(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 641 967**

(21) Número de solicitud: 201630622

(51) Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
B09C 1/10 (2006.01)
A62D 3/02 (2007.01)
C12R 1/38 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN B2

(22) Fecha de presentación:

13.05.2016

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

14.11.2017

Fecha de la concesión:

25.04.2018

(45) Fecha de publicación de la concesión:

04.05.2018

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA (100.0%)
Avenida Medina Azahara, 5
14071 CORDOBA (Córdoba) ES

(72) Inventor/es:

SÁEZ MELERO, Lara Paloma ;
BLANCO MORENO, Rafael ;
LUQUE ALMAGRO, , Víctor Manuel ;
MORENO VIVIÁN, Conrado y
ROLDÁN RUIZ, María Dolores

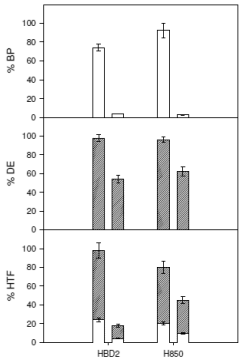
(74) Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

(54) Título: **BACTERIA DEGRADADORA DE HTF**

(57) Resumen:
Bacteria degradadora de HTF.
La presente invención se refiere a la bacteria Pseudomonas oleovorans HBD2 depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de acceso 8969, y al uso de la misma para la degradación del fluido calorportador HTF, ya sea en medios líquidos o en suelos contaminados por HTF o sus componentes químicos.

FIG.1



Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP 11/1986.

ES 2 641 967 B2

DESCRIPCIÓN

BACTERIA DEGRADADORA DE HTF

Campo de la invención

La presente invención se encuadra en el campo general de la biorremediación y en particular se refiere a *Pseudomonas oleovorans* HBD2, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) para su identificación y depósito con el código de acceso CECT 8969.

Estado de la técnica

Algunas centrales termosolares utilizan el fluido calorportador Dowtherm A (HTF) para transferir el calor desde las parábolas hasta las turbinas que generan la electricidad. Este fluido está compuesto por una mezcla eutéctica de bifenilo (26,5%) y óxido de bifenilo (73,5%); es un líquido altamente tóxico, viscoso, incoloro-amarillento y que presenta un punto de ebullición de 257 ºC.

En ocasiones las tuberías de las centrales pierden la hermeticidad como consecuencia de los cambios de temperatura durante la operación de la planta, produciéndose fugas en los codos de unión de las mismas, contaminando el suelo de las centrales.

Se conocen numerosos géneros bacterianos que tienen la capacidad de degradar el bifenilo (Fugihara et al., 2015; Draft genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* KF702 (NBRC110665), a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium isolated from biphenyl-contaminated soil. Genome Announc 3: e00517-15), mientras que el número de microorganismos que pueden utilizar el óxido de difenilo es reducido (Wang et al., 2015 Characterization of the molecular degradation mechanism of diphenyl ethers by *Cupriavidus* sp. WS. Environ Sci Pollut Res, DOI 10.1007/s11356-015-4854-3). En cuanto al fluido HTF, hasta el momento no se ha descrito ningún microorganismo que pueda degradar simultáneamente los dos compuestos orgánicos presentes en esta mezcla eutéctica.

A pesar de los avances que está habiendo en este campo en los últimos años, sigue existiendo la necesidad de proporcionar un método para la eliminación de los residuos contaminantes en las centrales termosolares y en las proximidades a las mismas.

Breve descripción de la invención

La presente invención soluciona los problemas descritos en el estado de la técnica puesto que se refiere al uso de un microorganismo que degrada el HTF de tal forma que proporciona un método de biorremediación de suelos contaminados con HTF.

Así pues en un primer aspecto la presente invención se refiere a una cepa de *Pseudomonas oleovorans HBD2* aislada y depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de acceso CECT 8969 (de aquí en adelante cepa de la presente invención).

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un cultivo puro bacteriano, y/o extracto y/o compuesto bioactivo que comprende la cepa de la presente invención.

En la presente invención por productos bioactivos se refiere a productos obtenidos a partir de la cepa de la presente invención, tanto sus componentes celulares como intracelulares tales como ADN, péptidos, etc. que confieren a la cepa de la presente invención, la actividad degradadora y/o tolerante al HTF.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende la cepa de la presente invención, o un cultivo puro, o un extracto o un compuesto bioactivo de la cepa de la presente invención (de aquí en adelante composición de la presente invención).

En un aspecto en particular, la composición de la presente invención es una composición biológica. En otro aspecto en particular, la composición biológica comprende vehículos y/o excipientes biológicamente aceptables.

En la presente invención por composición biológica se refiere a aquellas composiciones que incorporan la cepa de la presente invención, y/o el extracto, cultivo y/o compuestos bioactivos de la misma con al menos un vehículo y/o excipiente biológicamente aceptable. Los vehículos y/o excipientes biológicamente aceptables a utilizar en la presente invención son conocidos en el estado de la técnica para un experto en la materia.

En un aspecto en particular, la composición de la presente invención es una composición química. En otro aspecto en particular, la composición química comprende vehículos y/o excipientes biológicamente aceptables.

En la presente invención por composición química se refiere a aquellas composiciones que incorporan la cepa de la presente invención, y/o el extracto, cultivo y/o compuestos bioactivos de la misma con al menos un vehículo y/o excipiente químicamente aceptable. Los vehículos y/o excipientes químicamente aceptables a utilizar en la presente invención son conocidos en el estado de la técnica para un experto en la materia.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de la cepa de *Pseudomonas oleovorans HBD2* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de acceso CECT 8969 y/o al uso del extracto, cultivo y/o compuestos bioactivos de la cepa de

la presente invención y/o al uso de la composición de la presente invención para la degradación del fluido calorportador. En una realización en particular, es para la degradación de fluido calorportador y/o bifenilo. En otra realización en particular, es para la degradación de fluido calorportador y/o difenil éter.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de la cepa de *Pseudomonas oleovorans HBD2* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de acceso CECT 8969 y/o al uso del extracto, cultivo y/o compuestos bioactivos de la cepa de la presente invención y/o al uso de la composición de la presente invención para el tratamiento de biorremediación de suelos contaminados.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra el consumo de bifenilo (BP), difenil éter (DE) y el fluido calor transportador (HTF). La cepa de *Pseudomonas oleovorans* de la presente invención y *Cupriavidus necator* cepa H850 depositada en la CECT con el número 4424 se cultivaron aeróbicamente con amonio 10 mM como fuente de nitrógeno y BP (2 g L-1), DE (2 mL L-1) o HTF (2 mL L-1) como única fuente de carbono. La concentración de BP (barras vacías) y DE (barras rellenas) en el medio se determinó mediante GC/MS tras 1 o 5 días de cultivo (izquierda y derecha respectivamente para cada cepa). Los datos, que corresponden a la media de tres experimentos con su desviación estándar, se expresan como % respecto a la concentración inicial de cada compuesto.

La figura 2 muestra la tolerancia al fluido calorportador (HTF) por bacterias. La cepas bacterianas Pseudomonas oleovorans HBD2 de la presente invención y la bacteria degradadora de bifenilo Cupriavidus necator H850 se cultivaron aeróbicamente con amonio 10 mM como fuente de nitrógeno. Como única fuente de carbono se utilizó HTF a distintas concentraciones: 50000 ppm (50 mL L-1; cuadrados), 100000 ppm (100 mL L-1; triángulos) o 150000 ppm (150 mL L-1; círculos). A los tiempos indicados se determinó el crecimiento bacteriano (A600, símbolos rellenos) y la concentración de amonio (símbolos vacíos). Los datos corresponden a la media de tres experimentos con su desviación estándar.

Descripción detallada de la invención

Los inventores de la presente invención han conseguido identificar una nueva cepa bacteriana, *Pseudomonas oleovorans* HBD2, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de acceso CECT 8969 que posee actividades biológicas novedosas con respecto a otras bacterias puesto que hasta la fecha no se ha descrito ningún microorganismo con actividad degradadora de HTF, es decir que degrade

simultáneamente los dos compuestos orgánicos presentes en esta mezcla eutéctica. Esta actividad degradadora de HTF se ha analizado por comparación con *Cupriavidus necator* H850 depositada en la CECT con el número 4424, bacteria degradadora de difenilo y *Sphingomonas* sp.SS3, cepa degradadora de difenil éter. Además se comprobó la tolerancia de *Pseudomonas oleovorans* HBD2 CECT 8969 al HTF.

A partir de la rizosfera de plantas de la central termosolar “La Africana” (Córdoba, España), mediante técnicas de enriquecimiento, se aisló e identificó la estirpe *Pseudomonas oleovorans* HBD2, depositada en el Colección Española de Cultivos Tipo con el código de acceso CECT 8969.

Las células se inocularon en matraces de 50 mL de capacidad, con 10 mL de medio M9 (Sambrook y Russel, 2001 Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001), a pH 7, y se incubaron en aerobiosis en un agitador orbital termostatizado a 30℃ y 220 rpm. La fuente de nitrógeno empleada fue cloruro de amonio 10 mM y como única fuente de carbono se utilizó bifenilo, bifenil éter, o HTF (2000 ppm). Los matraces se sellaron con parafina y se incubaron a 30ºC en agitador a 220 rpm.

Para el enriquecimiento bacteriano, una vez por semana durante un mes se tomaron alícuotas del cultivo y se transfirieron a matraces que contenían 9 ml de medio fresco con las mismas fuentes de carbono y nitrógeno y se incubaron con las mismas condiciones que el cultivo inicial.

Finalmente se tomaron alícuotas de los cutivos con turbidez (que indicaba el crecimiento bacteriano), luego se pasaron a placas de medio LB con HTF para obtener las colonias individuales. El mantenimiento de la estirpe bacteriana se realizó tomando 750 µl de un cultivo puro en medio LB líquido y añadiendo 250 µl de glicerol al 80 % (v/v), y posteriormente se almacenó a - 80 ºC.

Determinación del crecimiento bacteriano

Las bacterias *Pseudomonas oleovorans* HBD2, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de acceso CECT 8969, *Cupriavidus necator* H850 y *Sphingomonas* sp.SS3, se cultivaron a 30ºC en medio LB o en medio M9 que contenía cloruro amónico (10 mM) como fuente de nitrógeno y BF, DE o HTF (2 000 ppm) como única fuente de carbono.

Para medir la tolerancia al HTF, se utilizaron 50, 100 o 150 ml de fluido calorportador HTF (50000, 100000 o 150000 ppm respectivamente). El crecimiento bacteriano se determinó por diferentes métodos incluyendo la monitorización de la absorbancia de los cultivos a 600 nm (A_{600}), mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (C.F.U.) y por determinación de la concentración de proteínas en células enteras por el método de Lorry modificado (Shakir et al., 1994. A rapid protein determination by modification of the Lowry procedure. Anal. Biochem. 216:232-233).

Determinaciones químicas y analíticas

Para cuantificar el consumo de BF, DE y HTF se determinó su concentración en los medios de cultivo. Como control se usaron medios idénticos en composición que no habían sido inoculados con las bacterias. En cada caso, se realizó una extracción líquido-líquido del sobrenadante de los cultivos con cloroformo 1/10 y se analizó mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas acoplada a una Trampa de Iones Varian-Sarturno 2200. Las condiciones experimentales fueron las siguientes: inyección a 275ºC, con helio como gas portador a un flujo constante de 1ml/min, inicialmente se realizó un gradiente de temperatura desde 65 ºC (se mantuvo durante 0,5 minutos), incrementando 8 ºC por minuto hasta alcanzar 180 ºC (se mantuvo 0,1 min). Posteriormente, se alcanzaron 300 ºC mediante la aplicación de un gradiente de 25 ºC por minuto y se mantuvieron 300 ºC durante 2 min. El volumen de la muestra inyectada fue 1µl. La detección mediante análisis por Espectrometría de Masas se llevó a cabo mediante ion Full Scan entre m/z 50 y 275 (0,5 s/scan) y 70 eV.

Para detectar la presencia de la enzima 2,3-dihidroxibifenil dioxigenasa (BphC), se pulverizaron las placas de medio sólido que contenían las colonias de bacterias con una solución de dihidroxibifenilo 0,1% (p/v) y acetona al 10% (v/v), como se describe en Wagner-Döbler et al., 1998 Microcosm enrichment of biphenyl-degrading microbial communities from soils and sediments. Appl Environ Microbiol 1998; 64:3014-22. La aparición del color amarillo transcurridos varios minutos indicó la formación de ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-hexafenil-2,4-dienóico (HOPDA).

Los productos de reacción (bifenilo, difenil éter y demás, fueron comprados en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El HTF se obtuvo de la compañía MAGTEL, S.L que es la empresa que gestiona la planta termosolar.

En las condiciones experimentales previamente descritas, se demostró que *Pseudomonas oleovorans* HBD2 degradó la mezcla eutéctica, con un consumo de casi un 85% de HTF

después de 5 días de cultivo (Fig.2). Esta bacteria además degrada de forma independiente los compuestos químicos BP y DE, aunque de forma más eficientemente el BP que el DE cuando se cultiva con cada uno de estos compuestos como la única fuente de carbono, quedando solo un 5% de PB pero más del 50% de DE después de 5 días de cultivo (Fig.1). Por el contrario, la cepa bacteriana Cupriavidus necator H850, que podía degradar un 95% de BP y un 40% de DE después de 5 días, en la mezcla del HTF sólo degrada un 45% DE y un 40% BP a los 5 días de cultivo. Aunque, se demostró también que la cepa H850 era tolerante a altas concentraciones de HTF (Fig. 2)

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Pseudomonas oleovorans HBD2* aislada y depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de acceso CECT 8969.

2. Cultivo puro bacteriano, extracto o compuesto bioactivo que comprende la cepa de *Pseudomonas oleovorans HBD2* de la reivindicación 1.

3. Composición que comprende la cepa de *Pseudomonas oleovorans HBD2* según la reivindicación 1, o un cultivo puro, extracto o compuesto bioactivo según la reivindicación 2.

4. Composición según la reivindicación 3, donde dicha composición es una composición biológica.

5. Composición según la reivindicación 4, que comprende al menos un vehículo y/o un excipiente biológicamente aceptable.

6. Composición según la reivindicación 3, donde dicha composición es una composición química.

7. Composición según la reivindicación 6, que comprende al menos un vehículo y/o un excipiente químicamente aceptable.

8. Uso de la cepa de *Pseudomonas oleovorans HBD2* según la reivindicación 1, o de un cultivo puro bacteriano, extracto o compuesto bioactivo según la reivindicación 2 o de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 3-7, para la degradación del fluido calorportador.

9. Uso según la reivindicación 8, para la degradación de bifenilo.

10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 8-9 para la degradación de difenil éter.

11. Uso de la cepa de Pseudomonas oleovorans HBD2 según la reivindicación 1, o de un cultivo puro bacteriano, extracto o compuesto bioactivo según la reivindicación 2 o de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 3-7 para el tratamiento de biorremediación de suelos contaminados.

FIG.1

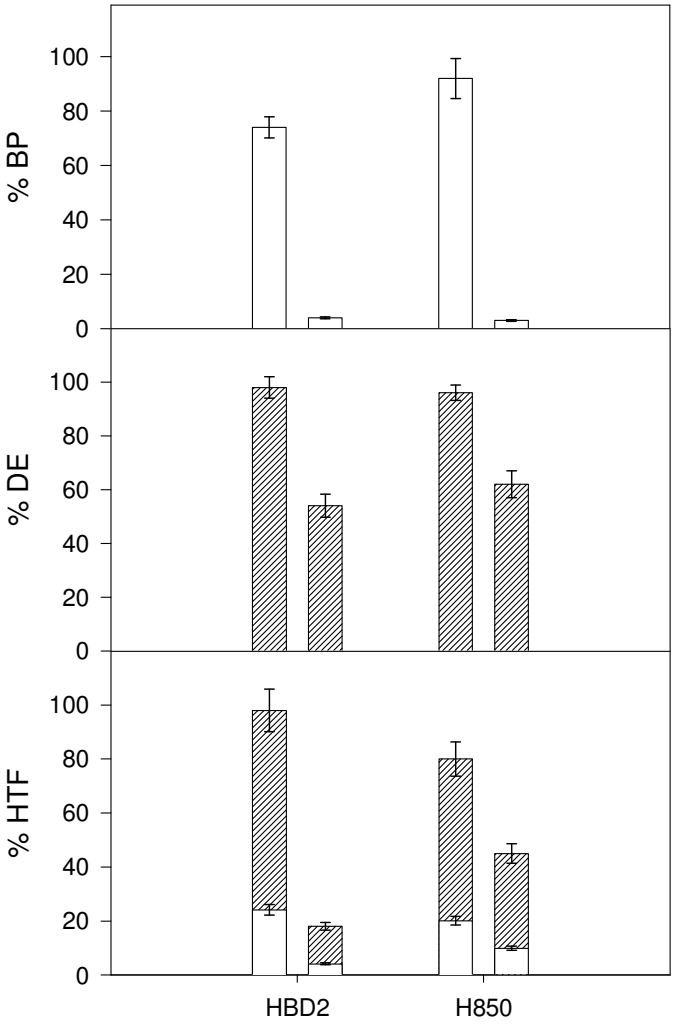
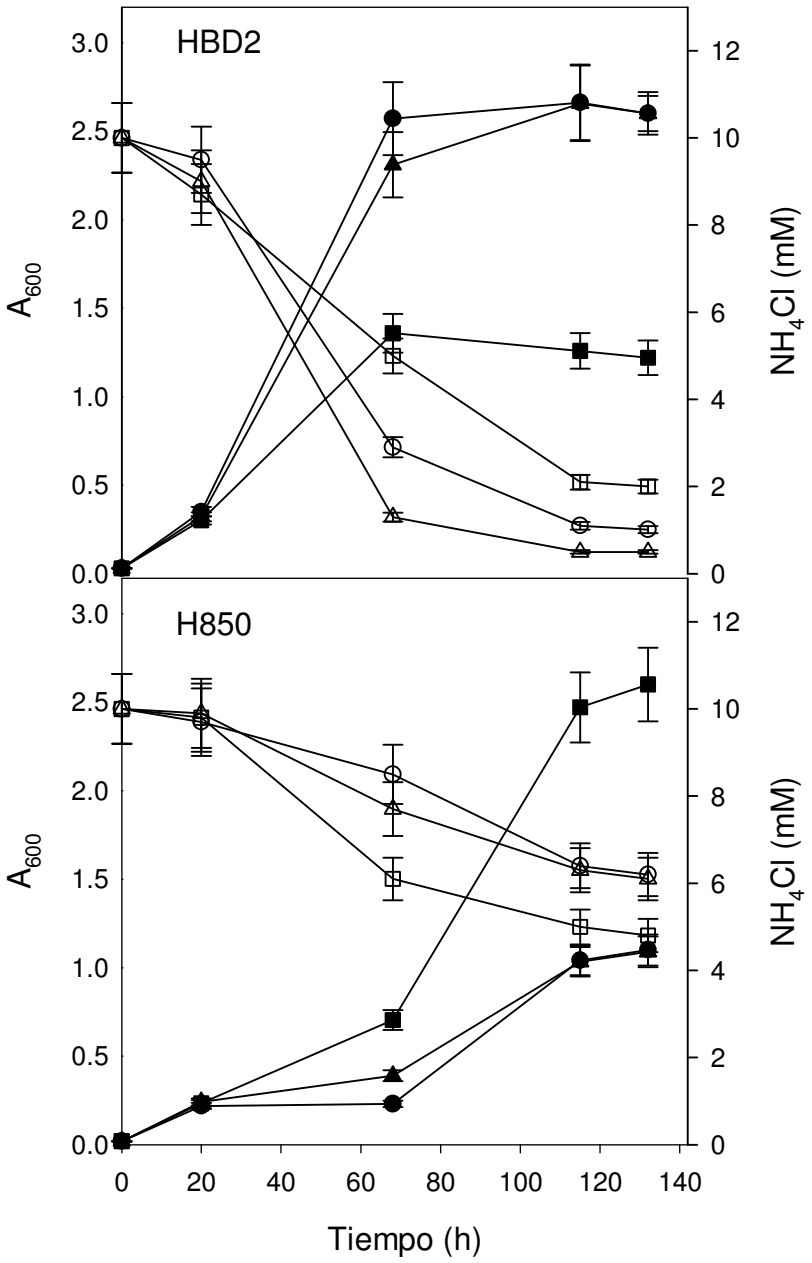


FIG.2


HBD2
H850
A_{600}
NH_4Cl (mM)
Tiempo (h)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
0
2
4
6
8
10
12
0
20
40
60
80
100
120
140

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201630622

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 13.05.2016

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HICKS P. et al. In situ bioremedation of biphenyl and biphenyl ether. WEFTEC 2000, Annual Conference & Exposition on Water Quality and Wastewater Treatment, 73rd, Anaheim, CA, United States, Oct. 14-18, 2000, Páginas 1741-1753.	1-11
A	Biotecnología aplicada en la biorremedación de un suelo afectado por un vertido de fluido térmico mediante la formación de biopilas dinámicas. 09/06/2014. [en línea] [Recuperado el 16/10/2017]. Recuperado de Internet. http://www.kepler.es/es/noticias.php?id_noticia=34	1-11
A	US 2003148501 A1 (PICARDAL FLYNN W et al.) 07/08/2003, Todo el documento.	1-11
A	US 4664805 A (FOCHT DENNIS D) 12/05/1987, Todo el documento.	1-11
A	WANG, S. et al. Characterization of the molecular degradation mechanism of diphenyl ethers by *Cupriavidus* sp. WS. Envirom. Sci. Pollut. Res. 25/06/2015 [enlínea] [Recuperado el 16/10/2017]. Recuperado de Internet. https://www.researchgate.net/publication/279307367_Characterization_of_the_molecular_degradation_mechanism_of_diphenyl_ethers_by_Cupriavidus_sp_WS	1-11
A	SCHMIDT S. et al. Biodegradation of diphenyl ether and its monohalogenated derivatives by *Sphingomonas* sp. strain SS3. Applied and Environmental Microbiology, 1992, vol. 58, Nº 9, [en línea] [Recuperado el 16/10/2017]. Recuperado de Internet. http://pubmedcentralcanada.ca/pmcc/articles/PMC183002/pdf/aem00050-0048.pdf Páginas 2744-2750.	1-11

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	Examinador	Página
16.10.2017	A. I. Polo Diez	1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/20 (2006.01)
B09C1/10 (2006.01)
A62D3/02 (2007.01)
C12R1/38 (2006.01)

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

C12N, C12R, B09C

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, INTERNET, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.10.2017

Declaración

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

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	HICKS P. et al. In situ bioremedation of biphenyl and biphenyl ether.	2000
D02	Biotecnología aplicada en la biorremedación de un suelo afectado por un vertido de fluido térmico mediante la formación de biopilas dinámicas.	09.06.2014
D03	US 2003148501 A1 (PICARDAL FLYNN W et al.)	07.08.2003
D04	US 4664805 A (FOCHT DENNIS D)	12.05.1987
D05	Wang, S. et al. Characterization of the molecular degradation mechanism of diphenyl ethers by *Cupriavidus* sp. WS.	25.06.2015
D06	Schmidt S. et al. Biodegradation of diphenyl ether and its monohalogenated derivatives by *Sphingomonas* sp. STRAIN SS3.	1992

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

El documento D01 divulga la degradación biológica in situ de restos de fluido caloportador (Dowtherm) de alto contenido en bifenilo y difenil éter. La degradación de estos compuestos se lleva a cabo en condiciones de aerobiosis con cepas bacterianas de las especies *Pseudomonas cruciviae*, *Burkholderia cepacia* y *Mycobacterium chlorophenolicus.*

El documento D02 describe la biorremedación de un suelo afectado por un vertido de fluido térmico mediante biopilas dinámicas, en las que se utilizan colecciones de cepas aisladas del suelo contaminado, pero no se menciona en el documento a qué especies pertenecen las cepas utilizadas.

En el documento D03 se usan 4 cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Alcaligenes*, capaces de crecer con bifenilo, para degradar policlorinatos de bifenilo (PCB) (tabla 2)

El documento D04 menciona una cepa de *Acinetobacter* que crece en presencia de bifenilo (columna 6, línea 13-29)

Por último, los documentos D05 y D06 se refieren a cepas de las especies *Cupriavidus* sp. y de *Sphingomonas* sp. capaces de degradar difenil éter.

Novedad y actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 de L.P. 11/1986)

En ningún documento del estado de la técnica se ha divulgado un microorganismo de la especie *Pseudomonas oleovorans* con el mismo número de depósito que el que figura en la reivindicación 1, por lo que, la cepa de esa especie con ese número de depósito, se considera nueva.

Cualquiera de los documentos D01 a D06 puede considerarse el documento más cercano del estado de la técnica, puesto que en estos documentos se trata de resolver el mismo problema técnico, es decir, obtener una cepa capaz de degradar fluidos caloportantes o los productos que lo componen (bifenilo, éter de difenilo, etc.)

Sin embargo, ninguno de los microorganismos mencionados en estos documentos pertenece a la especie *Pseudomonas oleovorans*. El problema técnico a resolver por el solicitante se considera, por lo tanto, encontrar una cepa alternativa a las ya existentes para la degradación de los fluidos caloportadores ricos en bifenilo y éter de difenilo.

A la vista del estado de la técnica, no sería evidente para un experto en la materia utilizar una cepa de esta especie para la biorremedación de fluidos caloportadores.

Por lo tanto, la reivindicación de la cepa de *Pseudomonas oleovorans*, objeto de la primera invención, cumple también el requisito de actividad inventiva.

En conclusión, la reivindicación 1, referida a la cepa de *Pseudomonas oleovorans* con número de depósito CECT 8969, cumple el requisito de novedad y de actividad inventiva. De la misma manera, son nuevas y con actividad inventiva las reivindicaciones 2 a 7 que se refieren a cultivos o composiciones que contienen dicha cepa y los usos de la misma de las reivindicaciones 8 a 11.

En resumen, todas las reivindicaciones 1 a 11 satisfacen los requisitos de patentabilidad (art. 4.1 de la L.P de 11/1986).