

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 338**

21 Número de solicitud: 201601101

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C02F 3/34 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.12.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.06.2018

71 Solicitantes:

UNIVERSIDADE DE VIGO (100.0%)
Campus Universitario s/n
36310 Vigo (Pontevedra) ES

72 Inventor/es:

PÉREZ PAZ, Alicia y
DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ, José Manuel

54 Título: **Cepa bacteriana bacillus y procedimiento para la eliminación de compuestos coloreados y materia orgánica en aguas residuales**

57 Resumen:

La presente invención comprende una cepa bacteriana designada como Bacillus aryabhatai DC100 (CECT 9226), para la eliminación de compuestos coloreados y materia orgánica en aguas residuales y/o efluentes. La invención también se refiere a un procedimiento que comprende las siguientes etapas: producción del inóculo de la cepa Bacillus aryabhatai DC100 (CECT 9226), caracterización y en caso de ser necesario suplementación del agua residual y/o efluente a tratar, y finalmente el tratamiento biológica del mismo por la cepa bacteriana obtenida previamente. Este procedimiento permite la decoloración completa de compuestos coloreados preferentemente tipo trifenilmetano e indigotina, así como reducciones de la materia orgánica disuelta o en suspensión presente en aguas y/o efluentes de industrias que llevan a cabo algún proceso de tinción o de coloración, como son la textil, papelera, cosmética, farmacéutica y/o alimentarias.

ES 2 674 338 A1

DESCRIPCIÓN

CEPA BACTERIANA BACILLUS Y PROCEDIMIENTO PARA LA ELIMINACIÓN DE COMPUESTOS COLOREADOS Y MATERIA ORGÁNICA EN AGUAS RESIDUALES

SECTOR DE LA TÉCNICA

5

La presente invención consiste en un procedimiento biológico para la eliminación de compuestos coloreados y de la materia orgánica presente en aguas residuales y efluentes procedente de las actividades de la industria textil, papelera, cosmética, farmacéutica y/o alimentaria. Este proceso es susceptible de ser usado por empresas especializadas en el tratamiento de aguas y efluentes residuales anteriormente mencionadas.

10

GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

15

Los términos y abreviaturas empleadas en la presente invención, tienen el siguiente significado.

- Pigmento: Sustancia biodegradable presente en la naturaleza, que se puede extraer de plantas, insectos y/o minerales, y que presenta la capacidad de colorear/teñir materiales.

20

- Colorante: Compuesto coloreado sintético no biodegradable y altamente tóxico en disolución, creado de forma artificial para la tinción de materiales.

- Compuesto coloreado: En la presente invención se refiere a una sustancia que confiere color, pudiendo ser un pigmento o colorante.

25

- Aguas residuales: Aguas provenientes de actividades industriales, no aptas para consumo humano. En la presente invención, fundamentalmente aquellas aguas residuales que presenten compuestos coloreados y materia orgánica disuelta.

- Efluentes: En la presente invención, residuos líquidos o semilíquidos provenientes de industrias que lleven a cabo procesos de tinción o coloración.

30

- DQO: Abreviatura de demanda química de oxígeno. Parámetro que indica la cantidad de sustancias (materia orgánica disuelta o en suspensión) presentes en una muestra líquida y que son susceptibles de ser oxidadas. Permite determinar el grado de contaminación y se expresa en miligramos de Oxígeno diatómico por litro (mgO₂/L).

35

- Especie: Conjunto de poblaciones o cepas bacterianas, que presentan un elevado grado de semejanza morfológica y fenotípica, pero que son claramente diferenciables de otras cepa bacterianas.

- Cepa bacteriana: Conjunto de células homogéneas proveniente de la reproducción de una única célula inicial (seleccionada y aislada).
 - Cultivo puro: Multiplicación de una única cepa bacteriana.
 - Cultivo mixto: Multiplicación de diferentes cepas bacterianas, no necesariamente de la misma especie.
- 5
- Inóculo: Cantidad de cultivo puro tomada para la realización preferente del procedimiento establecido en la presente invención.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El empleo de compuestos coloreados con fines estéticos y/o comunicativos se ha llevado a cabo desde tiempos prehistóricos. Antiguamente se empleaban pigmentos obtenidos de fuentes naturales como plantas, insectos y/o minerales, pero su extracción y producción era costosa y, con el paso del tiempo, ineficiente para abastecer toda la demanda. Con el posterior desarrollo de los colorantes sintéticos, mucho más estables que los naturales, la reducción de los costes de producción fue notable. Sin embargo, estas ventajas económicas llevaban implícitas una serie de aspectos negativos sobre el medioambiente y la salud humana.

20

Un colorante, aunque sea en muy baja concentración, se considera tóxico o peligroso por varias causas. En primer lugar, su vertido incontrolado al medioambiente puede causar mortalidad de la fauna y flora existente, bien por inhibición de la fotosíntesis en el caso de organismos autótrofos, o bien por toxicidad. En segundo lugar, al no ser fácilmente biodegradables su digestión anaeróbica puede generar aminas aromáticas altamente tóxicas, cancerígenas y mutagénicas. En tercer lugar, son numerosos los casos de alergias e intolerancias humanas a estos compuestos coloreados sintéticos.

25

Además de esta problemática, las aguas residuales de las industrias que llevan a cabo algún proceso de tinción o de coloración, suelen contener otro tipo de sustancias, transformándose en efluentes mucho más complejos y tóxicos. Tomando como ejemplo una industria textil, de forma general sus efluentes están constituidos por una cantidad de colorante residual (10-200 mg/L) y por compuestos auxiliares como sales, detergentes y aceites que ayudan a su fijación. Por tanto, aparte de ser visualmente antiestéticos o indeseables, son altamente alcalinos y salinos, presentando sólidos en

30

35

suspensión procedentes del propio material a teñir. Esto conlleva la necesidad de

tratamientos específicos antes de su vertido, suponiendo un coste extra para las empresas al requerir tecnología adicional o bien al contratar empresas externas especializadas.

- 5 Generalmente los tratamientos se clasifican en químicos, físicos y biológicos, primando el empleo de los 2 primeros frente al tercero. Las desventajas que presentan los tratamientos físicos y/o químicos es que suponen una inversión económica alta, suelen ser específicos para un determinado tipo de compuestos y además generan residuos que siguen siendo necesario tratar. Los tratamientos biológicos, presentan la desventaja
10 de requerir un mayor tiempo para su actuación, pero son procedimientos mucho más limpios y económicos.

La normativa Española en consonancia con la Europea marca ciertos parámetros principales a tener en cuenta antes de permitir el vertido directo o indirecto (C. Hessel
15 *et al.* 2007. *Journal of Environmental Management*. 83 171–180). Algunos de ellos son: la demanda biológica de oxígeno (DBO), la demanda química de Oxígeno (DQO), los sólidos en suspensión, la salinidad, el color, la presencia de aceites y metales pesados. Sin embargo, si los vertidos no se realizan directamente al cauce público, la concentración de cada uno de ellos dependerá de la capacidad de depuración de la
20 estación depuradora y por tanto del organismo que la gestione. Por ejemplo, en las depuradoras de Galicia se establece unos límites de vertido de 1000 mg/L para la DQO y para el color que sea inapreciable en dilución 1/30 (DECRETO 141/2012, de 21 de junio, por el que se aprueba el Reglamento marco del Servicio Público de Saneamiento y Depuración de Aguas Residuales de Galicia. *Diario Oficial de Galicia*, 6 de Julio del
25 2012. 129: 26924-26958).

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Un aspecto de la invención se refiere a una nueva cepa bacteriana perteneciente a la
30 especie *Bacillus aryabhatai*. Esta especie ha sido descubierta y depositada por primera vez en las colecciones de cultivo tipo Americana y Japonesa en el año 2006. Aislada de criotubos empleados para el muestreo de zonas superiores de la atmósfera, las aplicaciones atribuidas hasta el momento han sido en el campo de la bioremediación de metales pesados; la producción de biopolímeros; o la producción de asparaginasa.

35

Sin embargo, la cepa bacteriana *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226) objeto de invención, ha sido aislada por agotamiento desde crioviales contenedores de la especie *Streptomyces setonii* contaminados. Para ello, a partir de un cultivo mixto, se sembraron por estría las distintas morfologías presentes, hasta obtener placas de cultivos puros, con la misma morfología y tinción de Gram. A continuación se validó la presencia de las características deseadas en algunas de las cepas bacterianas aisladas y se procedió a su identificación mediante amplificación directa por PCR del gen del 16S rRNA y secuenciación parcial del mismo (con lecturas en las dos direcciones).

Esta cepa bacteriana ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con fecha 23/11/2016, donde se le ha asignado el número 9226. La CECT tiene su sede en el edificio de investigación de la Universidad de Valencia, Parc Científic Universitat de València Calle Catedrático Agustín Escardino, 9; 46980 Paterna (Valencia).

15

Otro aspecto de la invención se refiere al procedimiento y uso de la presente cepa bacteriana *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226), para la eliminación de compuestos coloreados y materia orgánica en aguas residuales, que comprende las siguientes etapas:

- 20 a) Producción del inóculo de *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226), que comprende el crecimiento en condiciones adecuadas hasta alcanzar la fase estacionaria, posterior centrifugación, lavado y resuspensión con una solución tampón a una concentración comprendida entre 2-5 g/l en peso seco.
- 25 b) Caracterización y suplemento de las aguas residuales a tratar, que comprende un análisis del contenido en sales, nitrógeno y carbono del efluente, y en caso de ser necesario un posterior suplementado a fin de alcanzar como mínimo entre 30-70% de nitrógeno, entre 1-10% de carbono y entre 10-30% de sales necesario para posterior desarrollo del inóculo obtenido en la etapa a) durante el tratamiento biológico.
- 30 c) Tratamiento biológico en las condiciones adecuadas de aireación, temperatura y pH de las aguas residuales caracterizadas y suplementadas en el apartado b) por parte del inóculo obtenido en la etapa a)

En una realización preferida, la etapa de producción del inóculo de *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226) se realiza en un medio que comprende la siguiente composición:

- 15-30 g/L de peptona de caseína
- 3-10 g/L de peptona de soja
- 3-10 g/L de cloruro sódico
- 5 • 2-5 g/L de glucosa
- 2-5 g/L de fosfato dipotásico de hidrógeno

Las condiciones de cultivo están entre 30-37°C y 100-150 rpm durante 12 - 24h. Posteriormente se realiza la centrifugación a 6000 rpm durante 10 minutos, y la posterior
10 etapa de lavado se realiza 2 veces con tampón fosfato salino, hasta alcanzar una concentración en torno a 2-5 g/L.

En otra realización preferente, las condiciones del tratamiento biológico de las aguas residuales obtenidas en la etapa b) comprende incubar el inóculo obtenido en la etapa
15 a) a temperaturas entre 25-46°C, agitación entre 100-400 rpm, y un pH entre 6-12, durante un tiempo comprendido entre 24-72 horas que dependerá según la carga de colorante a degradar. Se monitoriza la absorbancia, y se mide la DQO según la norma ISO 15705.

20 Con el procedimiento aquí descrito se solventan algunos de los problemas que presentan las aguas residuales en aquellas industrias que realicen procesos de tinción o coloración. De esta manera, el procedimiento aquí desarrollado permite la completa decoloración de colorantes tipo trifenilmetano e indigotina y sobre efluentes de la industria textil reducciones de la DQO que oscilan en torno al 50%. Pero además, el
25 proceso aquí descrito presenta varias ventajas. Primeramente y debido al carácter extremófilo de la cepa bacteriana objeto de invención, es posible tratar las aguas residuales directamente y sin procedimientos previos tales como la neutralización del efluente. Segundo, el bajo coste del procedimiento objeto de invención aquí descrito. Tercero, en función de la composición de las aguas residuales a tratar la brevedad y
30 simplicidad del tratamiento. Cuarto, la diversidad de compuestos que tolera y que es capaz de degradar la cepa bacteriana objeto de invención.

Otro aspecto de la invención se refiere al procedimiento y uso de la presente cepa bacteriana *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226), en el tratamiento biológico de
35 aguas residuales para la eliminación de compuestos coloreados, más concretamente de

colorantes de tipo trifenilmetano e indigotina.

Finalmente, otro aspecto de la invención se refiere al procedimiento y uso de la presente cepa bacteriana *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226), en el tratamiento biológico de aguas residuales para la reducción de la materia orgánica (DQO) presente en ellas.

Todo esto conlleva a destacar el uso de *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226) en efluentes procedentes de la industria textil, papelera, cosmética, farmacéutica y/o alimentaria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Barrido espectrofotométrico del sobrenadante en el rango de aparición del colorante tipo trifenilmetano empleado (Ejemplo 1). Línea continua: tiempo 0h; línea punteada: tiempo 24h; línea punteada y rayada: tiempo 48h y línea rayada: tiempo 72h.

Figura 2. - Proceso de decoloración de un colorante tipo trifenilmetano (Ejemplo 1). a) Tiempo 0; b) Tiempo 48h; c) Tiempo 72h.

Figura 3.- Barrido espectrofotométrico del sobrenadante en el rango de aparición del colorante tipo indigotina empleado (Ejemplo 2). Línea continua: tiempo 0h; línea rayada: tiempo 24h; línea punteada: tiempo 48h.

Figura 4.- Barrido espectrofotométrico del sobrenadante del proceso de decoloración de un efluente procedente de una industria textil. Línea continua: tiempo 0h; línea punteada y rayada: tiempo 24h.

Figura 5.- Porcentajes de reducción de la DQO de los ejemplos propuestos. A. Línea con marcador en forma de triángulo correspondiente al proceso de decoloración de tintes tipo trifenilmetano con *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226) (Ejemplo 1); B. Línea con marcador en forma de círculo que corresponde a tratamiento biológico del efluente de una industria textil con *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226) (Ejemplo 3); C. Línea con marcador cuadrado correspondiente tratamiento biológico de efluente semilíquido procedentes de la industria textil mediante *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226) (Ejemplo 4).

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

A continuación se expone de manera detallada cuatro ejemplos posibles de realización del procedimiento biológico para la eliminación de compuestos coloreados en aguas residuales. El primer ejemplo se refiere al empleo de *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226) para la degradación de un colorante tipo trifenilmetano; el segundo ejemplo se refiere a la decoloración de tintes de clase indigotina; el tercer ejemplo a una aplicación real de *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226) sobre un efluente líquido procedentes de la industria textil; y finalmente el ejemplo 4 se refiere al tratamiento biológico de un efluente semilíquido procedentes de la industria textil con la cepa bacteriana objeto de invención.

Una realización preferente de la invención comprendería la obtención del inóculo a la concentración deseada. Posteriormente la caracterización del efluente a tratar y suplementación en caso de que sea necesario. Finalmente la puesta en marcha del tratamiento biológico del proceso de decoloración.

Con el proceso aquí descrito se solventan algunos de los problemas que presentan algunos procesos industriales consumidores de elevados volúmenes de aguas. Debido a la escasez de información en cuanto a composición de las aguas residuales generadas por procesos específicos, a modo de ejemplo para explicar la presente invención, se han tomado los valores medios de los distintos procesos llevados a cabo por una empresa del sector textil (tabla 1). (Guía de mejores técnicas disponibles en España del sector textil, 2004, Ministerio de Medioambiente).

Con el tratamiento aquí descrito la degradación de color es completa para colorantes de tipo trifenilmetano e indigotina y parcial en cuanto a la reducción de la materia orgánica.

Proceso	pH	DQO (mg/L)	Color (mg Pt-Co-l)
Tintura de fibras e hilados	10-12	500-1200	300-1000
Tintura y acabados de tejido de lana y algodón	6-12	300-2800	500-3000
Estampación y acabados	6-9	350-2300	No cuantificado

Ejemplo 1.- Proceso de decoloración de un colorante tipo trifenilmetano con *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226).

Se inicia el proceso reactivando un criovial de *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226), previamente aislado en nuestro laboratorio y conservado a -80°C en una disolución de glicerol al 20%. Para ello se prepara un medio de cultivo con los requerimientos nutricionales previamente descritos (15-30 g/L de peptona de caseína; 3-10 g/L de peptona de soja; 3-10 g/L de cloruro sódico; 2-5 g/L de glucosa y 2-5 g/L de fosfato dipotásico de hidrógeno) y se deja incubando un máximo de 24h, con una agitación constante entre 100-150 rpm y una temperatura de 30-37°C. Previamente se habrá estudiado su ciclo celular, su densidad óptica (D.O λ_{600}) y la producción de biomasa por peso seco. Para ello, cada 2 horas se toman alícuotas de 1.5 ml y se medirá su absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600nm (D.O λ_{600}). Para determinar la biomasa por peso seco, se tomarán 5 ml del cultivo, se filtrará a través de un filtro de tamaño de poro 0.20 μ l y se dejará secando hasta peso constante a 105°C. Cuando el cultivo se encuentre en fase estacionaria, se centrifugará a 6000 rpm durante 10 minutos y se lavará 2 veces con tampón fosfato salino, siendo este el inóculo a emplear en el tratamiento biológico del proceso de decoloración.

Por otra parte se preparará una simulación de aguas residuales. Primeramente se dispondrá de una disolución stock de 500 mg/L de un colorante tipo trifenilmetano esterilizado por filtración. Un volumen determinado de esta disolución será añadida a un medio de cultivo (previamente esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 121°C) que contenga entre un 30 y 70% de nitrógeno, entre un 1 y un 10% de carbono y entre un 10 y un 30% de sales. Posteriormente se ajustará el pH entre 6-12 y se inoculará con el inóculo de *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226) previamente obtenido. A continuación se incubará a una temperatura de entre 25 - 46°C y agitación entre 100 - 400 rpm hasta completa decoloración. En intervalos regulares de tiempo se tomarán alícuotas de 1.5 ml, se medirá el pH, la absorbancia a la longitud máxima del colorante y la DQO conforme la norma ISO 15705. Además también se realizará un barrido del espectro para confirmar que no se genere ningún otro tipo de compuesto. Como se puede ver en la Fig. 1 la disminución en el pico de absorbancia es notable, siendo el porcentaje de decoloración de $99.163 \pm 0,080\%$. En la Fig. 2 mostramos el proceso de decoloración a lo largo del tiempo. En cuanto a la DQO, se puede observar en la Figura 5.A que la reducción es de un $42.06 \pm 0.86 \%$.

35

Ejemplo 2.- Proceso de decoloración de un colorante tipo indigotina con *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226).

Inicialmente se procede a la reactivación de un criovial de *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226) aislado en nuestro laboratorio y conservado a -80°C en una disolución de glicerol al 20%. Para ello se prepara un medio de cultivo con los requerimientos nutricionales previamente descritos (15-30 g/L de peptona de caseína; 3-10 g/L de peptona de soja; 3-10 g/L de cloruro sódico; 2-5 g/L de glucosa y 2-5 g/L de fosfato dipotásico de hidrógeno) y se deja incubando un máximo de 24h, con una agitación constante entre 100-150 rpm y una temperatura de 30-37°C. Previamente se habrá estudiado su ciclo celular, su densidad óptica (D.O λ_{600}) y la producción de biomasa por peso seco. Para ello, cada 2 horas se toman alícuotas de 1.5 ml y se medirá su absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600nm (D.O λ_{600}). Para determinar la biomasa por peso seco, se tomarán 5 ml del cultivo, se filtrará a través de un filtro de tamaño de poro 0.20 μ l y se dejará secando hasta peso constante a 105°C. Cuando el cultivo se encuentre en fase estacionaria, se centrifugará a 6000 rpm durante 10 minutos y se lavará 2 veces con tampón fosfato salino. Este será el inóculo a emplear en el tratamiento biológico del proceso de decoloración.

A continuación, se procederá a preparar la simulación de aguas residuales, y para ello se dispondrá de una disolución stock de 500 mg/L de un colorante tipo indigotina esterilizado por filtración. Un volumen determinado de esta disolución será añadida a un medio de cultivo (previamente esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 121°C) que contenga entre un 30 y 70% de nitrógeno, entre un 1 y un 10% de carbono y entre un 10 y un 30% de sales. Posteriormente se ajustará el pH entre 6-12 y se inoculará con el inóculo de *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226) previamente obtenido. A continuación se incubará a una temperatura de entre 25 - 46°C y agitación entre 100 - 400 rpm hasta completa decoloración. En intervalos regulares de tiempo se tomarán alícuotas de 1.5 ml y se medirá el pH y la absorbancia a la longitud máxima del colorante. También se realizará un barrido del espectro para confirmar que no se genere ningún otro tipo de compuesto. Como se puede ver en la Fig. 3, al igual que en el ejemplo 1, la reducción es total, obteniendo un $99.546 \pm 0,057\%$ de decoloración.

Ejemplo 3. Proceso de decoloración del efluente de una industria textil con *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226).

Inicialmente preparamos un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de *Bacillus*

aryabhatai DC100 (CECT 9226), cepa bacteriana aislada en nuestro laboratorio y conservada a -80°C en un disolución al 20% de glicerol. La composición es la descrita en el ejemplo anterior: 15-30 g/L de peptona de caseína; 3-10 g/L de peptona de soja; 3-10 g/L de cloruro sódico; 2-5 g/L de glucosa y 2-5 g/L de fosfato dipotásico de hidrógeno. El tiempo de incubación vendrá dado por estudios previos de su ciclo celular y producción de biomasa. Para ello, cada 2 horas se toman alícuotas de 1.5 ml y se medirá su absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm (D.O λ_{600}). En cuanto a la determinación de la biomasa por peso seco, se tomarán 5 ml de cultivo, se filtrará a través de un filtro de tamaño de poro 0.20 μ l y se dejará secando hasta peso constante a 105°C. Cuando el inóculo se encuentre en fase estacionaria, se centrifugará a 6000rpm durante 10 minutos y se lavará 2 veces con tampón fosfato salino.

A continuación, se caracterizará un efluente procedente de una industria textil y se adecuará mediante suplementación a los siguientes parámetros: entre un 30 y un 70% de nitrógeno, entre un 1 y un 10% de carbono y entorno a un 10-30% de sales. Posteriormente se ajustará el pH entre 6-12 y se inoculará con el inóculo de *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226) previamente obtenido. Se incubará a una temperatura de entre 25 - 46°C y agitación entre 100 – 400 rpm. En intervalos regulares de tiempo se tomarán alícuotas de 1.5 ml, se medirá el pH, la absorbancia a la longitud máxima del colorante y la DQO conforme la norma ISO 15705. A mayores también se realizará un barrido del espectro para confirmar que no se genere ningún otro tipo de compuesto. Como se puede ver en la Fig. 4, la caída en un su espectro de absorción es total, alcanzando el 100%. En cuanto a la DQO, se puede observar en la Figura 5.B que la reducción es de un 47.70 \pm 0.78 %.

Ejemplo 4.- Tratamiento de un efluente semilíquido procedentes de una industria textil con *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226).

En este ejemplo, se parte de efluentes semilíquidos procedentes de una industria textil, que al igual que en el ejemplo 4 se caracterizará y suplementará hasta obtener una composición de entre un 30 y un 70% de nitrógeno, un 1 y un 10% de carbono y sobre un 10-30% de sales. Por otro lado, se preparará el inóculo de *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226), cepa bacteriana aislada en nuestro laboratorio objeto de invención conservada a -80°C en un disolución al 20% de glicerol, en un medio de cultivo cuya composición sea: 15-30g/L de peptona de caseína; 3-10 g/L de peptona de soja; 3-10

g/L de cloruro sódico; 2-5 g/L de glucosa y 2-5 g/L de fosfato dipotásico de hidrógeno. Previamente se habrá estudiado su ciclo celular y producción de biomasa. Para ello, cada 2 horas se toman alícuotas de 1.5 ml y se medirá su absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm (D.O λ_{600}). En cuanto a la

5 determinación de la biomasa por peso seco, se tomarán 5ml del cultivo, se filtrará a través de un filtro de tamaño de poro 0.20 μ l y se dejará secando hasta peso constante a 105°C. Cuando el inóculo se encuentre en fase estacionaria, se centrifugará a 6000 rpm durante 10 minutos y se lavará 2 veces con tampón fosfato salino. Este cultivo se empleará para inocular el medio preparado con los efluentes semilíquidos procedentes

10 de una industria textil. La incubación se realizará a una temperatura entre 25 - 46°C y agitación entre 100 – 400 rpm. En intervalos regulares de tiempo se tomarán alícuotas para medir la DQO conforme la norma ISO 15705. En la Figura 5.C se observa que la reducción es de un 14.09±0.71 %.

15

REIVINDICACIONES

1. Cepa bacteriana de la especie *Bacillus aryabhatai* DC100 depositada en la CECT con el código CECT 9226.
- 5 2. Uso de la cepa bacteriana *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226), según reivindicación 1, en la biodegradación de colorantes del tipo trifenilmetano o indigotina.
3. Procedimiento para la eliminación de compuestos coloreados y materia orgánica en aguas residuales según reivindicación 1 y 2, que comprende las siguientes etapas:
10 a) Producción del inóculo *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226) en un medio de cultivo de composición: 15-30g/L de peptona de caseína; 3-10 g/L de peptona de soja; 3-10 g/L de cloruro sódico; 2-5 g/L de glucosa y 2-5 g/L de fosfato dipotásico de hidrógeno, hasta alcanzar la fase estacionaria, posterior centrifugación y lavado con una solución tampón y preparación de una concentración entre 2-5 g/l en peso seco.
15 b) Caracterización y suplemento del agua residual y/o efluente a tratar que comprende un análisis del contenido en sales, nitrógeno y carbono, y posterior suplemento en caso de ser necesario a fin de alcanzar como mínimo entre 30-70% de nitrógeno, entre 1-10% de carbono y 10-30% de sales necesario para el desarrollo del inóculo obtenido en la etapa a) en el posterior tratamiento biológico.
20 c) Tratamiento biológico mediante el inóculo obtenido en la etapa a) de las aguas residuales caracterizadas y suplementadas en la etapa b).
- 25 4. Procedimiento según reivindicación 3, caracterizado por el medio de cultivo empleado para la producción del inóculo de *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226) según la etapa a) que comprende la siguiente composición:
 - 15-30 g/L de peptona de caseína;
 - 3-10 g/L de peptona de soja;
 - 30 • 3-10 g/L de cloruro sódico;
 - 2-5 g/L de glucosa;
 - 2-5 g/L de fosfato dipotásico de hidrógeno;donde las condiciones de cultivo están entre 30 °C-37 °C y 100-150 rpm durante 12-24h. Una vez alcanzada la fase estacionaria se centrifuga a 6000 rpm durante
35 10 minutos, se lava 2 veces con tampón fosfato salino, y se resuspende hasta

- alcanzar una concentración en torno a 2-5 g/L.
5. Procedimiento según reivindicación 3, en el que el tratamiento biológico según la etapa c) está caracterizado por incubar el inóculo obtenido en la etapa a. en el efluente caracterizado en la etapa b) a temperaturas en el rango de 25-46°C, 5 agitación entre 100-400 rpm, y pH entre 6-12, durante un tiempo entre 24-72 horas que dependerá según la carga de colorante a degradar.
6. Uso de la cepa *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226) y procedimiento para la eliminación de compuestos coloreados en aguas residuales y efluentes.
7. Uso de la cepa bacteriana *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226) y 10 procedimiento para la reducción de la materia orgánica presente en aguas residuales y efluentes.
8. Uso de la cepa bacteriana *Bacillus aryabhatai* DC100 (CECT 9226) y 15 procedimiento para la eliminación la eliminación de compuestos coloreados y materia orgánica en aguas residuales y efluentes procedentes de la industria textil, papelera, cosmética, farmacéutica y/o alimentaria.

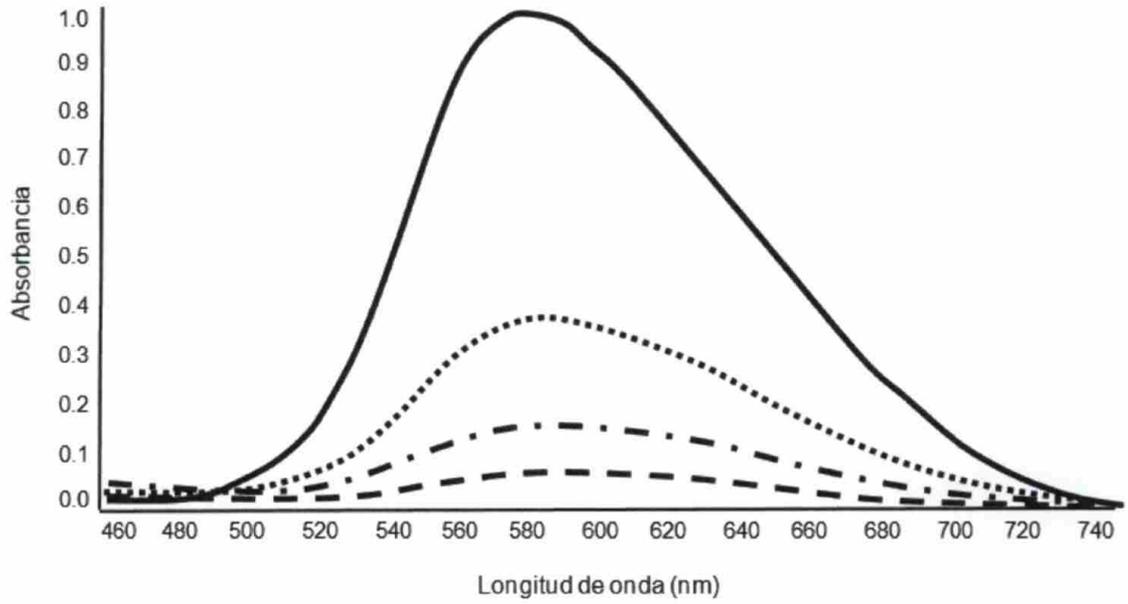


Figura 1

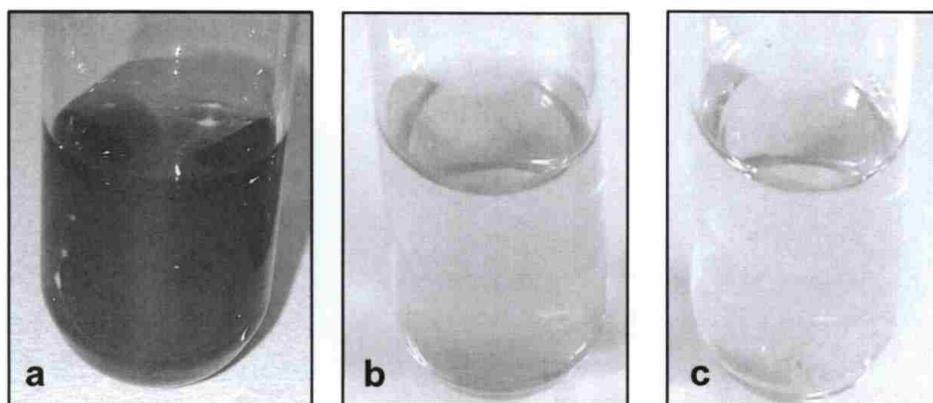


Figura 2

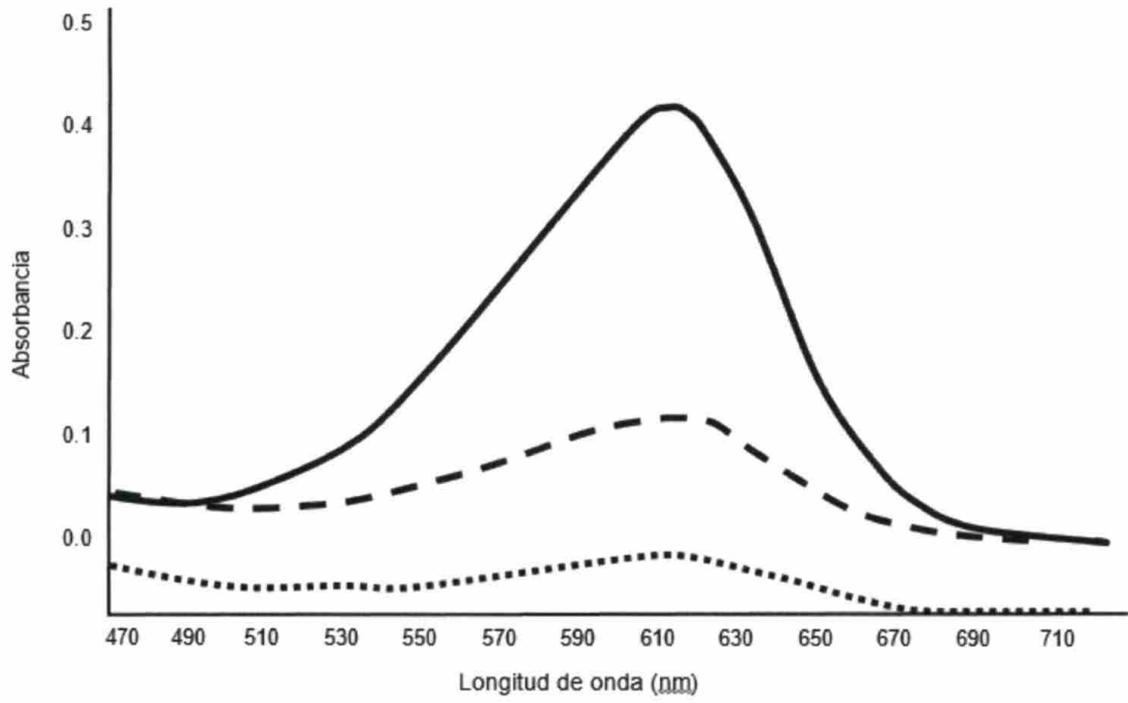


Figura 3

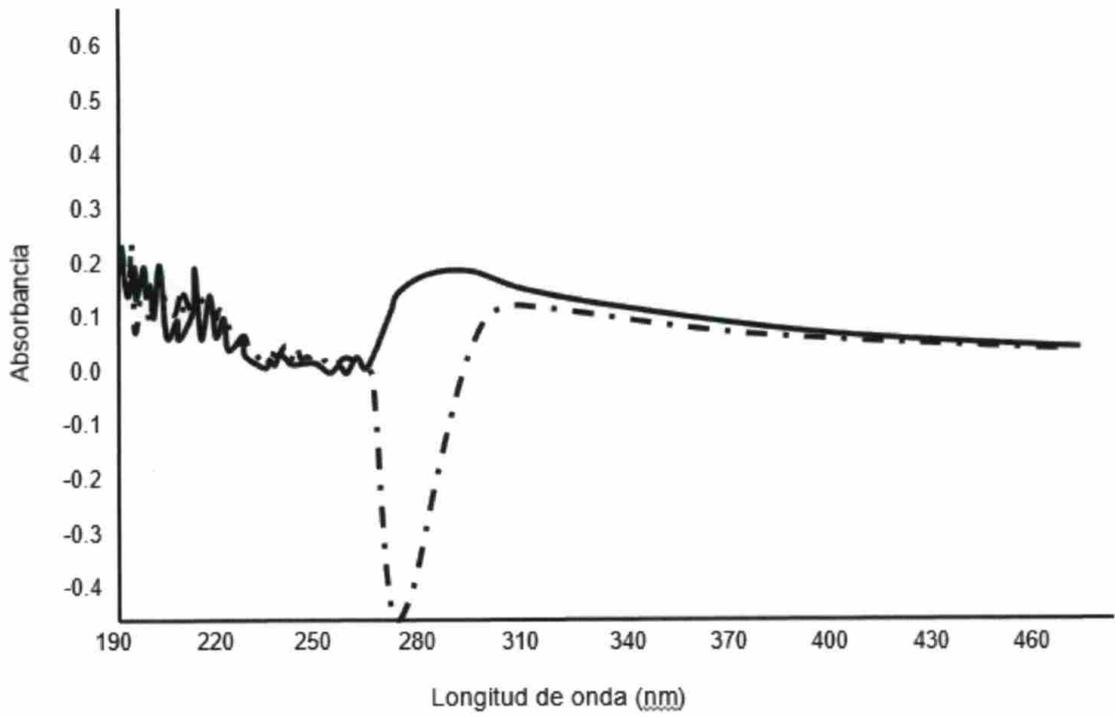


Figura 4

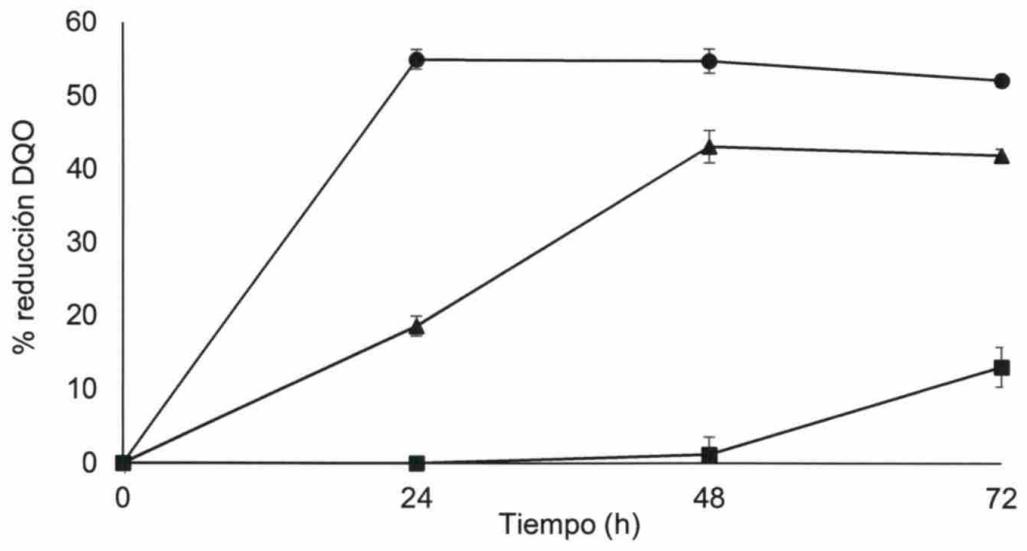


Figura 5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201601101

②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.12.2016

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N1/20** (2006.01)
C02F3/34 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LI, Hui-Xing, et al. REDUCTIVE DECOLORIZATION OF INDIGO CARMINE DYE WITH <i>Bacillus</i> SP. MZS10. 2015, Vol. 103, Páginas 30-37. Páginas 30-31. Páginas 30-31.	1-8
A	SHARMA, Praveen, et al. COD REDUCTION AND COLOUR REMOVAL OF SIMULATED TEXTILE MILL WASTEWATER BY MIXED BACTERIAL CONSORTIUM. 2010, Vol. 3, Páginas 731-735. Páginas 731-732 y 734. Páginas 731-732 y 734.	1-8
A	WO 94/18312 A1 (THE CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG) 18/04/1994, Resumen, página 4, líneas13-28 y tabla 1.	1-8
A	DENG, Daiyong, et al. DECOLORIZATION OF ANTHRAQUINONE, TRIPHENYLMETHANE AND AZO DYES BY A NEW ISOLATED <i>Bacillus cereus</i> STRAIN DC11. . 2008, Vol. 62, Páginas 263-269. Resumen y página 263. Resumen y página 263.	1-8

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
30.03.2017

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/4

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

C12N, 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, USPTO PATENT DATABASE, JPO PATENT DATABASE, TXTE, XPESP, NPL, EMBASE, GOOGLE SCHOLAR, GOOGLE PATENT.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.03.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-8	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-8	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	LI, Hui-Xing, et al. REDUCTIVE DECOLORIZATION OF INDIGO CARMINE DYE WITH <i>Bacillus</i> sp. MZS10. International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 103, Páginas 30-37	2015
D02	SHARMA, Praveen, et al.. COD REDUCTION AND COLOUR REMOVAL OF SIMULATED TEXTILE MILL WASTEWATER BY MIXED BACTERIAL CONSORTIUM. Rasayan J. Chem., Vol. 3, Nº 4, Páginas 731-735	2010
D03	WO 94/18312 A1 (THE CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG)	18.04.1994
D04	DENG, Daiyong, et al. DECOLORIZATION OF ANTHRAQUINONE TRIPHENYLMETHANE AND AZO DYES BY A NEW ISOLATED <i>Bacillus cereus</i> STRAIN DC11. . International Biodeterioration & Biodegradation, , Vol. 62, Nº 3, Páginas 263-269	2008

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

La presente solicitud de invención consiste en una cepa bacteriana un procedimiento biológico para la eliminación de compuestos coloreados y materia orgánica en aguas residuales y efluentes procedentes de distintas industrias como la textil, papelera, cosmética, farmacéutica y/o alimentaria utilizando dicha cepa.

El documento D01 se considera el estado de la técnica más próximo al objeto de las reivindicaciones 1-8 y consiste en una cepa bacteriana de la especie *Bacillus* MZS10 que actúa en la biodegradación del colorante indigotina y el procedimiento de eliminación de dicho compuesto (ver páginas 30-31).

El documento D02 consiste en un estudio sobre la capacidad de eliminación de colorantes mediante el uso de un consorcio de bacterias, entre ellas *Bacillus subtilis*, donde se divulga la influencia del pH, la temperatura y la concentración del colorante (ver 731-732 y 734).

El documento D03 consiste en cepas de microorganismos capaces de degradar colorantes de aguas residuales como el índigo, entre ellas se encuentran las bacterias *Bacillus cirulans*, *B. cereus* y *B. thuringiensis* (ver resumen, página 4, líneas13-28 y tabla 1).

El documento D04 consiste en el aislamiento y caracterización de la cepa DC11 de *Bacillus cereus*, que es capaz de decolorar tintes (ver resumen y página 263).

1.- NOVEDAD (Art. 6.1 LP) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP).

Ninguno de los documentos citados en el Informe del Estado de la Técnica, o cualquier combinación relevante de ellos revela la especie *Bacillus aryabhatai* como bacteria capaz de degradar los colorantes reivindicados en la solicitud de patente.

Por lo tanto, los documentos D01-D04 son solo documentos que reflejan el estado de la técnica. En consecuencia, las reivindicaciones 1-8 son nuevas y se considera que implican actividad inventiva en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 LP.

2.- PATENTABILIDAD (Art. 4.1 LP).

Las reivindicaciones 1-8 cumplen el requisito de patentabilidad según el artículo 4.1 LP.