

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 010**

21 Número de solicitud: 201201203

51 Int. Cl.:

**G21F 9/18** (2006.01)

**C02F 3/32** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

**04.12.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**09.03.2015**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**09.06.2015**

Fecha de la concesión:

**09.07.2015**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**16.07.2015**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
(100.0%)**

**Avenida de Séneca, 2  
28040 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**COSTAS COSTAS , Eduardo;  
LÓPEZ RODAS, Victoria;  
GARCÍA BALBOA, Camino;  
DE MIGUEL FERNÁNDEZ, Lara y  
BASELGA CERVERA, Beatriz**

74 Agente/Representante:

**PLUMET ORTEGA, Joaquín**

54 Título: **Método de recuperación y enriquecimiento de uranio mediante bioacumulación en microalgas mejoradas genéticamente**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un método de recuperación de U y un método de enriquecimiento de U mediante bioacumulación en microalgas mejoradas genéticamente. Para obtener estas microalgas mejoradas, la invención incluye un método de mejora genética por selección artificial mediante el cual se ha obtenido la cepa Chlaf SCEP de Chlamydomonas fonticola. Esta cepa concentra en su interior, mediante bioacumulación activa, el uranio captado del exterior, en forma de precipitados metálicos que representan el 3% de la biomasa seca del alga. Además, produce un fraccionamiento isotópico de  $\Delta^{235}\text{U}/^{238}\text{U} = 1.3\%$  que puede aplicarse en sucesivos pasos para aumentar el enriquecimiento en  $^{235}\text{U}$ . La invención también incluye el uso de estas microalgas en la recuperación de uranio disuelto produciendo un fraccionamiento isotópico que puede utilizarse para conseguir uranio enriquecido de uso industrial, así como en su utilización en bio-remediación de aguas y/o suelos contaminados con uranio (en minería, depósitos de residuos radioactivos, piscinas de apagamiento -radioactive decay-, accidentes nucleares, vertidos, etc.).

ES 2 531 010 B2

## DESCRIPCIÓN

Método de recuperación y enriquecimiento de uranio mediante bioacumulación en microalgas mejoradas genéticamente.

### 5 Campo técnico de la invención

La invención se encuadra en el sector de la biotecnología aplicada al tratamiento de la contaminación ambiental y más concretamente a la biorremediación de uranio, incluyendo el enriquecimiento de uranio, mediante la bioacumulación en microalgas mejoradas genéticamente por medio de un método de selección  
10 artificial.

### Estado de la técnica

El uranio es un elemento muy contaminante, extremadamente dañino -tanto por  
15 su actividad radioactiva como por su elevada toxicidad como metal pesado (Achrya et al. (2012) Bioresource Technology 116: 290-294)-, que se introduce en los ecosistemas naturales a través de actividades humanas (explotaciones mineras, producción de energía nuclear y actividades militares), las cuales han generado una ingente cantidad de residuos. Debido a su capacidad de formar  
20 compuestos que se disuelven y dispersan en el agua, este elemento se incorpora fácilmente a la cadena trófica, lo que ha llevado al uranio a estar en los primeros puestos en la escala de contaminantes antropogénicos.

Consecuentemente, se ha hecho un gran esfuerzo para lograr procesos que  
25 permitan la remediación de los numerosos problemas ambientales causados por el uranio. En este sentido, existen numerosos abordajes tecnológicos clásicos, basados en métodos fisicoquímicos y de ingeniería (básicamente métodos químicos directos, tratamientos electro-químicos y métodos de intercambio iónico y adsorción; revisados por Kalin et al. (Kalin et al. (2005) Journal of Environmental  
30 Radioactivity 78: 151-177).

Las tecnologías emergentes basadas en el secuestro del uranio empleando microorganismos, son muy prometedoras pues resultan auto-sostenibles,

respetuosas con el medio ambiente y de bajo coste. En este sentido diversos estudios se han enfocado hacia la captación del uranio empleando cianobacterias y microalgas (p.e. Sakaguchi et al. (1978) *J. Ferment. Tech.* 56, 561–565; Fortin et al. (2004) *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 974–981; Fortin et al. (2007) *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 242-248; Acharya et al. (2009) *Bioresource Technology* 100: 2176-2181; Acharya et al. (2012) *Bioresource Technology* 116: 290-294). Pronto se demostró que la captación de uranio por microalgas era un proceso fisicoquímico independiente de su metabolismo, que se basaba solo en la adsorción del uranio a la superficie celular, para el cual las microalgas no tenían que estar vivas. (Horikoshi et al. (1979) *Agricultural and Biological Chemistry* 43, 617–623). Así el uranio puede ser eliminado parcialmente del medio utilizando simplemente biomasa microalgal aunque esté muerta (Kalin et al. (2005) *Journal of Environmental Radioactivity* 78: 151-177; Cecal et al. (2012) *Bioresource Technology* 118: 19–23). Pero más recientemente se encontró otro proceso de captación activa de uranio por parte de microalgas, un proceso de bio-acumulación que se basa en la actividad metabólica de microalgas vivas (Vogel et al. (2010) *Science of the Total Environment* 409: 384-395).

Así los dos procesos biológicos que posibilitan la concentración y recuperación del uranio son la bio-adsorción y la bio-acumulación:

□ La bioadsorción supone la unión del uranio a distintos grupos funcionales que se encuentran en las paredes celulares de la mayoría de las plantas, algas y microorganismos. Básicamente estas paredes están compuestas por polisacáridos y carbohidratos que presentan grupos cargados negativamente. Las cargas negativas pueden unir electrostáticamente formas catiónicas del uranio. Asimismo, el uranio también puede ser adsorbido extracelularmente a través de ligandos de tipo inorgánico. Los fenómenos de adsorción son fenómenos superficiales en los que se ve involucrada la pared celular, pudiéndose dar tanto con organismos vivos como con organismos muertos. Con frecuencia se propone la utilización de la biomasa muerta.

□ La bio-acumulación o bio-concentración implica la captación y transporte del uranio al interior de la célula donde se concentra en vacuolas y otros

compartimentos celulares o es precipitado. Este mecanismo requiere que los organismos estén vivos.

Desde hace 50 años se utilizan organismos para combatir la contaminación (bioremediación) (revisado por Saunders et al. (2012) Plos One 7(5): e36470), probándose distintos tipos de biomasa (plantas, bacterias, hongos (revisado por Ghosh and Smith, (2005) As. J. Energy Env. 6(04): 214-231; Wang and Chen, (2006) Biotechnology advances 24(5): 427-451). También se aprovecha la bioflora autóctona de lugares contaminados en los que los organismos ya están adaptados a la contaminación (p.e. Vrionis et al. (2005) Applied and Environmental Microbiology 71(10): 6308-6318).

De manera más específica se ha estudiado la utilidad de algunas especies de microalgas tanto en la bioadsorción de uranio como en su bioacumulación (Acharya et al. (2009) Bioresource Technology 100: 2176-2181; Achrya et al. (2012) Bioresource Technology 116: 290-294; Vogel et al. (2010) Science of the Total Environment 409: 384-395). Incluso ha habido algunos intentos de fraccionamiento isotópico mediante bacterias acoplado a reacciones químicas de reducción del hierro (Rademarker et al. (2006) Environ. Sci. Technol. 40: 6943-3948).

En cualquier caso, se ha intentado por un lado, ligar el U a la superficie de un microorganismo o confinarlo en su interior, para conseguir su eliminación del medio y su posterior recuperación y tratamiento. Aún así, todavía no se ha encontrado un método plenamente satisfactorio en cuanto a numerosos factores, como son la eficiencia, la sencillez, la capacidad de crecimiento exponencial en las condiciones ambientales que determinan las elevadas acumulaciones de residuos de U o la facilidad de recuperación de los microorganismos que secuestran el uranio.

30

Exposición de la invención

La presente invención se refiere a un método de recuperación de uranio disuelto en aguas y/o sólidos, que se basa en la actividad biológica de microalgas obtenidas mediante un nuevo proceso de mejora genética basado en la selección artificial de mutantes que aparecen en líneas mantenidas por reproducción  
5 asexual, a consecuencia del cual los clones seleccionados acumulan en su interior (en forma de precipitados sólidos metálicos) el uranio que captan del medio ambiente. La invención también se refiere a la utilización del método de recuperación de uranio en bio-remediación de aguas y/o suelos contaminados con uranio en minería, depósitos de residuos radioactivos, piscinas de apagamiento  
10 (radioactive decay), accidentes nucleares, vertidos y demás aplicaciones en el sector del uranio. Por otro lado, las microalgas obtenidas según el método de mejora genética de la invención, además de la recuperación de uranio, también producen fraccionamiento isotópico enriqueciendo la relación  $^{235}\text{U} / ^{238}\text{U}$ .

15 Un primer aspecto de la invención se refiere a un método para seleccionar microalgas capaces de acumular activamente uranio en su interior en las condiciones ambientales en que este elemento se encuentra habitualmente en las zonas mineras y de acumulación de residuos de U procedentes de centrales nucleares, actividades militares o industriales.

20

El método de mejora genética por selección artificial de microalgas capaces de acumular activamente uranio incluye:

- a) la toma de muestras de aguas o suelos contaminados con U,
- b) el aislamiento de cepas de microalga a partir de estas muestras,
- 25 c) las transferencias seriadas de las cepas aisladas en el paso anterior a un medio que contiene cantidades crecientes de uranio, cantidades crecientes de otros metales pesados, valores decrecientes de pH y valores variables de temperatura, seleccionando para la transferencia a la siguiente generación sólo aquellas microalgas que sedimenten más rápidamente.

30

Para la toma de muestras se puede recurrir a cualquier espacio (aguas, suelos) con altas concentraciones de uranio, por ejemplo: zonas mineras de uranio, zonas

de acumulación de residuos de uranio procedentes de centrales nucleares, de actividades militares o de actividades industriales, piscinas de apagamiento, etc.

El aislamiento de las cepas de microalgas contenidas en las muestra se realiza mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. A título de ejemplo, se pueden realizar diluciones sucesivas en placas multiensayo, tal y como se esquematiza en la figura 1. El aislamiento final de cada uno de los clones se realiza cogiendo una sola célula con una micropipeta.

- 10 Para conseguir la mejora genética en la capacidad de bioacumular uranio se realizan transferencias seriadas, periódicamente, cada 7 o 14 días, durante un periodo de tiempo de entre 6 y 12 meses. Como recipiente para realizar la selección durante las transferencias se puede utilizar una bureta en cuya parte superior se añade, en cada transferencia, una población de microalgas entre
- 15  $5 \times 10^9$  y  $5 \times 10^{10}$  y se las deja sedimentar. Para la transferencia a la siguiente generación se seleccionan las microalgas que sedimentan más rápidamente, es decir, llegan antes a la parte inferior de la bureta. El medio contenido en la bureta incluye uranio en concentraciones que pueden ir de 25 a 50 mg l<sup>-1</sup> y, preferentemente, incluye también un medio de enriquecimiento para las
- 20 microalgas. Las microalgas que sedimentan más rápidamente son aquellas que captan desde el medio externo mayor cantidad de uranio, transportándolo activamente a su interior y acumulándolo, de manera que lo concentran con respecto al medio externo existente en la bureta. Estas microalgas se vuelven mucho más densas que las microalgas de los genotipos que no captan tanto
- 25 uranio en su interior y que, por ello, tardan más en llegar a la parte inferior de la bureta. Al seleccionar para la siguiente generación las microalgas que sedimentan más rápidamente, se están seleccionando los genotipos que más uranio son capaces de captar. Así, los genotipos que captan más uranio aumentan su velocidad de sedimentación desde alrededor de 1 cm por hora hasta 80 cm/hora.
- 30 En una realización preferida de la invención se seleccionan para la siguiente generación las microalgas con una velocidad de sedimentación igual o superior a 35 cm/h.

Adicionalmente, el método de selección puede incluir la iluminación de la parte superior del recipiente en el que se realizan las transferencias seriadas y el oscurecimiento de su parte inferior. Para mejorar el proceso con las microalgas que nadan activamente hacia la luz, el recipiente utilizado, por ejemplo una  
5 bureta, se puede iluminar por su parte superior y oscurecer su parte inferior (por ejemplo, envolviéndola en papel de aluminio). Así solo llegan al fondo aquellas microalgas que tienen tanto uranio en su interior que no les permite nadar hacia la superficie iluminada (Fig 2). La repetición del proceso, generación tras generación, consigue que al final las microalgas seleccionadas acumulen en su  
10 interior grandes cantidades de uranio.

Adicionalmente, se pueden seleccionar los clones que, una vez superado el proceso de selección descrito, además, producen autoaglutinación espontánea lo que favorece el hundimiento rápido de las microalgas que han bioacumulado U.  
15 Esta característica, además, facilita la recuperación del uranio permitiendo realizarla de forma eficiente.

La invención también se refiere a las microalgas obtenibles mediante este método de mejora genética por selección artificial.

20

Utilizando este método de selección a partir de muestras de agua de una balsa de evaporación perteneciente a la mina de uranio de Saelices el Chico (Salamanca, España), así como de los efluentes de la mina de uranio de Villavieja de Yeltes (Salamanca, España), se obtuvo la cepa Chlaf SCEP de *Chlamydomonas cf fonticola* Bravez que se depositó en la colección de microalgas del Banco Español de Algas de Las Palmas de Gran Canaria (España), con número de depósito BEA  
25 D04-12.

La invención también se refiere a un método de recuperación de U a partir de  
30 aguas y/o sólidos contaminados que incluye los siguientes pasos:

- a) solubilización del U existente en los sólidos contaminados,
- b) adición de medio de enriquecimiento para microalgas a la solución acuosa contaminada con U,

- c) mantenimiento de la temperatura de la solución acuosa entre 1 y 47°C,
- d) inoculación de microalgas definidas en cualquiera de las reivindicaciones 3-5,
- e) sedimentación de las microalgas,
- f) separación de las microalgas de la solución acuosa enriquecida,
- 5 g) lavado de las microalgas del paso f) con HCl 0,1-1M, o bien calcinación de la biomasa.

Adicionalmente, el método de recuperación de U puede incluir un paso h) de  
iluminación de la parte superior del recipiente en el que se inoculan las microalgas  
10 y oscurecimiento de la parte inferior de dicho recipiente, de entre 25 y 500  $\mu$ moles  
de fotones  $m^{-2} s^{-1}$ , y que se mantiene durante los pasos d) y e).

El uranio a recuperar debe estar en forma soluble, si no está en forma soluble, se  
procede a su solubilización, mientras que, si está en forma soluble, no es  
15 necesario realizar el paso a). Por ello, se pueden utilizar como material residual a  
tratar, tanto aguas contaminadas en las que el uranio aparece en forma soluble,  
como residuos sólidos (material de escombreras; sólidos residuales; minerales  
marginales; mineral empobrecido, etc.). En este último caso, y una vez que el  
mineral ha sido seleccionado, el método de recuperación de U de la invención  
20 incluye un paso inicial de solubilización del uranio. Para ello se utilizan soluciones  
acuosas que ayudan a la formación de iones (soluciones ácidas si la mena es  
silíceas o soluciones básicas si la mena es carbonatada) para formar iones de  
uranio hexavalente ( $U^{6+}$ ).

25 La invención también se refiere a un método de enriquecimiento de uranio para su  
uso industrial, que incluye::

- a) solubilización del U que no esté en forma soluble,
- b) adición de medio de enriquecimiento para microalgas a la solución acuosa que  
contiene el U,
- 30 c) mantenimiento de la temperatura entre 1 y 47°C,
- d) inoculación de microalgas seleccionadas según el método de selección artificial  
de la invención,
- e) sedimentación de las microalgas,

- f) recuperación del U mediante lavado del cultivo con HCl 0,1-0,5M, o bien mediante calcinación de la biomasa,
- g) disolución en una nueva solución acuosa del U recuperado en el paso f),
- h) repetición de los pasos b)-g) hasta obtener el enriquecimiento deseado,
- 5 momento en que el método se para en el paso f).

Si el uranio del que se parte ya está en forma soluble, no es necesario realizar el paso a). En el caso en que el U que se desea enriquecer no esté en forma soluble, el método de enriquecimiento de U incluye un paso inicial a) de solubilización del uranio. Para ello se utilizan soluciones acuosas que ayudan a la

10 formación de iones (soluciones ácidas si la mena es silíceas o soluciones básicas si la mena es carbonatada) para formar iones de uranio hexavalente (U6+).

Adicionalmente, el método de enriquecimiento de uranio para su uso industrial puede incluir un paso i) de iluminación de la parte superior del recipiente en el que se inoculan las microalgas y oscurecimiento de la parte inferior de dicho

15 recipiente, que se mantiene durante los pasos d) y e).

De acuerdo con la invención, el problema de concentrar y enriquecer el uranio se resuelve por medio del uso de microalgas seleccionadas mediante el método de selección artificial de la invención y, preferentemente, mediante el uso del clon microalgal (Chlaf SCEP), que ha sido obtenido mediante dicho método de mejora genética por selección artificial en el laboratorio para recuperar U de aguas y/o sólidos contaminados con U y para enriquecer el U recuperado. Este clon tiene la

20 propiedad de extraer activamente el uranio disuelto en el medio externo, bio-acumulándolo activamente en su interior en forma de precipitados metálicos cristalinos que llegan a constituir el 3% de la biomasa algal, produciendo un fraccionamiento isotópico que permite enriquecer la relación  $\Delta^{235}\text{U}/^{238}\text{U}$  en un 1.3‰ en cada pase por las células. Mediante sucesivos pases se consigue

25 enriquecer el uranio sumando un nuevo enriquecimiento en  $\Delta^{235}\text{U}/^{238}\text{U} = 1.3\text{‰}$ . El proceso puede continuarse hasta conseguir niveles de  $^{235}\text{U}$  en el rango de los necesarios para su uso industrial (0,9%). Tan solo hace falta un pequeño inóculo inicial pues crece exponencialmente duplicando su biomasa en 24 horas mientras

30

realiza las anteriores funciones, y resistiendo los efectos nocivos (tanto radiación como toxicidad) del uranio (hasta 100 mgL<sup>-1</sup> de U) así como otros metales pesados, entre ellos: Ar, Sn, Pb, Cr, Cu, Zn (hasta 300 mgL<sup>-1</sup> de cada uno de ellos), pudiendo trabajar a pH muy ácido (2.0), en un amplio rango de  
5 temperaturas (de 1 a 47°C) y que al final del proceso permite una auto-agregación inducida de las células en flóculos de 1 a 4 mm que se hunden a 40 cm por hora permitiendo la fácil recuperación del U.

La presente invención es muy eficaz cualitativa y cuantitativamente. Mediante el  
10 proceso de mejora genética de la invención se obtienen clones de microalgas con capacidad para acumular y enriquecer U. Especialmente, el clon Chlaf SCEP:

permite bio-acumular muy rápidamente el uranio disuelto en el medio externo, concentrándolo en el interior de la célula en forma de precipitados metálicos sólidos de U, que llegan rápidamente (en solo 24 horas) a constituir el 3% de la  
15 biomasa seca microalgal, con lo que el proceso es cuantitativamente mucho más eficaz y rápido que cualquier proceso de bio-adsorción o bio-acumulación anteriormente descrito,

produce un fraccionamiento isotópico eficiente, hasta tal punto que se puede enriquecer significativamente el uranio hasta un  $\Delta^{235}\text{U}/^{238}\text{U} = 1.3\text{‰}$  en cada  
20 pase por las microalgas. Para conseguir el enriquecimiento necesario para su utilidad como combustible nuclear solo es necesario efectuar sucesivos pases, cada uno de los cuales incrementa el fraccionamiento en  $\Delta^{235}\text{U}/^{238}\text{U} = 1.3\text{‰}$ . Con sucesivos pases (cada uno de los cuales solo dura 24 horas) puede conseguirse un enriquecimiento muy elevado en un corto período de tiempo,

25  resiste los efectos nocivos (tanto radioactivos como de toxicidad) de concentraciones muy altas de uranio (hasta 100 mgL<sup>-1</sup>) bio-acumulando y fraccionando U eficazmente a esas elevadas concentraciones de U,

puede trabajar incluso a un pH muy ácido (pH =2.0), como los que se dan en las balsas de lavado de U en explotaciones mineras, balsas de evaporación,  
30 balsas de almacenamiento y decay, etc. bio-acumulando y fraccionando U eficazmente a esa elevada acidez,

puede trabajar incluso a muy altas concentraciones de metales pesados, lo que permite utilizarlo en aguas extremadamente contaminadas (resistiendo hasta 300

mgL-1 de cada uno de los metales: Ar, Sn, Pb, Cr, Cu, Zn) bio-acumulando y fraccionando U eficazmente en presencia de estos otros metales pesados,

puede trabajar en un amplio rango de temperaturas (1<sup>o</sup>-47°C), bio-acumulando y fraccionando eficazmente en todas ellas,

5  mantiene tasas de crecimiento y de bio-acumulación muy elevadas (duplica su biomasa en 24 horas) en estos ambientes adversos,

permite una auto-agregación inducida para su fácil separación del medio, y su posterior recuperación del uranio (grandes flóculos que se hunden a 40 cm por hora)

10  para recuperar el U solo es necesario recuperar esta biomasa microalgal una vez sedimentada; el U está en estado sólido en el interior y queda disponible tras eliminar la biomasa microalgal por procedimientos sencillos (p. e., tratamiento con HCl),

se trata de un proceso natural en el que no se generan sub-productos tóxicos, puede aplicarse en tratamientos "in situ" y los costes asociados a su implementación son mucho menores que en el caso de aplicación de otras tecnologías,

15  la huella ecológica de esta tecnología es muy inferior a la de cualquier otro sistema que se emplee (pues las microalgas fijan eficazmente CO<sub>2</sub>),

20  además, es un sistema que se auto-mantiene y su funcionamiento sigue el comportamiento de la máquina de von Newman, esto es, un sistema capaz de replicarse mientras realiza su actividad de concentración de uranio, con lo que se logra "regenerar" continuamente la biomasa activa durante el tratamiento del uranio.

25

#### Breve descripción de la Figuras

Figura 1. Procedimientos empleados en el estado de la técnica para aislar microalgas:

30 A. En primer lugar se utilizó un procedimiento de diluciones sucesivas. En cada dilución sucesiva hay un menor número de microalgas, hasta que se llega a una dilución tal que ya no lleva ninguna microalga. Se elige el cultivo que crece en

el pocillo anterior al que no se encuentra crecimiento pues es muy probable que se hubiese originado solo a partir de una única microalga.

- 5 B. Para asegurar que se trata de un clon, desde el cultivo obtenido por diluciones sucesivas, se aísla una sola célula con una micropipeta bajo el microscopio. Esta única célula comienza a dividirse asexualmente originando células genéticamente idénticas a sí misma.

10 Figura 2: Esquema del método de mejora genética por selección artificial que aprovecha las diferencias en sedimentación que se dan entre las microalgas que captan más uranio (sedimentan más rápidamente) y las que no lo captan.

- a. Se depositan las microalgas en la parte superior de la micropipeta  
b. Se espera a que vayan decantándose. Se hunden más rápido las que son más densas por tener más U en su interior  
c. Se recogen las células que antes llegan a la parte inferior de la micropipeta  
15 para ser el inóculo de la siguiente población

Figura 3: Esquema de separación de las microalgas con el uranio en su interior.

- A. Al principio las microalgas crecen exponencialmente, capturan uranio y lo acumulan en su interior.  
20 B. Al alcanzar la fase saturada las microalgas flocculan espontáneamente formando grandes masas que se hunden.  
C. Una vez han alcanzado el fondo, estos flóculos microalgales con el uranio en su interior se separan del medio.

Modo de realización de la invención

25

A modo de ejemplo y sin exclusión de otro modo de realización, se describen algunas formas particulares de realización de la invención

Ejemplo 1. Obtención del clon microalgal Chlaf SCEP.

30

1º Se consiguieron cultivos iniciales compuesto por 231 cepas de la microalga unicelular *Chlamydomonas cf fonticola* Bravez, aislados cada una de ellas por procedimientos de diluciones sucesivas en placas multiensayo (Fig. 1); el

aislamiento final de cada uno de estos clones se produjo cogiendo una sola célula con una micropipeta (Fig.1). Estos genotipos provienen de distintas muestras de agua de una balsa de evaporación perteneciente a la mina de uranio Saelices el Chico (Salamanca, España), así como de los efluentes de la mina de uranio de Villavieja de Yeltes (Salamanca, España). La concentración de uranio alcanza 25 mg/L-1 en Saelices y los 48 mg/L-1 en Villavieja. Las actividades mineras comenzaron en en el año 1960 y finalizaron en el año 2.000, resultando que la microflora presente en el agua de la balsa y por tanto en la muestra de agua tomada, lleva mas de 50 años en contacto con elevadas concentraciones de uranio.

2° Se conservaron individualmente todas estas cepas. También se formó un cultivo mixto juntando en un solo cultivo todas las cepas de *C. fonticola* que habían sido aisladas individualmente. Tanto las cepas como el cultivo mixto de esta especie se mantuvieron mediante transferencias masivas cada 15 días de un inóculo grande (>250 millones de células) a medio nuevo constituido por agua de Saelices conteniendo 25 mgL-1 de U enriquecida con medio BG-11 (SIGMA-ALDRICH) diluido cuatro veces.

3° Para tener una idea de la viabilidad de nuestra invención, en primer lugar estimamos su potencial de respuesta a la selección artificial mediante el cálculo de las heredabilidades de los parámetros más importantes del proceso de separación de uranio (capacidad de bioacumulación, capacidad de fraccionamiento isotópico, resistencia a los efectos tóxicos del uranio, resistencia al pH y a los metales pesados, resistencia a temperaturas altas y bajas, capacidad de floculación y velocidad de hundimiento) de nuestra población experimental mediante el procedimiento de análisis de caracteres poligénicos basado en procedimientos de Restricted Maximum Likelihood (REML) tal y como describimos en Rico et al. (2006) *Phycologia* 45(3):237-242. Esto nos permitió comprobar que todas estas propiedades de interés estaban bajo control genético y existía la suficiente variabilidad genética en la población como para que la respuesta a la selección fuese excelente. En todos los casos las heredabilidades (esto es la proporción entre la variabilidad de un carácter que se debe a causas

genéticas o a otras causas) fue muy elevada: siempre se cumplió que  $H > 0.70$  (más del 70% era debido a causas genéticas) lo que asegura una excelente respuesta a la selección.

- 5 4° Demostrado mediante el cálculo de heredabilidades que la población mixta de *C. fonticola* formada por el conjunto de las 231 cepas aisladas de la balsa de evaporación de la mina de uranio de Saelices el Chico y de la balsa de efluentes de la mina de Villavieja de Yeltes (en la cual ocurrían fenómenos de reproducción sexual y de recombinación, que se comprobaron por el reconocimiento de la
- 10 morfología de cigotos y gametos, al mismo tiempo que un gran crecimiento basado en la reproducción asexual) respondería a una selección artificial para los caracteres: i) capacidad de bioacumulación, ii) capacidad de fraccionamiento isotópico, iii) resistencia a los efectos tóxicos del uranio, iv) resistencia a los metales pesados, v) resistencia a pH ácido, vi) resistencia a temperaturas altas y
- 15 bajas, y vii) gran capacidad de floculación y rápida velocidad de hundimiento, procedimos a efectuar un programa de mejora genética por selección artificial basado en las particulares características biológicas de estas microalgas (poblaciones ingentes, reproducción asexual y sexual, tiempos de generación pequeños). Para ello, desarrollamos nuevos métodos de mejora genética por
- 20 selección artificial aplicados. Aplicamos estos procedimientos diferentes para obtener las distintas características de interés para la invención:

#### Ejemplo 2. Método de mejora genética por selección artificial.

- 25 Para conseguir la mejora genética en la capacidad de bio-acumular uranio en forma de precipitados sólidos en el interior del citoplasma celular, empleamos un procedimiento de selección sobre el cultivo mixto de *C. fonticola* (compuesto por la suma de las 231 cepas y sus recombinantes), que se basó en un proceso de transferencias seriadas, realizadas una vez a la semana durante 6 meses, de
- 30 manera que el inóculo elegido para las transferencias se obtuvo añadiendo una gran población de microalgas ( $5 \times 10^9$ ) en la parte superior de una bureta y dejando sedimentar las microalgas, seleccionando para la transferencia a la siguiente generación solo aquellas microalgas que sedimentaron más rápido

(tardaron entre 15 y 30 minutos en llegar a la parte de abajo de la bureta), debido a que en su interior contenían más uranio, que habían captado desde el medio externo, lo habían transportado activamente a su interior y acumulado, concentrándolo respecto al medio externo. De esta manera, se volvían mucho más densas que las microalgas de los genotipos que no captaban tanto uranio en su interior y, por ello, llegaban mucho antes a la parte inferior de la bureta (entre 15 y 30 minutos, mientras que los que no captaban U tardaban más de 5 horas en sedimentar). Para mejorar el proceso, la bureta se iluminó por su parte superior, y se envolvió en papel de aluminio para oscurecer su parte inferior, pues estas microalgas nadan activamente hacia la luz. Así solo llegaron al fondo aquellas microalgas que tenían tanto uranio en su interior que se hundían rápidamente (Fig. 2). La repetición del proceso, generación tras generación, consiguió que al final las microalgas seleccionadas acumulen en su interior grandes cantidades de uranio.

15

Para conseguir la mejora genética en la resistencia a los efectos tóxicos del uranio, a los metales pesados y a pH ácido, se empleó un método que maximiza la aparición de nuevos mutantes, a la vez que maximiza también la intensidad de selección (aplicando elevados coeficientes de selección artificial). La base conceptual de estos procedimientos de mejora genética en microalgas por selección artificial que maximiza la aparición de mutantes y aplica a la vez grandes coeficientes de selección, se basa en trabajos desarrolladas por nuestro grupo que se describen en detalle en Huertas et al. (2011) Proc. R. Soc. B. 278, 3534–3543. Sin embargo aquí fue necesario emplear un procedimiento totalmente nuevo que pudiese acoplarse al procedimiento de mejora para la capacidad de bioacumulación descrito en el párrafo anterior. Así, empleamos un procedimiento de selección sobre el cultivo mixto de *C. fonticola*, aprovechando los intervalos semanales de proliferación que tenían lugar justo tras añadir una gran población de microalgas en la parte superior de una bureta ( $5 \times 10^9$ ) y dejando sedimentar las microalgas, seleccionando solo aquellas microalgas que sedimentaban más rápido porque bio-acumulaban más uranio. En total fue una selección en 24 intervalos semanales diferentes donde se dejaban proliferar antes de la siguiente transferencia en un medio que de semana en semana era progresivamente más

30

ácido, tenía más uranio, más metales pesados y mayor fluctuación de temperaturas. Así, la primera semana se empezó con 25 mgL<sup>-1</sup> de U, y 10 mgL<sup>-1</sup> de cada uno de los metales Ar, Sn, Pb, Cr, Cu y Zn, pH 6 y 19° C un día y al siguiente 21°C; la segunda semana se sometieron a 28.125 mgL<sup>-1</sup> de U, 22 mgL<sup>-1</sup> de Ar, Sn, Pb, Cr, Cu y Zn, pH 5.83 y 18°C un día y 22°C al siguiente; (sucesivamente se sometieron a un incremento semanal progresivo de 3.125 mgL<sup>-1</sup> de U, 12 mgL<sup>-1</sup> de Ar, Sn, Pb, Cr, Cu y Zn, una disminución de 0.17 puntos de pH y al incremento y disminución de ± 1°C. Así se llegó a los límites máximos de selección en 24 semanas que correspondieron a 100 mgL<sup>-1</sup> de U, 300 mgL<sup>-1</sup> de Ar, Sn, Pb, Cr, Cu y Zn, pH 2 y temperaturas de entre 1 y 47 °C. La clave para conseguir tan buena respuesta a la selección fue mantener tamaños eficaces de población muy elevados (en la práctica siempre entre 1 y 5x10<sup>9</sup> células), permitiendo además que se produzca reproducción sexual lo que permite la recombinación que consigue así acumular las mutaciones más favorables en un mismo individuo que luego se reproduce asexualmente. Esto aseguró la concentración en unas cuantas cepas de mutantes con elevado efecto que les permitieron superar las restrictivas condiciones selectivas.

Tras esta intensa selección, se aislaron individualmente 225 células, cada una depositada sola en su medio de cultivo hasta que dieron origen a 225 clones diferentes. Se seleccionaron los genotipos capaces de producir una auto-aglutinación específica que tuvo lugar espontáneamente al final de su ciclo de crecimiento exponencial. Cuando algunos clones llegaban a la fase de saturación, sus células se aglutinaban espontáneamente debido a la expresión de una lectina de superficie celular. 7 de los 225 clones fueron capaces de expresar estas lectinas aglutinantes al final del ciclo de crecimiento exponencial. Gracias a la elevada densidad de las microalgas con cantidades muy significativas de uranio en su interior, su hundimiento era muy rápido permitiendo separarlas del agua por un sencillo proceso de decantación.

30

Ejemplo 3. Obtención del clon Chlaf SCEP.

Se analizaron los 7 clones obtenidos según el ejemplo 2, y que tenían capacidad de autofloculación, para medir su capacidad de fraccionamiento isotópico de uranio, seleccionando el clon con genotipo de mayor capacidad de enriquecer en  $^{235}\text{U}$  ( $\Delta^{235}\text{U}/^{238}\text{U} = 1.3\%$ ). Este cultivo se denominó Chlaf SCEP y se depositó  
5 en la colección de microalgas del Banco Español de Algas de Las Palmas de Gran Canaria (España), donde obtuvo el número de depósito BEA D04-12.

#### Ejemplo 4. Método de recuperación de uranio.

10 El método de recuperación de uranio en actividades de minería, bio-remediación, piscinas de decaimiento de combustible nuclear, y otras aplicaciones en el sector del uranio se realizó según el siguiente proceso secuencial:

En primer lugar, el uranio a recuperar debe estar en forma soluble. Por ello, se  
15 pueden utilizar como material residual a tratar, tanto aguas contaminadas en las que el uranio aparece en forma soluble, como residuos sólidos (material de escombreras; sólidos residuales; minerales marginales; mineral empobrecido, etc.). En este último caso, y una vez que el mineral había sido seleccionado, se procedió a la solubilización del uranio. Para ello se utilizaron soluciones acuosas  
20 que ayudaron a la formación de iones (soluciones ácidas si la mena es silíceas o soluciones básicas si la mena es carbonatada) con el fin de formar iones de uranio hexavalente ( $\text{U}^{6+}$ ).

A continuación este medio acuoso conteniendo el uranio se enriqueció con los  
25 nutrientes necesarios para el crecimiento del clon Chlaf SCEP, (BG-11 diluido 4 veces) y se mantuvo en condiciones de temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$ , con iluminación de  $75 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , procediéndose a inocular microalgas del clon (Chlaf SCEP) a razón de un millón de microalgas por litro. Este clon crece a densidades de hasta 60 millones de células por mililitro a las cuales alcanza la  
30 saturación.

Se procedió a la separación del uranio para lo cual se esperó a la floculación espontánea de las microalgas al final de su ciclo de crecimiento exponencial. Al

objeto de recoger más fácilmente el uranio, este paso se realizó trasvasando el cultivo a un cono de decantación tal y como se muestra en la figura 3. El uranio que había sido adsorbido por el cultivo clónico se recuperó a través de un proceso de lavado con 10 mL HCl 0,1M en agitación durante dos horas. El HCl formó un complejo estable con el metal lo que permitió su recuperación.

Otra alternativa que se utilizó en otras ocasiones para la recuperación del metal puro fue la calcinación de la biomasa.

De este modo se dispone ya de un mecanismo para una primera extracción de uranio.

Ejemplo 5. Método de enriquecimiento de uranio.

Para enriquecer el uranio, se siguió un proceso secuencial haciendo pases sucesivos por los cultivos, según se describe en el ejemplo 4. Así, en primer lugar se concentró el uranio en la cepa Chlaf SCEP. Ese uranio ya estaba ligeramente enriquecido por el fraccionamiento isotópico que produce el organismo. A continuación se eliminó toda la biomasa microalgal mediante tratamiento con HCl 1M dejando libre el uranio del interior de la microalga, y se disolvió de nuevo en medio de cultivo. Se volvieron a añadir microalgas Chlaf SCEP tal y como se describe en el ejemplo 4 que volvieron a acumular el uranio fraccionándolo de nuevo y enriqueciéndolo cada vez más. Así se siguió con este proceso hasta conseguir un enriquecimiento de hasta 0.9% de  $^{235}\text{U}$ .

25

30

REIVINDICACIONES

1. Método de mejora genética por selección artificial de microalgas capaces de acumular activamente uranio en su interior que incluye:
  - 5 a) la toma de muestras de aguas o suelos contaminados con U,
  - b) el aislamiento de cepas de microalga a partir de estas muestras,
  - c) transferencias seriadas de las cepas aisladas en el paso b) a un medio que contiene cantidades crecientes de uranio, cantidades crecientes de otros metales pesados seleccionados entre el grupo formado por Ar, Sn, Pb, Cr, Cu y/o Zn,
  - 10 valores decrecientes de pH y valores variables de temperatura entre los 1 y 47°C, seleccionando para la transferencia a la siguiente generación sólo aquellas microalgas que sedimenten a velocidades iguales o superiores a 35 cm/h.
  
2. Método según la reivindicación 1 que incluye un paso d) de iluminación de la  
15 parte superior del recipiente en el que se realizan las transferencias seriadas y oscurecimiento de la parte inferior de dicho recipiente, en el que los pasos c) y d) son simultáneos.
  
3. Microalga de la especie *Chlamydomonas fonticola* Bravez capaz de acumular  
20 activamente uranio.
  
4. Cultivo biológicamente puro de *Chlamydomonas fonticola* BEA D04-12.
  
5. Método de recuperación de U a partir de aguas y/o sólidos contaminados que  
25 incluye los siguientes pasos:
  - a) solubilización del U existente en los sólidos contaminados,
  - b) adición de medio de enriquecimiento para microalgas a la solución acuosa contaminada con U,
  - c) mantenimiento de la temperatura de la solución acuosa entre 1 y 47°C,
  - 30 d) inoculación de microalgas definidas en cualquiera de las reivindicaciones 3-4,
  - e) sedimentación de las microalgas,
  - f) separación de las microalgas de la solución acuosa enriquecida,

g) lavado de las microalgas del paso f) con HCl 0,1-1M, o bien calcinación de la biomasa,  
en el que el paso a) sólo se realiza cuando se parte de materiales sólidos contaminados con U.

5

6. Método según la reivindicación 5 en que la temperatura del paso c) es de 20°C.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5-6 que incluye un paso h) de iluminación de la parte superior del recipiente en el que se inoculan las microalgas y oscurecimiento de la parte inferior de dicho recipiente, que se mantiene durante los pasos d) y e).

10

8. Método de enriquecimiento de la relación 235U/238U para su uso industrial que incluye los siguientes pasos:

15

a) solubilización del U que no esté en forma soluble,

b) adición de medio de enriquecimiento para microalgas a la solución acuosa que contiene el U,

c) mantenimiento de la temperatura entre 1 y 47°C,

d) inoculación de microalgas definidas en cualquiera de las reivindicaciones 3-4,

20

e) sedimentación de las microalgas,

f) recuperación del U mediante lavado del cultivo con HCl, o bien mediante calcinación de la biomasa,

g) disolución en una nueva solución acuosa del U recuperado en el paso f),

h) repetición de los pasos b)-g) hasta obtener el enriquecimiento deseado,

25

momento en que el método se para en el paso f),

en el que el paso a) sólo se realiza cuando se parte de materiales sólidos con U.

9. Método según la reivindicación 8 en que la temperatura del paso c) es de 20°C.

30

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8-9 que incluye un paso i) de iluminación de la parte superior del recipiente en el que se inoculan las microalgas y oscurecimiento de la parte inferior de dicho recipiente, que se mantiene durante los pasos d) y e).

11. Uso de las microalgas definidas en cualquiera de las reivindicaciones 3-4 en biorremediación de aguas y/o suelos contaminados con uranio.
- 5 12. Uso de las microalgas definidas en cualquiera de las reivindicaciones 3-4 en el enriquecimiento de la relación  $^{235}\text{U}/^{238}\text{U}$  para obtener uranio enriquecido para uso industrial.

Fig. 1

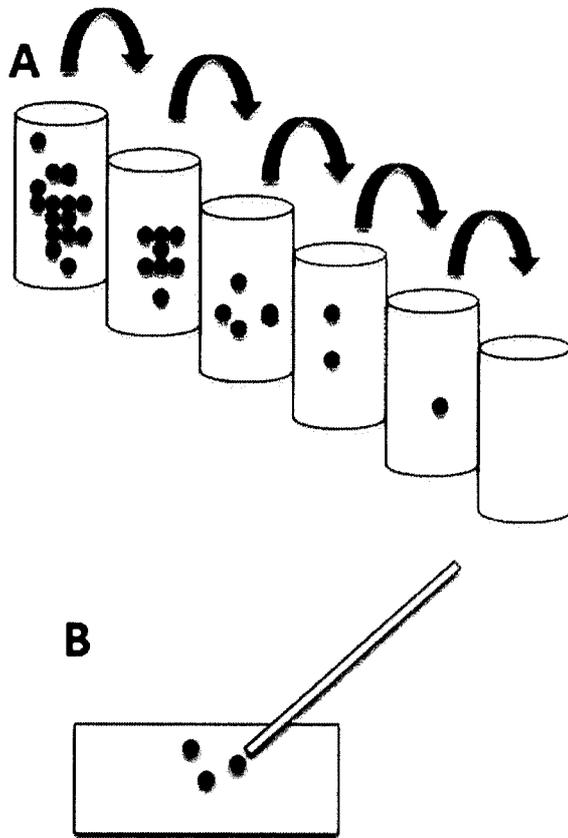


Fig. 2

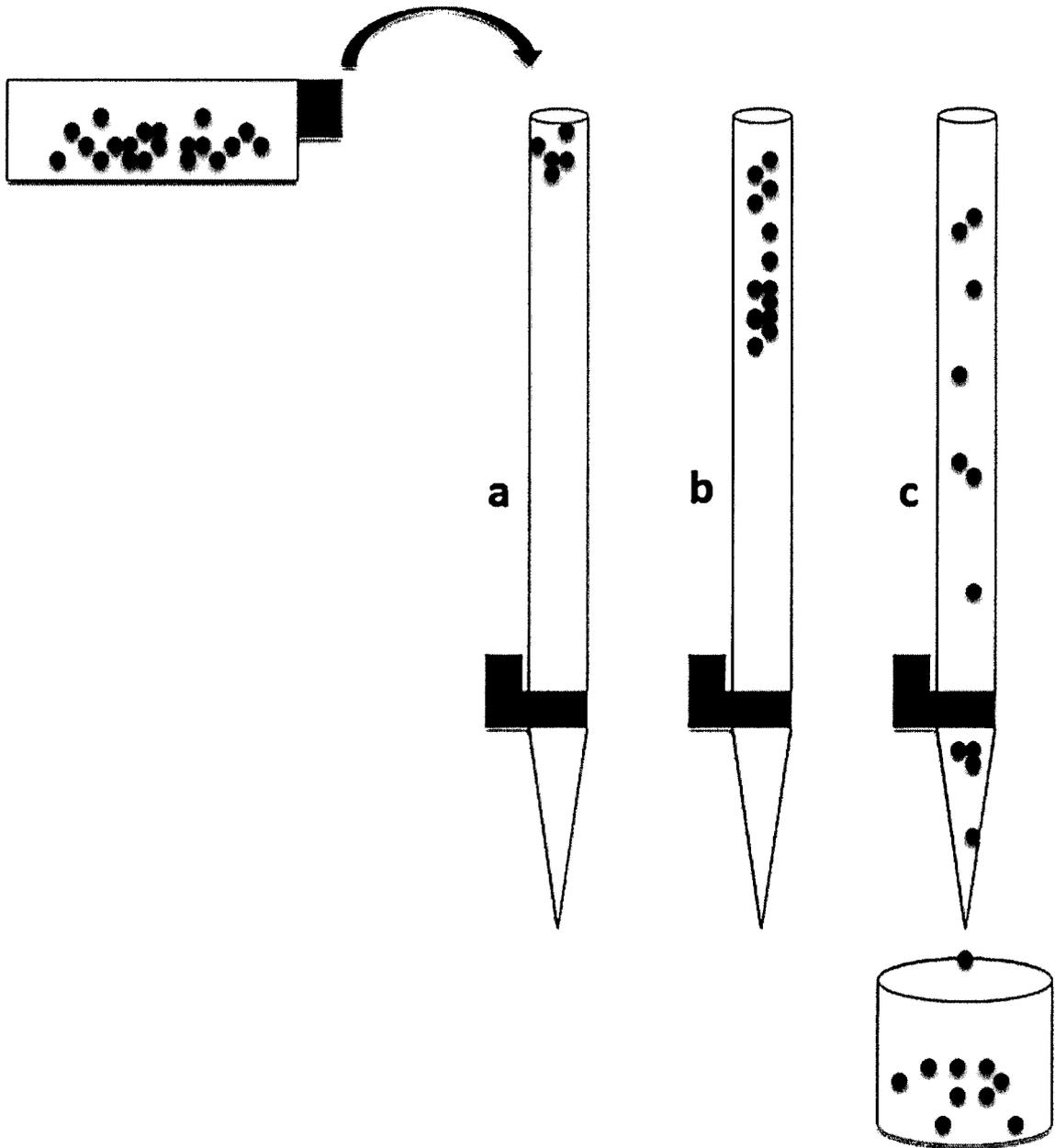
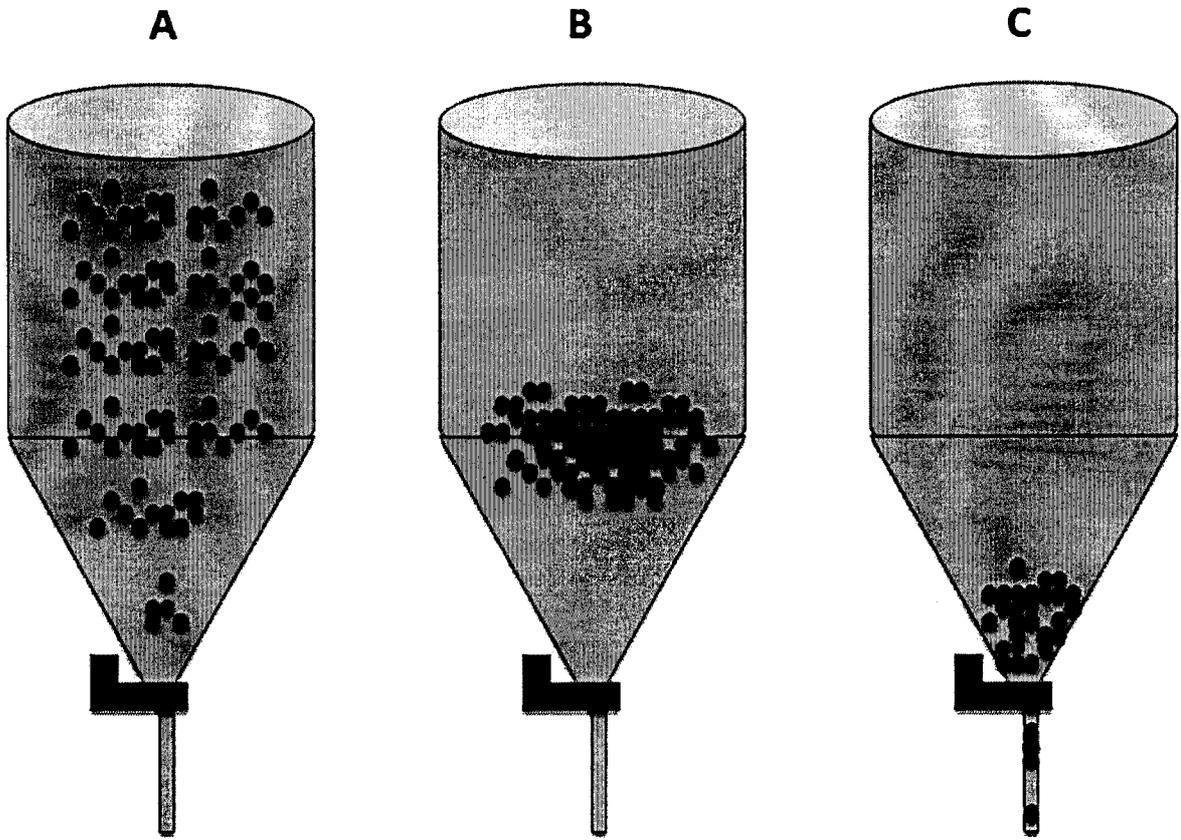


Fig. 3





21 N.º solicitud: 201201203

22 Fecha de presentación de la solicitud: 04.12.2012

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **G21F9/18** (2006.01)  
**C02F3/32** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	AMINI MALIHE et al. Characterization and Optimization of Uranium Adsorption using <i>Chlorella vulgaris</i> : A Tool in Management of Dangerous Effluents. <i>Journal of Biotechnology</i> . 2010 VOL: 150 No: Suppl. 1 Pags: S553-S554 ISSN 0168-1656 Doi: doi:10.1016/j.jbiotec.2010.10.007.	3,6-8,12
X	WO 2011098979 A2 (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE et al.) 18.08.2011, página 28.	3,12
X	MANIKANDAN N et al. Biosorption of uranium and thorium by Marine micro algae. <i>Indian Journal of Geo-Marine Sciences</i> . 2011 VOL: 40 No: 1 Pags: 121-124 ISSN 0379-5136, tabla 2.	3,12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
19.04.2013

Examinador  
I. Rueda Molíns

Página  
1/4

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

G21F, C02F

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 19.04.2013

#### Declaración

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1, 2, 4-11, 13	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 3, 12	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1, 2, 4, 5, 9-11, 13	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 3, 6-8, 12	<b>NO</b>

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

#### Base de la Opinión.-

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	AMINI MALIHE et al. Characterization and Optimization of Uranium Adsorption using <i>Chlorella vulgaris</i> : A Tool in Management of Dangerous Effluents. <i>Journal of Biotechnology</i> 11.2010 VOL: 150 No: Suppl. 1 Pags: S553-S554 ISSN 0168-1656 Doi: doi:10.1016/j.jbiotec.2010.10.007.	31.10.2010
D02	WO 2011098979 A2 (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE et al.)	18.08.2011
D03	MANIKANDAN N et al. Biosorption of uranium and thorium by Marine micro algae. <i>Indian Journal of Geo-Marine Sciences</i> 02.2011 VOL: 40 No: 1 Pags: 121-124 ISSN 0379-5136.	31.01.2011

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

**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986)**

En las reivindicaciones 1 y 2, de la solicitud de patente, se reivindica un método de mejora genética por selección artificial de microalgas, capaces de acumular activamente uranio en su interior. En ninguno de los documentos citados se ha encontrado un método como el reivindicado en la solicitud de patente. Por lo que, las reivindicaciones 1 y 2, presentan novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.

En la reivindicación número 3, de la solicitud de patente, se reivindica una microalga capaz de acumular activamente uranio. En las reivindicaciones 6-8, de la solicitud de patente, se reivindica un método de recuperación de uranio a partir de aguas y/o sólidos contaminados que emplea microalgas. En la reivindicación número 12 se reivindica el uso de estas microalgas en biorremediación de aguas y/o suelos contaminados con uranio.

El documento D01 divulga como *Chlorella vulgaris* puede acumular uranio procedente de aguas residuales, manteniendo a *C. vulgaris* a temperaturas comprendidas en un rango de 20-40°C. Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en el documento D01, las reivindicaciones 3 y 12 no presentan novedad, ni actividad inventiva y las reivindicaciones 6-8, presentan novedad, pero no actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6-8 de la Ley 11/1986.

El documento D02 muestra (en el ejemplo 5, de la página 28) la capacidad de *Coccomyxa actinabiotis* para acumular uranio. El documento D03 refleja (en la tabla 2) como la microalga *Isochrysis galbana* acumula uranio activamente. Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en cualquiera de los documentos D02 o D03, las reivindicaciones 3 y 12 no presentan novedad, ni actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.

En la reivindicación número 4 de la solicitud de patente se reivindica una microalga perteneciente a la especie *Chlamydomonas fonticola* capaz de acumular activamente uranio. En la reivindicación número 5 se reivindica un cultivo biológicamente puro de *Chlamydomonas fonticola*, con número de depósito BEA D04-12. Tal y como se describe en la solicitud de patente, este microorganismo es capaz de acumular activamente uranio en su interior. No se ha encontrado descrito en el Estado de la Técnica ninguna *Chlamydomonas fonticola* con esta propiedad. Por lo que, las reivindicaciones 4 y 5 de la solicitud de patente presentan novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.

En las reivindicaciones 9-11, de la solicitud de patente, se reivindica un método de enriquecimiento de uranio que emplea microalgas. En la reivindicación número 13 se reivindica el uso de microalgas para la obtención de uranio enriquecido. En el estado de la técnica no se ha encontrado ningún documento en el que se empleen microalgas para el enriquecimiento de uranio. Por tanto, las reivindicaciones 9-11 y 13 presentan novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.