde la biopelícula tiene *Agrobacterium radiobacter* NCIMB 41462 (5-BA-A), *Comamonas testosteroni* NCIMB 41463 (1-BTZ-0), *Methylobacterium mesophilicum* NCIMB 41464 (20 - BTZ - N), *Microbacterium esteraromaticum* NCIMB 41465 (15-BTZ-N)) y *Microbacterium saperdae* NCIMB 41466 (1-TEA-C), como se identifica por análisis de FAME dependiente del cultivo, como miembros
19. El uso de un biorreactor según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, en la reducción de la demanda química de oxígeno del fluido de trabajo de metales de desecho.
20. Un método para reducir la demanda química de oxígeno de los residuos de fluidos de trabajo de metales sin tratar, que comprende poner en contacto el fluido de trabajo de metales con un biorreactor según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18.
21. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 20, en donde dicho fluido de trabajo de metales de desecho es un fluido de trabajo de metales sintético.
22. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 20, en donde dicho fluido de trabajo de metales de desecho es un fluido de trabajo de metales semi-sintético.
23. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 20, en donde dicho fluido de trabajo de metales de desecho es un fluido de trabajo de metales a base de aceite.

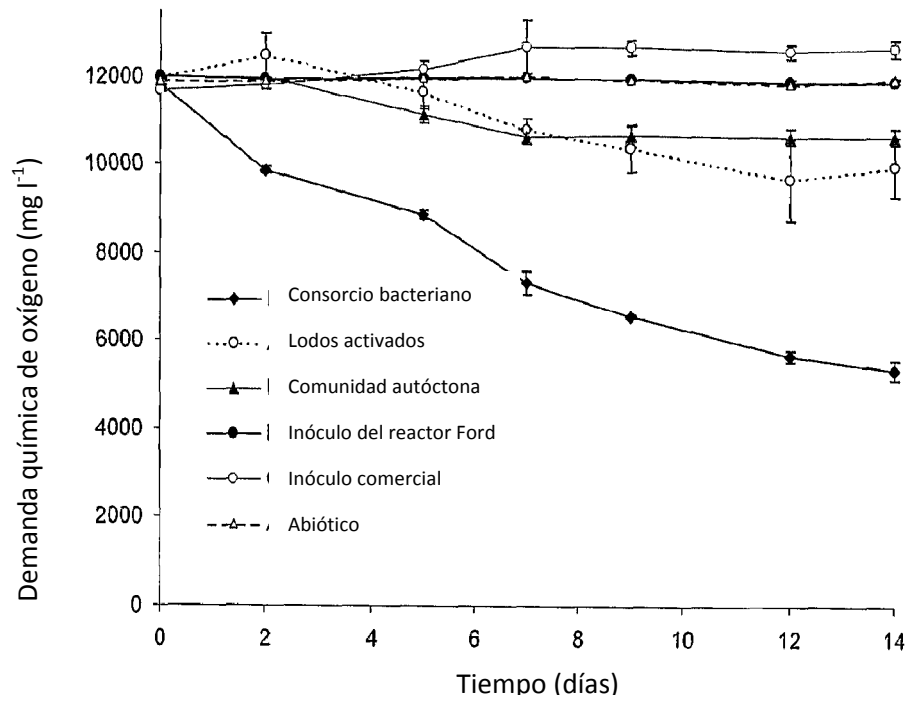


Fig. 1

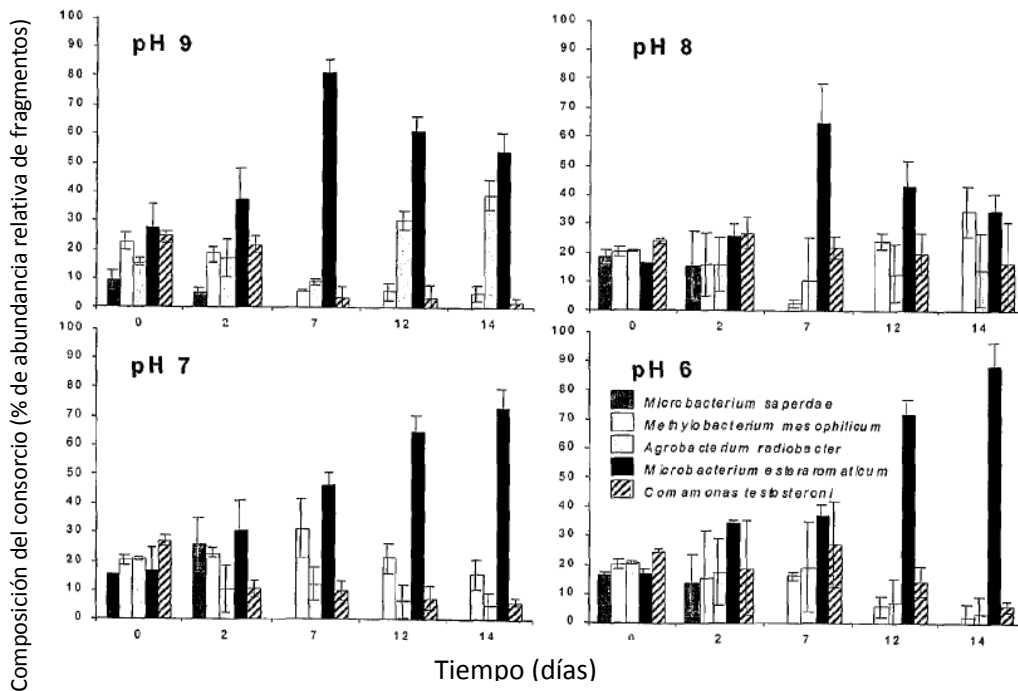


Fig.2

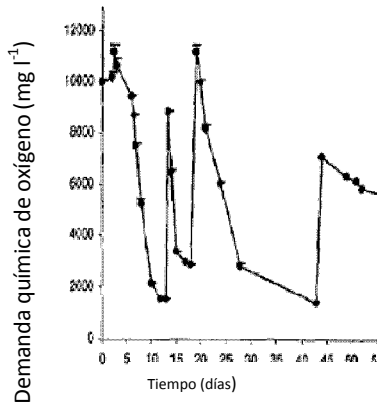


Figura 3

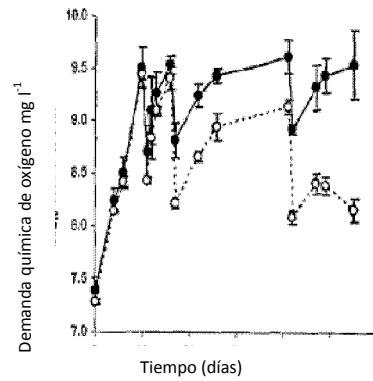


Figura 4

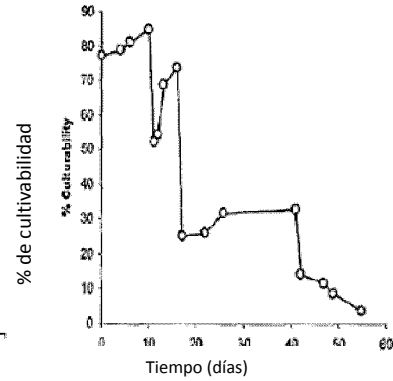


Figura 5

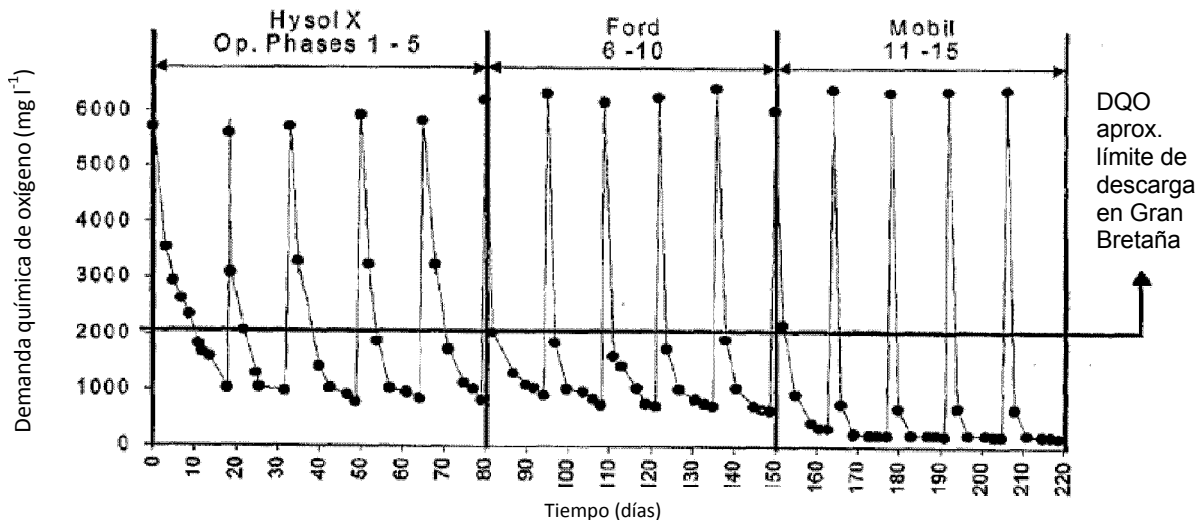


Fig.6

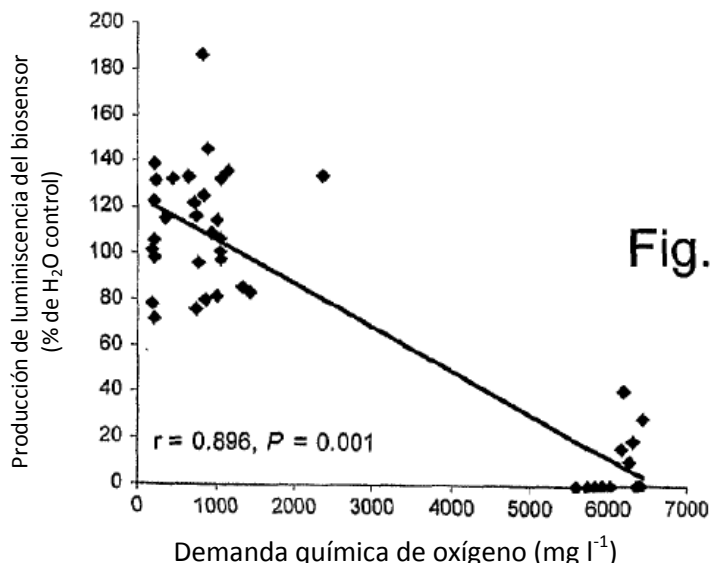


Fig.7

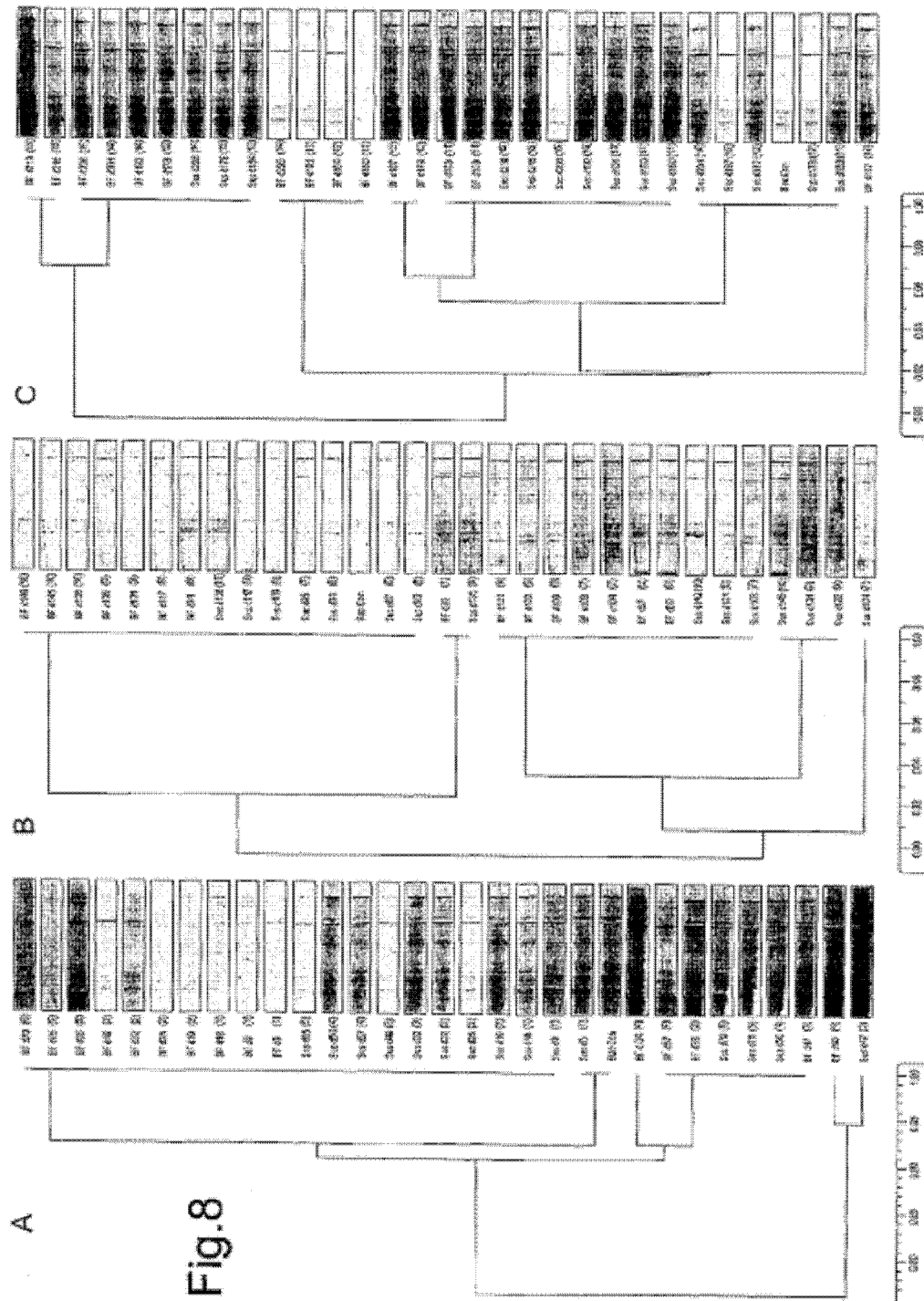


Fig.8

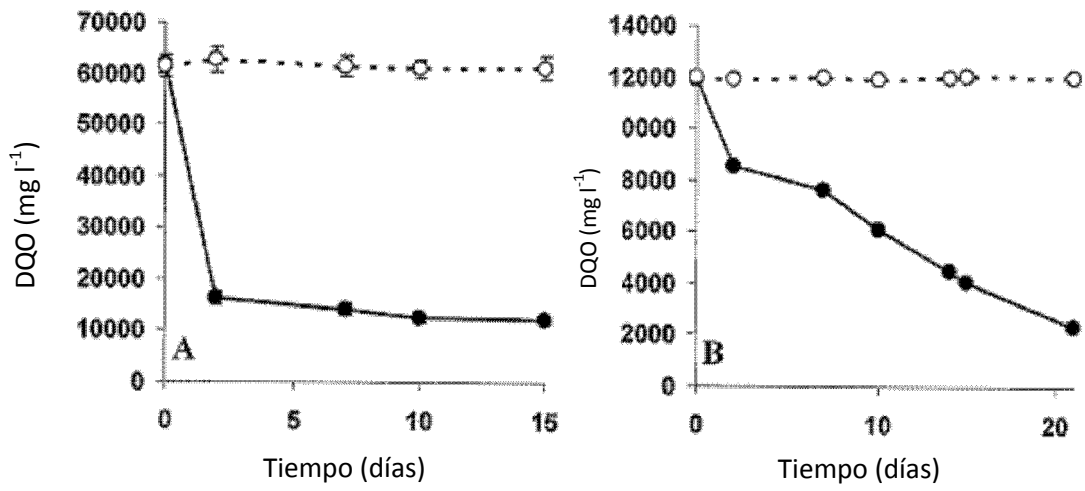


Fig.9

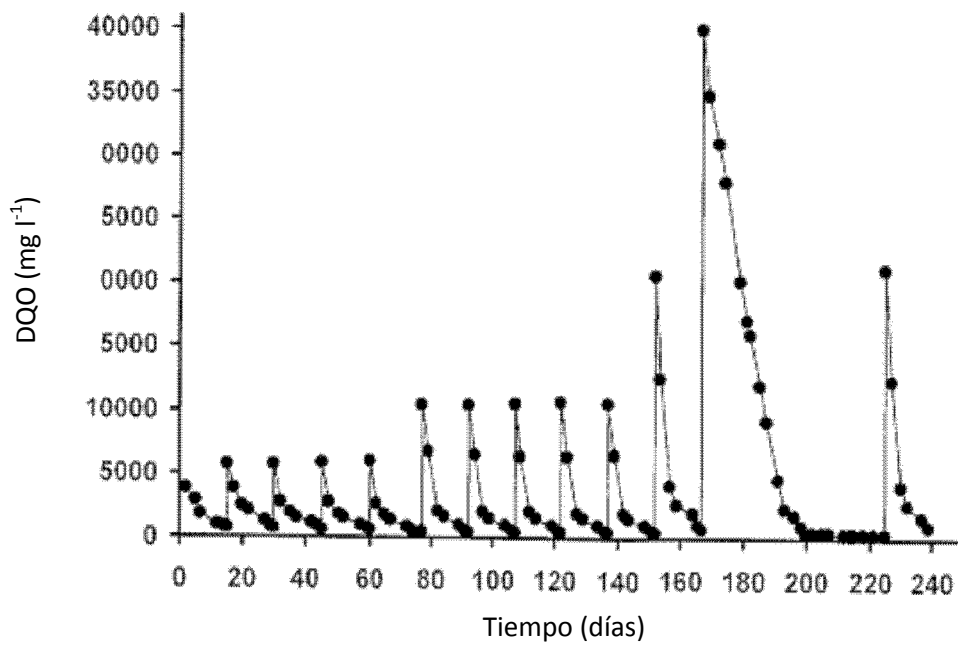


Fig.10

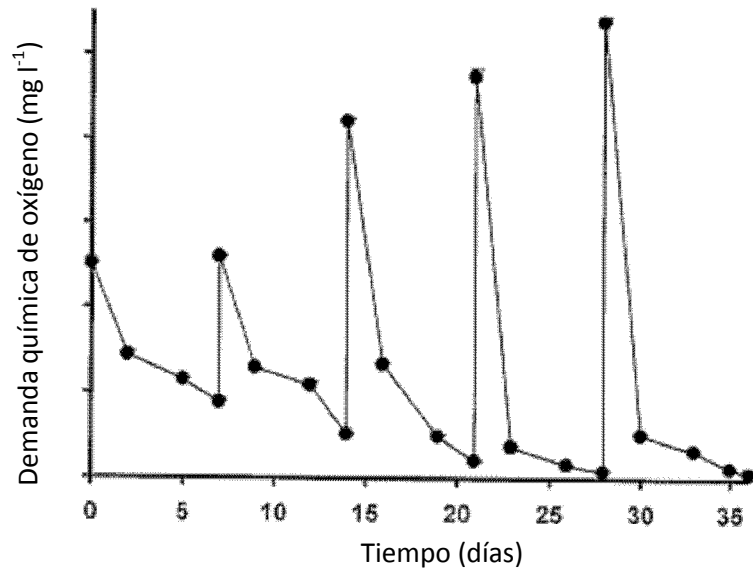


Fig.11

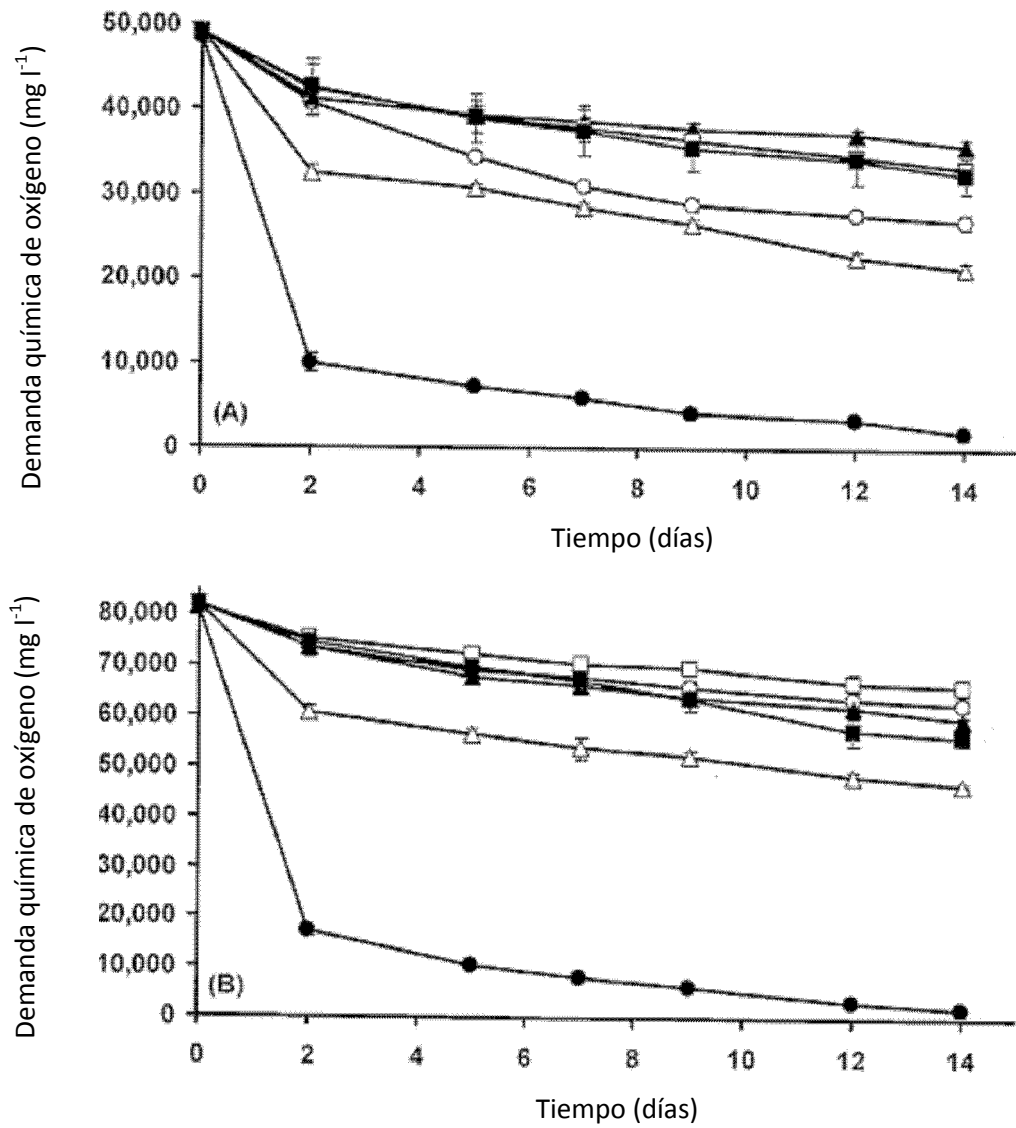


Fig.12

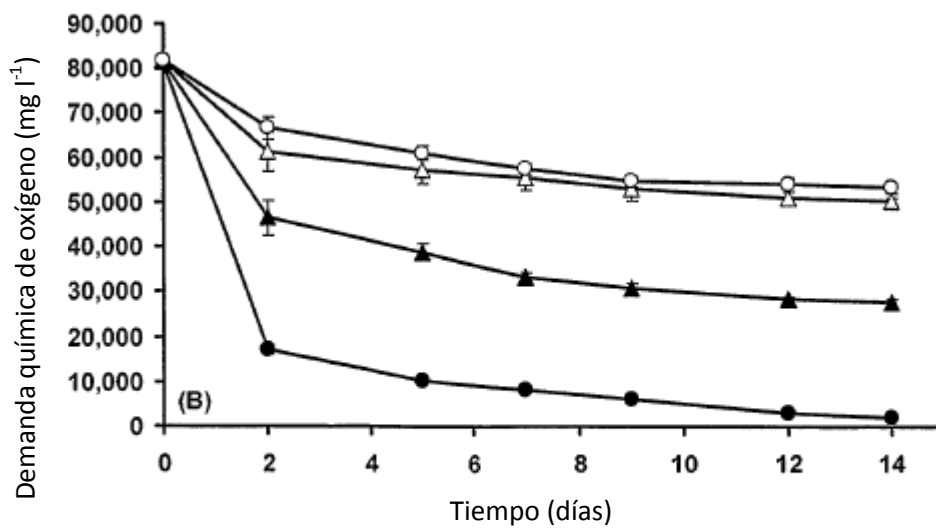
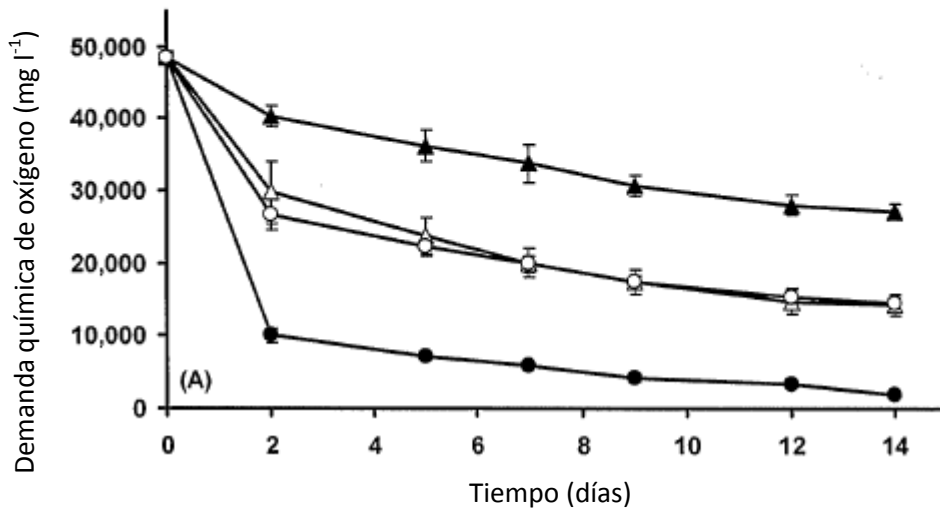


Fig.13