

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 178**

51 Int. Cl.:

A01H 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2010 PCT/CZ2010/000035**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2011 WO2011107061**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2010 E 10729688 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2542049**

54 Título: **Algas de cepas planctónicas Parachlorella nurekis 1904 KIEG y su uso para exterminar cianobacterias, bacterias y hongos**

30 Prioridad:

04.03.2010 CZ 20100157

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

15.06.2017

73 Titular/es:

**CH+ LABS S.R.O. (100.0%)
Mattoliho 3274/7
106 00 Praha 10, CZ**

72 Inventor/es:

BOGDANOV, NIKOLAY

74 Agente/Representante:

CAMACHO PINA, Piedad

ES 2 617 178 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

Algas de cepas planctónicas *Parachlorella nurekis* 1904 KIEG y su uso para exterminar cianobacterias, bacterias y hongos

5

Campo de la invención

La invención refiere a la cepa de un alga verde unicelular, *Parachlorella nurekis* 1904 KIEG, que está diseñada para la producción de biomasa y la erradicación de cianobacterias (algas verdeazuladas) en embalses o depósitos de agua.

10

Antecedentes de la técnica

Existe una cepa bien conocida de alga verde unicelular, *Chlorella vulgaris* IFR C-111, caracterizada por una alta productividad que cumple los requisitos de cultivo industrial (patente RU 1751981).

15

La desventaja de *Chlorella vulgaris* IFR C-111 radica en la estacionalidad de su desarrollo (durante el período de mayo a diciembre), en los factores de demanda del contenido de medio nutritivo, en el ciclo permanente del desarrollo de las células y en el estrecho intervalo de temperaturas de cultivo (26-36°C).

20

Existe una cepa conocida de algas verdes unicelulares, *Chlorella vulgaris* BIN, con un amplio intervalo de temperaturas aceptables para el cultivo (20-40°C), que es exigente en el sustrato, presenta la capacidad de limpiar aguas residuales (patente RU 2192459) y se aplica en la rehabilitación biológica de depósitos de agua (Bogdanov, 2008).

25

La desventaja de la cepa *Chlorella vulgaris* BIN es la ausencia de reproducción estacional en depósitos naturales, lo que complica su aplicación en diferentes zonas climáticas. El mantenimiento deficiente de la vitalidad en depósitos de agua en un intervalo de temperatura de 0 a 16°C requiere el tratamiento repetido del depósito por las algas. La capacidad de adaptación deficiente a las condiciones naturales del depósito requiere la adaptación adicional de la cepa. Otra deficiencia de *Chlorella vulgaris* BIN es el estrecho intervalo de adaptación, sólo a determinadas aguas residuales.

30

El objetivo de la invención es crear una nueva cepa de algas verdes unicelulares, *Parachlorella nurekis* 1904 KIEG, que se diferenciará por una mayor productividad, reproducción estacional en embalses naturales y vitalidad en los intervalos de temperatura de 0 a 16°C y presentará la capacidad de adaptarse a las condiciones naturales en diferentes zonas climáticas y erradicará cianobacterias en embalses o depósitos de agua.

35

Descripción de la invención

40

Las algas verdes unicelulares son capaces de eliminar las desventajas mencionadas anteriormente de las cepas anteriores. La cepa *Parachlorella nurekis* 1904 KIEG se cultivó basándose en *Chlorella vulgaris* BIN de la colección del Instituto de Investigación Agrícola de Penza, Academia de Agricultura de Rusia. Esta cepa se cultivó en agua de depósitos naturales de diferentes zonas climáticas. Como resultado final, se eligió la cepa transitoria, que es más adaptable y menos exigente en relación con el cultivo. Su aplicación demostró una alta flexibilidad respecto a depósitos de agua de diferentes zonas climáticas, también la capacidad de erradicar cianobacterias.

45

Medio: Para el cultivo de cepa *Parachlorella nurekis* 1904 KIEG se toman 11 partes de agua del grifo con una parte de medio nutritivo que contiene los siguientes cuatro componentes:

50

Medio nutritivo:

Componente 1: disolución nítrica-fosfórica - 0,3 ml

55

Componente 2: solución de sodio-ferrosa - 0,15 ml

Componente 3: disolución de cobre - cobalto - 0,2 ml

ES 2 617 178 T3

Componente 4: disolución de dióxido de carbono - 10 ml

5 Características morfológicas: Las nuevas células tienen una conformación ligeramente elipsoidal y un tamaño de 2-3 μm . Las células vegetativas adultas tienen 7-8 μm de diámetro. Las células con un diámetro de 8-10 μm con esporas autónomas ya formadas todavía están en la cápsula materna. Las nuevas células tienen paredes delgadas que gradualmente se hacen más gruesas. Cuando se liberan las esporas autónomas, el (lateral) se divide en 2-3 partes, que permanecen conectadas. (Una cinta ancha de cloroplasto y abierta cubre 3/4 de la superficie de la célula y se ajusta firmemente al lateral de la célula).
10 El pirenoide está rodeado por papel de almidón, que consiste en dos o tres hemisferios. La reproducción la proporcionan esporas autónomas. Las esporas tienen el mismo tamaño. La cantidad de esporas es cuatro, pocas veces dos y más. La cantidad es estrictamente par. La división de las células, la génesis y la liberación de esporas autónomas se produce durante todo el día sin una alineación estricta a una hora fija. Tanto las células nuevas como las maduras son de color verde oscuro.

15 Características de cultivo: Las células no se acumulan, sino que se distribuyen uniformemente en el volumen de la suspensión. Las paredes (vasculares) no crecen excesivamente. Las algas se cultivan y almacenan en el medio nutritivo líquido. Crecen bien con la aplicación del nitrato de amonio. Las algas requieren la alimentación de una disolución de dióxido de carbono producida a partir de celulosa.

20 Durante el cultivo las células prácticamente no se sedimentan. En el estado de reposo las células comienzan a sedimentarse en 5-10 días. El proceso de sedimentación se termina en un período de un mes.

25 El cultivo de la cepa no requiere mezclado automático.

Las condiciones de cultivo no (contienen) reproducción estacional. (En condiciones naturales la estacionalidad se expresa por lo demás mucho más). En condiciones de cultivo la cepa requiere un determinado medio nutritivo y el mantenimiento del curso biotecnológico de cultivo. Al aire libre el alga se adapta a las condiciones del embalse en el que se ha implementado.

30 *Parachlorella nurekis* 1904 KIEG elimina y provoca la descomposición de células y colonias de cianobacterias hasta su completa eliminación.

35 El ciclo de evolución de la cepa es inestable; las células se desarrollan de una forma asíncrona.

La cepa *Parachlorella nurekis* 1904 KIEG podría cultivarse en agua salada al 19%.

40 El cultivo de algas no requiere esterilidad. La cepa presenta la capacidad de crear las condiciones de monocultivo.

45 Características fisiológicas: La cepa es autótrofa; requiere alimentación de nitrógeno, principalmente de nitrato de amonio. Crece en la luz solar, también en las condiciones de iluminación artificial en depósitos abiertos con lámparas Osram Plantastar de 250 W. La luz penetra a través de una capa de 20 cm. La cepa tiene buenas propiedades de plancton, es decir, tiene capacidad de elevación y de igual distribución en el medio de cultivo.

50 Las células de algas vivas tienen cargas negativas. La pérdida de las cargas implica la coagulación de las células y su aglutinación. La capacidad de pegarse a las burbujas hidrogenadas se utiliza para la extracción de la biomasa del medio de cultivo por flotación eléctrica.

La temperatura óptima para el cultivo es de 28-30°C. En condiciones naturales el alga crece a la temperatura de 16-32°C, al mismo tiempo tiene mucha vitalidad en todos los embalses a temperaturas de desde 0 hasta 16°C.

55 El modo de iluminación corresponde a la continuación de la luz artificial de iluminación directa proporcionada por lámparas OSRAM PLANTASTAR de 250 W (la iluminación dura 10-12 horas). El

ES 2 617 178 T3

mínimo suficiente de iluminación son 8-10 horas, máximo 12-14 horas. La evolución de la cepa no depende de la estación o de la fuente de luz.

5 La cepa se comporta de manera antagonista frente a otras algas acuáticas, bacterias, hongos o levaduras en el medio de cultivo. Ninguna otra alga puede desarrollarse en presencia de esta cepa. Las bacterias mueren y se sedimentan.

10 La vitalidad de las células es de un mínimo de 30 años, si las condiciones de almacenamiento bajo luz dispersa y temperatura ambiental se mantienen para el cultivo.

En embalses naturales la cepa mata tres clases de bacterias cian (cianobacterias): *Aphanizomenon*, *Anabaena* y *Microcystis*. En condiciones del laboratorio, *Parachlorella nurekis* 1904 KIEG provoca la descomposición de las células y colonias de cianobacterias hasta su completa eliminación.

15 La cepa se caracteriza por una alta productividad (véase la tabla) y la capacidad de destruir la floración de algas que provocan cianobacterias y otras bacterias y hongos.

Breve descripción de las figuras

20 La invención puede explicarse mejor mediante fotografías:

La figura 1 muestra la cepa de *Chlorella vulgaris* a escala 1000x; figura 2 - supresión de cianobacterias (*Aphanizomenon flos-aquae*) por *Parachlorella nurekis* 1904 KIEG al principio del experimento: 1 experimental, 2 - prueba de control en placas de cristal (figura 2-6); figura 3 - supresión de cianobacterias (*Aphanizomenon flos-aquae*) por *Parachlorella nurekis* 1904 KIEG en tres horas; figura 4 - supresión de cianobacterias (*Aphanizomenon flos-aquae*) por *Parachlorella nurekis* 1904 KIEG en seis horas; figura 5 - supresión de cianobacterias (*Aphanizomenon flos-aquae*) por *Parachlorella nurekis* 1904 KIEG en nueve horas; y figura 6 - supresión de cianobacterias (*Aphanizomenon flos-aquae*) en doce horas.

30 Modo para llevar a cabo la invención

Ejemplo 1

Se toman muestras del embalse en floración con cianobacterias *Aphanizomenon flos-aquae*. Se filtran 100 ml de la muestra y se pesan; se extrae la biomasa (300 mg), y se pone en la placa de Petri, donde se añaden entonces 100 ml de suspensión de *Parachlorella* (biomasa 60 mg/100 ml). Se ponen 100 ml de la muestra de cianobacterias en la segunda placa de Petri. La primera placa de Petri es una experimental; la segunda es el control. Ambas placas deben mantenerse en luz dispersa y temperatura ambiental.

Al principio del experimento las colonias de cianobacterias son bien visibles en ambas placas. En tres horas las cianobacterias en la placa experimental se oscurecen más que en la de control. El proceso de descomposición de colonias comienza en la placa experimental en 6 horas. No hay cambios observados en la placa de control. En 9 horas las cianobacterias en la placa experimental pierden completamente su estructura. Parecen una unidad sin forma completa, más oscura que las cianobacterias en la placa de control. No hay cambios observados en la placa de control. En 12 horas la placa experimental no contiene rastros visibles de bacterias cian. La placa de control no muestra cambios.

Así, en 12 horas la suspensión de *Parachlorella* ha eliminado completamente la colonia de cianobacterias con una biomasa 5 veces mayor que la biomasa de *Parachlorella*.

Ejemplo 2

50 Se vierten 100 ml de muestra de agua de un embalse en floración (cianobacterias *Aphanizomenon flos-aquae*) dentro de dos matraces cónicos. La biomasa de cianobacterias asciende a 200 mg/100 ml de agua. Entonces se añaden 15 ml de suspensión de *Parachlorella nurekis* 1904 KIEG en el primer matraz. La biomasa de *Parachlorella* constituye 60 mg/100 ml. El primer matraz es experimental, el segundo es el control. Ambos matraces deben mantenerse en luz dispersa y temperatura ambiental (22°C).

55 Al principio del experimento las colonias de cianobacterias podían observarse bien en ambos matraces.

En 6 horas puede observarse que las cianobacterias en el matraz experimental se oscurecen más que en el control. Las cianobacterias en el matraz experimental pierden completamente su estructura en 12 horas. Parecen flóculos sin forma y son más oscuros que las cianobacterias en el matraz de control. No hay cambios observados en el matraz de control. El matraz experimental no contiene ningún rastro visible de bacterias cian en 20 horas.

En el plazo de 20 horas la suspensión de *Parachlorella* implementada en el entorno natural de cianobacterias ha eliminado totalmente la colonia de cianobacterias con una biomasa 20 veces mayor que la biomasa de la propia *Parachlorella*.

Las cianobacterias se eliminaron en el medio de *Parachlorella*, así como tras tratar el entorno de cianobacterias con la suspensión de *Parachlorella*. Al mismo tiempo la biomasa cianobacterias era varias veces mayor que la biomasa de *Parachlorella*.

Por lo tanto, la cepa de algas diseñada, *Parachlorella nurekis* 1904 KIEG, es más productiva contra otras cepas conocidas y es totalmente capaz de eliminar las cianobacterias que provocan la floración de algas. Por ejemplo, como resultado del uso de esta cepa en el embalse Tsimlyanskoye (Rusia), pudieron destruirse completamente las cianobacterias en el plazo de tres años (2006-2009).

Tabla

Índices comparativos de eficacia de cepas de <i>Chlorella vulgaris</i>			
Índice	Cepas de <i>Chlorella vulgaris</i>		
	IFR C-111 (RU 1751981)	BIN (RU 2192459)	<i>Parachlorella nurekis</i> 1904 KIEG (-)
Eficacia, g de biomasa seca / m ² por día	30	60-65	70
Temperatura óptima de cultivo, °C	26-36	20-40	28-30
Periodo de cultivo, meses	12	12	12

Aplicabilidad industrial

Parachlorella nurekis 1904 KIEG es una cepa altamente adaptable y poco exigente con respecto a las condiciones de cultivo. Su utilización ha demostrado alta flexibilidad en embalses de diversas zonas climáticas y su capacidad para matar cianobacterias.

REIVINDICACIONES

1. Cepa industrial de un alga verde unicelular, *Parachlorella nurekis* 1904 KIEG, depositada en la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos (CCAP) del Instituto Marino Escocés, Dunbeg, OBAN, Argyll, PA37 1QA, Escocia, Reino Unido, CCAP n.º 259/1.
2. Utilización de una cepa de un alga verde unicelular, *Parachlorella nurekis* 1904 KIEG, según la reivindicación 1, para la erradicación de cianobacterias en embalses o depósitos de agua.

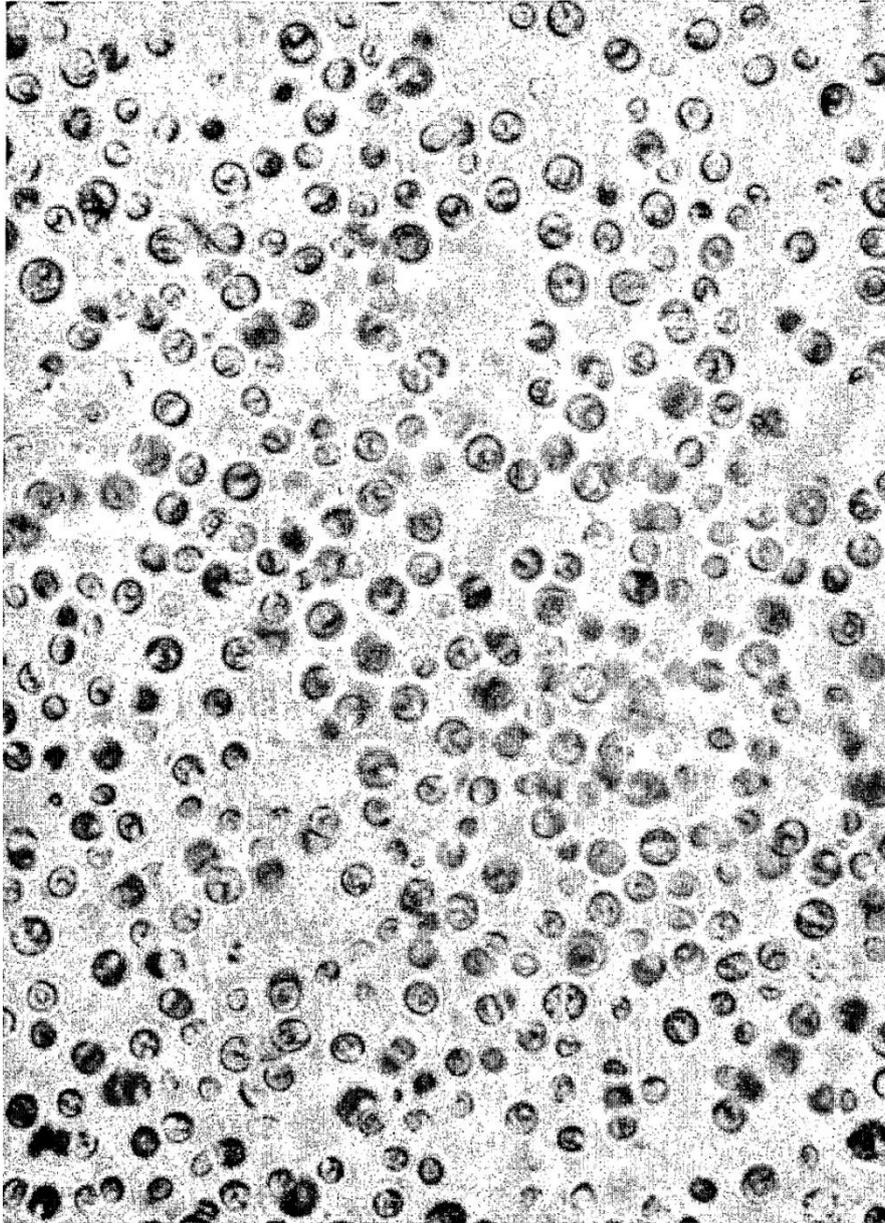


Fig. 1

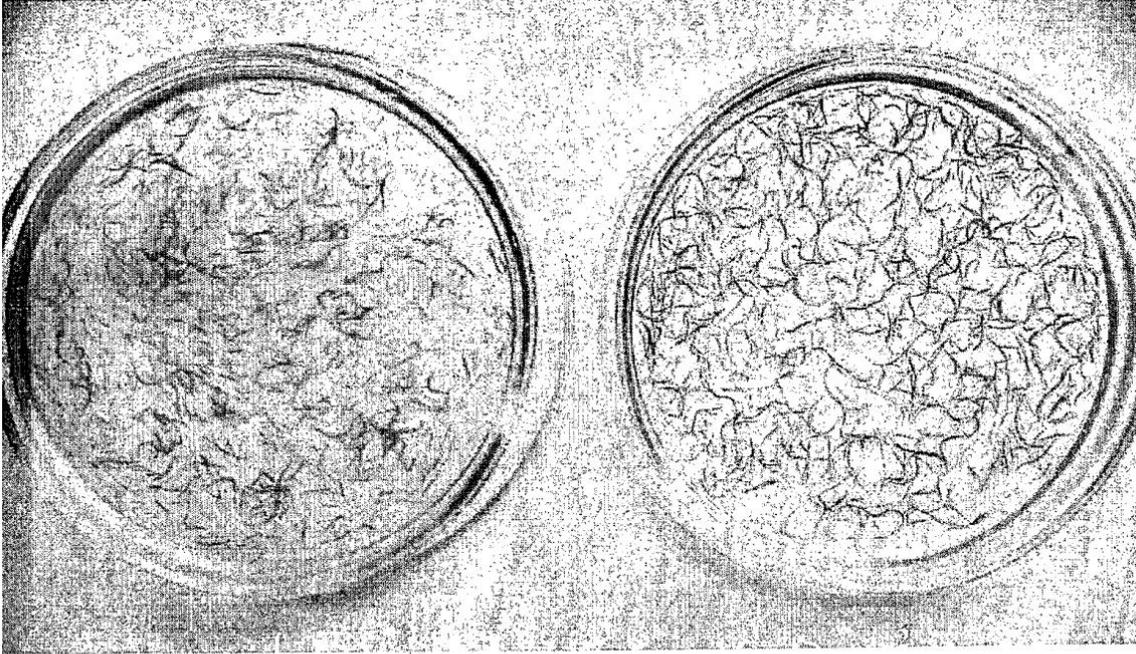


Fig. 2

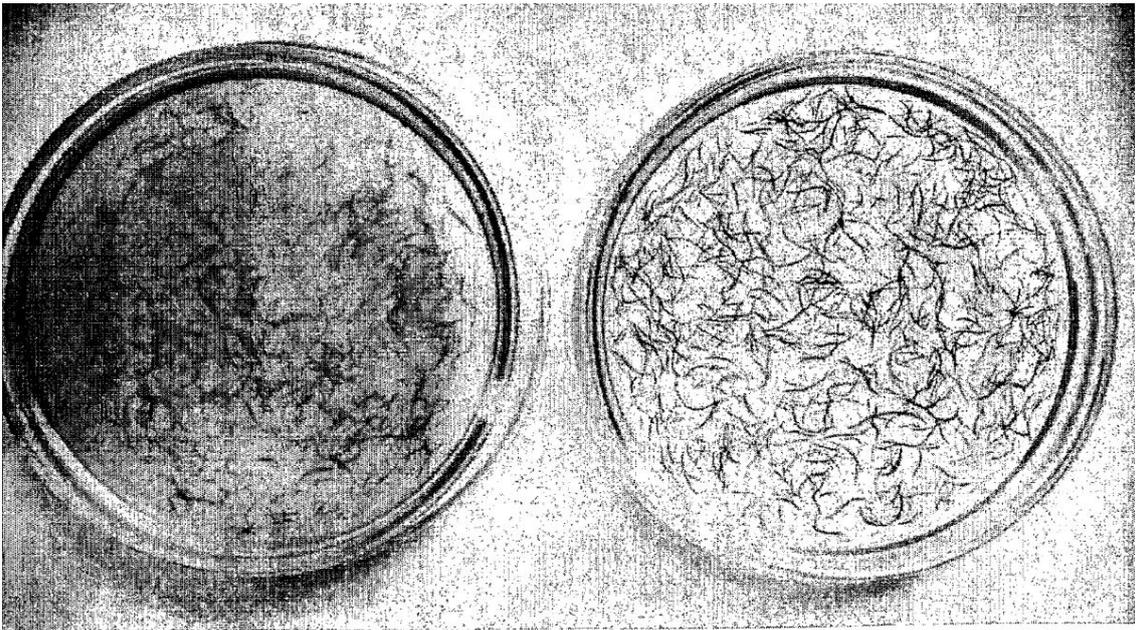


Fig. 3

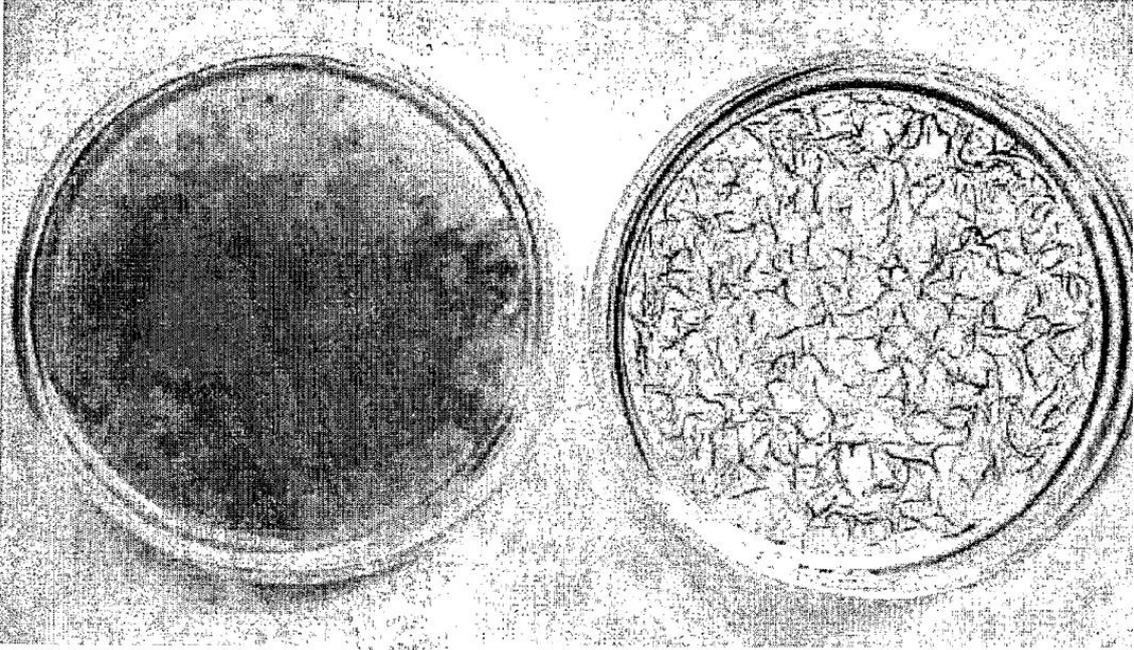


Fig. 4

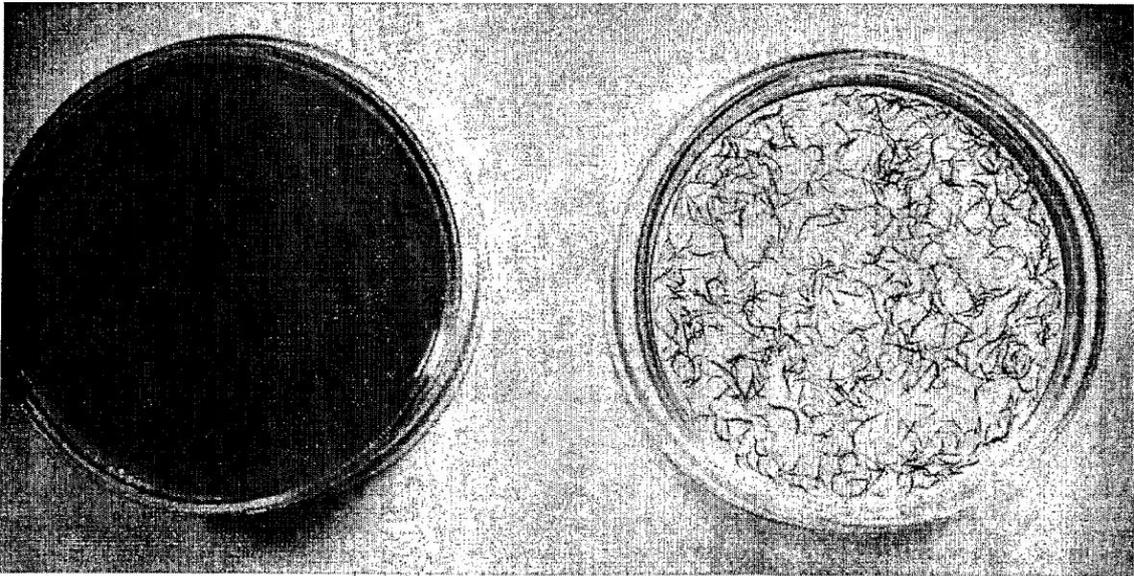


Fig.5

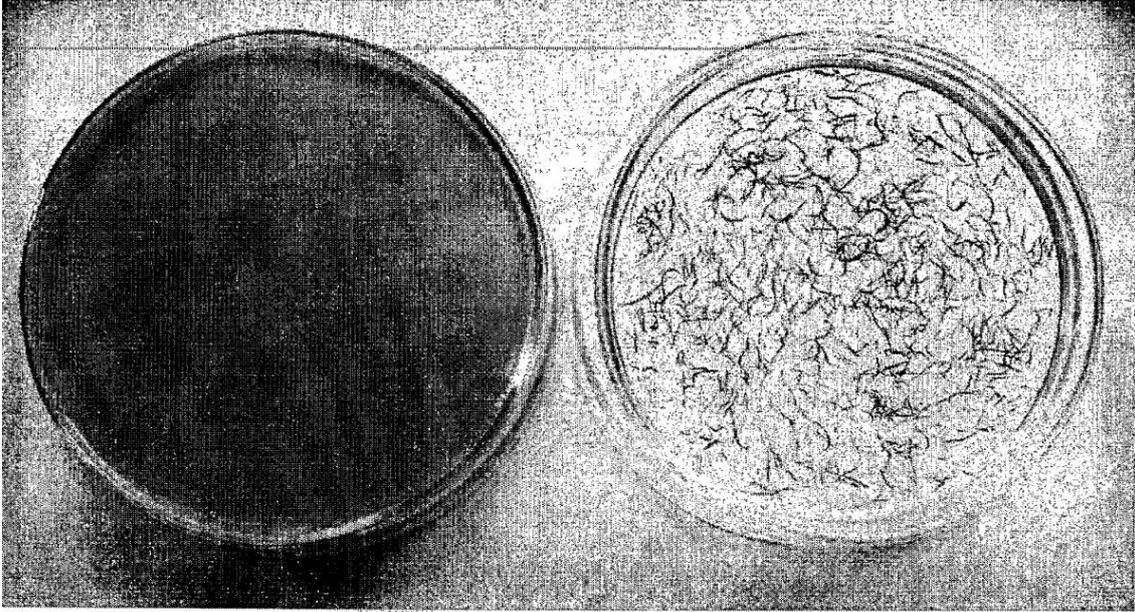


Fig. 6