

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 274**

51 Int. Cl.:

C02F 3/00 (2006.01)

C02F 11/00 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.01.2015 PCT/EP2015/050067**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.07.2015 WO15101671**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2015 E 15700957 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 3089946**

54 Título: **Uso de biopolímeros para eliminar el fósforo de las aguas residuales**

30 Prioridad:

30.12.2013 GB 201323123

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

28.03.2019

73 Titular/es:

**UNITED UTILITIES PLC. (100.0%)
Grasmere House First Floor Lingley Mere
Business Park Lingley Green Avenue Great
Sankey
Warrington WA5 3LP, GB**

72 Inventor/es:

LE, MINH SON

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 706 274 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

Uso de biopolímeros para eliminar el fósforo de las aguas residuales

- 5 **[0001]** La presente divulgación se refiere a un método para preparar y separar biopolímeros y fracciones de biopolímeros de lodos de depuración. En particular, la presente divulgación se refiere a la preparación y separación de biopolímeros y fracciones de biopolímeros que se derivan de microorganismos, especialmente microorganismos o biomasa que surgen de tratamientos de aguas residuales. Dichos tratamientos de aguas residuales incluyen, por ejemplo, procesos de lodos activados que se utilizan comúnmente para el tratamiento de aguas residuales municipales.
- 10 **[0002]** Dichos lodos pueden contener biopolímeros o fracciones de biopolímeros en forma de peptidoglicano o fracciones de ácido desoxirribonucleico (ADN) o una combinación de estos dos materiales.
- 15 **[0003]** La biomasa que surge del tratamiento de las aguas residuales generadas en los hogares, las propiedades comerciales y la industria se conoce comúnmente como lodo de aguas residuales. Es decir, el término lodo de aguas residuales se refiere a los lodos que no se han sometido a una etapa de digestión, mientras que los lodos biológicos son lodos que se generan a partir del tratamiento biológico de las aguas residuales.
- 20 **[0004]** En Europa, el tratamiento de lodos de depuración sigue la Directiva de tratamiento de aguas residuales urbanas (91/271/CEE). La producción anual de lodos se sitúa actualmente en 1,3 millones de toneladas para el Reino Unido y 10 millones de toneladas para Europa. A nivel mundial, se espera que el volumen de lodos aumente significativamente en los próximos años a medida que muchas de las economías en desarrollo comiencen a implementar sus propias medidas de control de la contaminación. En consecuencia, los lodos de aguas residuales deberán:
- 25 i) tratarse para proporcionar una fuente de energía y materias primas valiosas que se puedan recuperar para aplicaciones útiles; o
ii) destruirse para evitar la contaminación.
- 30 **[0005]** Actualmente, solo hay dos opciones prácticas para la gestión de lodos, a saber, el reciclaje agrícola o la incineración. El reciclaje agrícola es considerado como la mejor opción ambiental viable. La incineración, por otro lado, es mucho más costosa y socialmente objetable. Sin embargo, todavía se prefiere la incineración debido a los posibles riesgos que surgen con el reciclaje agrícola.
- 35 **[0006]** El método más común de tratamiento de lodos es la digestión, específicamente la digestión anaeróbica, que recupera el contenido energético de los lodos como biogás y reduce el olor y el nivel de patógenos de los lodos para hacerlos adecuados para el reciclaje agrícola. En general, la digestión anaeróbica comprende una serie de reacciones bioquímicas complejas mediadas por un consorcio de microorganismos que convierten los compuestos orgánicos en metano y dióxido de carbono. La digestión anaeróbica también es un proceso de estabilización, que consigue la reducción del olor, de patógenos y de la masa.
- 40 **[0007]** El resto de lodo digerido que surge de la digestión anaeróbica comprende principalmente varios tipos de bacterias y, por lo tanto, células bacterianas. Las células bacterianas representan un gran recurso sin explotar a nivel mundial.
- 45 **[0008]** La mayoría de las bacterias en los lodos son gram-negativas, y en los lodos activados representan más del 90 % de las cepas de bacterias. Las bacterias gram-negativas poseen una pared celular relativamente "delgada" que consta de solo unas pocas capas de peptidoglicano que comprende aproximadamente el 10 % de la biomasa de las bacterias.
- 50 **[0009]** El peptidoglicano (también conocido como mureína) es un biopolímero único que consta de aminoácidos D y L. La estructura básica del peptidoglicano consiste en un esqueleto de carbohidratos de restos alternos de N-acetil glucosamina y ácido N-acetil murámico unidos en β -(1,4). Unido al ácido N-acetil murámico hay una cadena peptídica de 3 a 5 aminoácidos. La cadena peptídica puede estar reticulada con otra cadena peptídica en otra cadena de hidratos de carbono formando una capa similar a una malla 3D.
- 55 **[0010]** En contraste, los componentes intracelulares de ADN y ARN representan aproximadamente el 23 % de la masa seca de una célula bacteriana. El resto de la biomasa, es decir, el 67 % de la masa seca que constituye la célula bacteriana, incluye, por ejemplo, polisacáridos, proteínas y fosfolípidos. Los polisacáridos, proteínas y fosfolípidos que se encuentran en gran parte fuera de la pared celular a menudo se denominan sustancias poliméricas extracelulares (SPE). Las SPE normalmente representan el 50 % de la biomasa celular.
- 60 **[0011]** Tanto el ADN como el ARN son biopolímeros compuestos de unidades repetitivas de nucleótidos.
- 65

Cada nucleótido consiste en un azúcar, un fosfato y una base de ácido nucleico. Las bases son hidrófobas y relativamente insolubles en agua al pH casi neutro de la célula. A pH ácido o alcalino se cargan, y aumenta su solubilidad en agua. Las interacciones entre el ADN y los metales, particularmente los metales pesados, han sido ampliamente estudiadas. La unión de metales a los ácidos nucleicos generalmente ocurre a través de la formación de complejos. Por lo tanto, el ADN actúa como un ligando biológico para metales y puede asociarse con metales después de la lisis celular.

[0012] Se han sugerido posibilidades interesantes para el uso de biopolímeros y fracciones de biopolímeros aisladas de lodos de depuración. Por ejemplo, se ha planteado que los biopolímeros y las fracciones de biopolímeros del lodo de aguas residuales podrían emplearse como sustitutos de los polímeros y copolímeros comúnmente utilizados como floculantes/coagulantes en el tratamiento de aguas residuales municipales e industriales.

[0013] Alternativamente, se ha sugerido que los biopolímeros y las fracciones de biopolímeros son productos potencialmente útiles para el tratamiento de aguas residuales y la eliminación de contaminantes indeseables como metales pesados o productos valiosos como el fósforo.

[0014] Sin embargo, hasta ahora no hay métodos conocidos para la fabricación comercial de biopolímeros y la eficacia de su uso en cualquiera de las aplicaciones sugeridas hasta el momento nunca se ha demostrado en la práctica.

[0015] Sin embargo, si hubiera nuevos métodos disponibles para permitir la recuperación de los biopolímeros, preferiblemente en forma relativamente pura, los biopolímeros y fracciones de biopolímeros podrían proporcionar un ingreso viable para los productores de lodos y, lo que es más importante, una nueva opción para la gestión de lodos.

[0016] Por lo tanto, existe la necesidad de un método adecuado para la preparación de biopolímeros y fracciones de biopolímeros a partir de lodos de depuración.

[0017] Más particularmente, existe la necesidad de un método para preparar biopolímeros y fracciones de biopolímeros que también permita el aislamiento y la separación de biopolímeros y fracciones de biopolímeros a partir de lodos de aguas residuales.

[0018] Freguia, S. et al., "Microbial fuel cells operating on mixed fatty acids", Bioresource Technology, vol. 101, no. 4, 2010, describe la degradación de los ácidos grasos volátiles en los lodos de aguas residuales presentes en las células de combustible microbiano.

[0019] Xiaoling, L. et al., "Enhancement of solubilization and acidification of waste activated sludge by pretreatment", Waste Management, vol. 28, no. 12, 2008, describe la solubilización de sustratos orgánicos presentes en restos de lodo activado.

[0020] Weemaes, M. P. J. et al., "Evaluation of current wet sludge disintegration techniques", Journal of Chemical Technology and Biotechnology, vol. 73, no. 2, 1998, describe procesos para el manejo y procesamiento del exceso de biomasa producida en plantas de tratamiento de aguas residuales.

[0021] Por lo tanto, un objetivo de la presente divulgación es proporcionar un método para la preparación y separación de biopolímeros y fracciones de biopolímeros a partir de lodos de aguas residuales que aborda los requisitos de la industria.

[0022] Otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar un método nuevo y mejorado para la preparación y separación de biopolímeros y fracciones de biopolímeros a partir de lodos de depuración que sea eficaz y eficiente y que pueda aplicarse a aplicaciones de tratamiento de aguas residuales.

[0023] De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un uso de acuerdo con la reivindicación 1.

[0024] De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona:

un método para preparar y separar biopolímeros y fracciones de biopolímeros de lodos de depuración, el método que comprende las siguientes etapas:

- i) romper las paredes celulares bacterianas de las bacterias presentes en el lodo de aguas residuales en al menos un 75 % para liberar el contenido intracelular de las células bacterianas; y
- ii) separar los biopolímeros de cualquier contaminante presente.

[0025] En la etapa (i) del método de la divulgación, al menos el 75 % de la cantidad total de células presentes

se rompen, es decir, las células se rompen al menos un 75 % para liberar su contenido. Preferiblemente, las paredes celulares bacterianas pueden romperse en al menos un 85 % para liberar el contenido intracelular de las células bacterianas, más preferiblemente en al menos un 90 %, incluso más preferiblemente en un 95 % y más preferiblemente en un 99 %. Es decir, cuanto mayor es el grado de ruptura, más biopolímeros están disponibles para la recuperación.

[0026] En la etapa (i), los contenidos intracelulares de las células bacterianas se liberan para liberar biopolímeros solubles en forma de lisado celular. Los biopolímeros separados por el proceso pueden ser biopolímeros solubles en el lisado celular o pueden ser biopolímeros insolubles presentes en el lisado celular.

[0027] El método de la presente divulgación puede comprender además la etapa de: eliminar sustancias poliméricas extracelulares (SPE) de las células bacterianas en el lodo de aguas residuales antes de romper las paredes celulares bacterianas.

[0028] El método de la presente divulgación también puede comprender además la etapa de: precipitar los biopolímeros solubles del lisado celular antes de separar los biopolímeros de cualquier contaminante presente. Los biopolímeros solubles precipitados comprenden preferiblemente ácidos nucleicos.

[0029] Alternativamente, el lisado celular puede ser digerido anaeróbicamente para descomponer los ácidos nucleicos de modo que el peptidoglicano insoluble presente en el lisado celular pueda separarse y aislarse.

[0030] El método de la presente divulgación se puede usar preferiblemente con un equipo conocido y fácilmente disponible que requiere un costo mínimo de implementación.

[0031] Por lo tanto, el método de la presente divulgación también es adecuado para la producción industrial de biopolímeros a gran escala en cantidades acordes con el funcionamiento de un sistema municipal de tratamiento de aguas residuales y, por lo tanto, proporciona una respuesta al problema de cómo gestionar el problema cada vez mayor de los residuos de aguas residuales.

[0032] Se entenderá que el término "lodo" referido en el presente documento se refiere a las fracciones sólidas encontradas en aguas servidas y aguas residuales y que surgen del tratamiento de las aguas servidas y las aguas residuales.

[0033] Normalmente, en el tratamiento de aguas residuales municipales, las aguas residuales se someten a un proceso de sedimentación en el que una cierta cantidad de sólidos suspendidos se asienta bajo el efecto de la gravedad, produciendo una primera fracción de lodo conocida como "lodo primario".

[0034] Las aguas residuales depositadas que contienen principalmente sustancias orgánicas disueltas y nutrientes se tratan biológicamente en un segundo proceso conocido comúnmente como el "proceso de lodo activado".

[0035] El lodo del segundo proceso se conoce como "lodo biológico", que está formado principalmente por células bacterianas, mientras que el lodo primario contiene principalmente restos de alimentos y otros componentes inorgánicos inertes, como limo y arena fina.

[0036] La fracción de lodos biológicos y la fracción de lodos primarios se combinan a menudo para proporcionar lodos combinados o lodos co-sedimentados. El lodo combinado del tratamiento de aguas residuales municipales contiene normalmente entre el 40 y el 60 % en peso/peso (p/p) de lodo biológico. Por lo tanto, una matriz de lodos típica puede comprender un 35 % de lodos biológicos, un 35 % de lodos primarios y un 30 % de materia inorgánica inerte en peso seco.

[0037] Se prefiere que en el método de la presente divulgación el lodo de aguas residuales sea un lodo biológico, es decir, el lodo obtenido por medio del segundo proceso conocido como el proceso de lodo activado.

[0038] Además, en relación con el método de la presente divulgación, las paredes celulares bacterianas rotas pueden molerse para dispersar o disolver el peptidoglicano.

[0039] Las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) pueden eliminarse utilizando un medio mecánico, o alternativamente, la SPE puede eliminarse utilizando medios químicos o tratamientos con enzimas. Por ejemplo, la SPE puede desprenderse de la pared celular mediante tratamiento con un dispositivo de cizallamiento o un dispositivo ultrasónico de baja potencia antes de la digestión anaeróbica.

[0040] También en relación con el método de la presente divulgación, las paredes celulares pueden romperse usando uno o más de: ultrasonidos, y/o molinos de cuentas y/o tratamientos cáusticos. Por conveniencia, la ruptura celular debe realizarse después de la eliminación de la SPE para minimizar la contaminación de los biopolímeros.

[0041] Se prefiere que en el método de la presente divulgación el peptidoglicano presente en el lisado celular se separe y se aisle del ADN celular.

5 **[0042]** Cuando el producto deseado es peptidoglicano, el lisado celular preferiblemente se digiere anaeróbicamente para destruir el ADN y, además, el lisado celular se filtra preferiblemente después de la digestión para recuperar el peptidoglicano.

[0043] Se sabe en la técnica que las moléculas grandes, como los biopolímeros, tienen superficies y sus
10 superficies pueden tener afinidad por el agua, el aceite o ciertos productos químicos. La naturaleza de las superficies de los biopolímeros se conoce como sus propiedades superficiales. En relación con el método de la presente divulgación, los biopolímeros y fracciones pueden tratarse antes, durante o después de la etapa de precipitación con uno o más productos químicos para alterar o mejorar las propiedades superficiales de los biopolímeros y mejorar la unión de compuestos específicos a los biopolímeros y fracciones.

15 **[0044]** El ADN y/o el peptidoglicano aislado usando el método de la presente divulgación se pueden usar como floculantes y coagulantes y como reemplazo de floculantes y coagulantes conocidos.

[0045] De acuerdo con un segundo aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para la
20 preparación y separación de biopolímeros y fracciones de biopolímeros a partir de lodos de depuración, el método comprende las siguientes etapas:

i) eliminar las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) de las células bacterianas en el lodo de aguas residuales;
ii) romper las paredes celulares bacterianas en al menos un 75 % para liberar el contenido intracelular de las células
25 bacterianas;
iii) precipitar biopolímeros solubles para formar un lisado celular y separar los biopolímeros de cualquier contaminante presente.

[0046] Según un tercer aspecto de la presente divulgación, se proporciona el uso del ADN y/o peptidoglicano
30 aislado utilizando el método según el primer o segundo aspecto de la presente divulgación como floculantes y coagulantes.

[0047] La preparación de biopolímero que utiliza los métodos de acuerdo con la presente divulgación permite
35 la recuperación de biopolímero en una forma que es pura, activa y con un alto rendimiento.

[0048] El término "activo" referido en relación con el biopolímero significa que los biopolímeros no están dañados o degradados de ninguna manera que pueda degradar las funciones de los biopolímeros.

[0049] De lo anterior quedará claro que el lodo biológico es el mejor material de partida para la producción de
40 biopolímeros, ya que el lodo primario no es una fuente de biopolímero y solo se añadiría a la carga de contaminantes que se debe eliminar. Sin embargo, por razones operativas, puede ser más conveniente comenzar el proceso de preparación de biopolímeros con lodo combinado, como se demostrará más adelante. En contraste, el proceso de preparación se simplifica considerablemente, sin embargo, cuando el lodo biológico proporciona el material de alimentación para el biopolímero.

45 **[0050]** El término fracción de biopolímero referido en el presente documento se refiere a una fracción de biopolímeros que tienen un tamaño molecular o propiedad superficial similar tomada de una población de biopolímeros.

50 **[0051]** La pureza de una fracción de biopolímero se puede definir de la siguiente manera:

$$\text{Pureza} = \text{masa de biopolímero} / \text{masa total del producto}$$

[0052] Para el lodo biológico, la eliminación de las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) solas
55 aumenta la pureza de una fracción de biopolímero en un 100 %, ya que la SPE normalmente representa el 50 % de la biomasa celular. La SPE puede eliminarse mediante una serie de medios mecánicos, como el uso de altas tasas de corte. Alternativamente, la SPE puede eliminarse por medios químicos tales como tratamientos con tensioactivos o tratamientos con enzimas. La digestión comúnmente consigue la eliminación del 50 % de SPE.

60 **[0053]** Existen numerosas técnicas disponibles para la lisis celular (o rotura/ruptura de la pared celular bacteriana) que incluyen: métodos de alto cizallamiento, métodos de alta presión y métodos de alta temperatura, además de medios químicos y enzimáticos.

[0054] Los métodos adecuados para romper o interrumpir las paredes celulares bacterianas para liberar el
65 contenido intracelular para su uso con la presente divulgación incluyen: medios de ultrasonificación, molinos de perlas

y tratamiento cáustico.

[0055] También se debe tener en cuenta que la rotura de la pared celular bacteriana solo hace que las células se fracturen, liberando así cualquier contenido intracelular o exponiendo el contenido intracelular a posibles ataques químicos, pero dejando la estructura cristalina de la pared celular relativamente intacta.

[0056] Las moléculas de biopolímero a menudo son parcialmente cristalinas (también denominadas semicristalinas), con regiones cristalinas dispersas dentro del material amorfo. Los polímeros cristalinos son más densos, más robustos físicamente y más resistentes a los ataques químicos que los polímeros amorfos.

[0057] Es deseable disolver los contenidos intracelulares sin disolver o generar fragmentos de pared celular muy pequeños para separar convenientemente los diferentes materiales intracelulares mediante, por ejemplo, filtración.

[0058] Por el contrario, la acción prolongada sobre las células bacterianas por un molino de perlas (también conocido como micro-molino) que emplea pequeñas perlas de muy alta dureza, como perlas cerámicas, reduce aún más el tamaño de los fragmentos de la pared celular bacteriana. Sin embargo, los fragmentos de la pared celular bacteriana solo se hinchan si se exponen a condiciones de pH alto. Por lo tanto, el tratamiento cáustico solo no es suficiente para conseguir la disolución del peptidoglicano. La disolución del peptidoglicano requiere la molienda de los fragmentos celulares en un medio cáustico con perlas cerámicas. En contraste, los ácidos nucleicos son más fácilmente solubles en un medio cáustico y a menudo no requieren ninguna acción de molienda.

[0059] Para aplicaciones específicas, son deseables fracciones de ADN relativamente puro o de peptidoglicano puro. Es decir, son deseables fracciones de ADN a niveles de al menos el 50 % de pureza; más preferiblemente al menos un 70 % de pureza y lo más preferiblemente al menos un 85 % de pureza.

[0060] La separación de ADN de peptidoglicano se puede conseguir mediante, primero, el tratamiento del lisado celular en condiciones de digestión anaeróbica mediante las cuales todos los ácidos nucleicos se someten a gasificación (es decir, los ácidos nucleicos se convierten en biogás en forma de metano y CO₂) que salen del peptidoglicano relativamente intacto. Alternativamente, cualquier fragmento celular puede separarse de los ácidos nucleicos solubles mediante filtración a través de un filtro adecuadamente clasificado.

[0061] Se apreciará que el lisado celular o el lisado filtrado que contiene el ADN soluble y/o el peptidoglicano soluble también pueden contener otros contaminantes solubles. Dichos contaminantes pueden separarse convenientemente de los biopolímeros por precipitación selectiva de los biopolímeros. Por ejemplo, tanto el ADN como el peptidoglicano son "poliácidos" que precipitan fácilmente a medida que cae el pH de la solución. El ADN y el peptidoglicano también son susceptibles a la precipitación debido a la neutralización de la carga con cationes multivalentes como los iones Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺.

[0062] El ADN y el peptidoglicano también se conocen como macro-moléculas y pueden interactuar y unirse con muchas moléculas diferentes. La capacidad de las macromoléculas para unirse a diferentes moléculas hace que los biopolímeros sean valiosos como agentes para el tratamiento de aguas residuales.

[0063] También es posible alterar o mejorar su propiedad superficial para mejorar su unión de compuestos específicos con uno o más productos químicos adecuados. Por lo tanto, con modificaciones adecuadas, los ácidos nucleicos y los peptidoglicanos se pueden usar como, por ejemplo, pero no limitados a: agentes tensioactivos, coagulantes, floculantes, adsorbentes, recubrimientos de superficie, agentes complejantes. La modificación química de los biopolímeros con ligandos específicos puede realizarse convenientemente con técnicas de tinción e intercalado.

[0064] En química, la intercalación es la inclusión reversible de una molécula (o grupo) entre otras dos moléculas (o grupos). Los ejemplos incluyen intercalación de ADN y compuestos de intercalación de grafito. Hay varias formas en que las moléculas (en este caso, también conocidas como ligandos) pueden interactuar con el ADN. Por ejemplo, los ligandos pueden interactuar con el ADN mediante: unión covalente; unión electrostática; o intercalación. La intercalación se produce cuando se insertan ligandos de un tamaño apropiado y naturaleza química entre pares de bases de ADN. Estos ligandos son en su mayoría policíclicos, aromáticos y planos, y, por lo tanto, a menudo producen tinciones de ácido nucleico eficaces. Los ejemplos de intercaladores de ADN incluyen: berberina, bromuro de etidio, proflavina, daunomicina, doxorubicina y talidomida. Los intercaladores de ADN se utilizan en el tratamiento quimioterapéutico para inhibir la replicación del ADN en células cancerosas de rápido crecimiento.

[0065] La tinción es una técnica auxiliar utilizada en microscopía para mejorar el contraste en la imagen microscópica. Las tinciones y los colorantes se utilizan con frecuencia en biología y medicina para resaltar las estructuras en los tejidos biológicos para la visualización, a menudo con la ayuda de diferentes microscopios. Las tinciones se pueden usar para definir y examinar los tejidos en masa (resaltando, por ejemplo, las fibras musculares o el tejido conectivo), las poblaciones de células (clasificando diferentes células sanguíneas, por ejemplo), o los

orgánulos dentro de las células individuales.

[0066] En bioquímica también existe el requisito de añadir un colorante específico de clase (ADN, proteínas, lípidos, carbohidratos) a un sustrato para calificar o cuantificar la presencia de un compuesto específico. La tinción y el marcaje fluorescente pueden tener fines similares. La tinción biológica también se utiliza para marcar las células en citometría de flujo, y para marcar las proteínas o los ácidos nucleicos en la electroforesis en gel. Algunas tinciones a menudo se combinan para revelar más detalles y características que una sola tinción individual. Combinados con protocolos específicos para la fijación y preparación de muestras, los científicos y los médicos pueden usar estas técnicas convencionales como herramientas de diagnóstico repetibles y consistentes. Una "contratinción" es una tinción que hace que las células o estructuras sean más visibles, cuando no son completamente visibles con la tinción principal. Por ejemplo, el violeta de cristal tiñe solo las bacterias gram-positivas en la tinción de gram. Se aplica una contratinción de safranina que tiñe todas las células, lo que permite la identificación de bacterias gram-negativas.

[0067] En un caso de la presente divulgación, se proporciona un método para preparar una mezcla de ADN/peptidoglicano a partir de lodo de aguas residuales en el que la mezcla contiene principalmente ADN y peptidoglicano y que comprende las siguientes etapas:

- 1) eliminar las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) de las células bacterianas en los lodos de depuración mediante digestión anaeróbica;
- 2) romper/lisar las paredes celulares bacterianas en al menos un 75 % para liberar el contenido intracelular de las células bacterianas utilizando hidróxido de sodio (NaOH) y moler para solubilizar el ADN/ARN y otros contaminantes presentes;
- 3) precipitar el ADN sobre los restos de peptidoglicano utilizando un precipitante adecuado, tal como cloruro de calcio (CaCl₂);
- 4) eliminar el precipitado que contiene la mezcla de ADN/peptidoglicano del licor de proceso utilizando una técnica adecuada de separación de líquidos sólidos, como la sedimentación o la centrifugación.

[0068] En un ejemplo alternativo de la presente divulgación, se proporciona un método para aislar peptidoglicano de los lodos de depuración que comprende las siguientes etapas:

- 1) eliminar opcionalmente sustancias poliméricas extracelulares (SPE) de células bacterianas en lodos de depuración mediante digestión anaeróbica;
- 2) romper/lisar las paredes celulares bacterianas en al menos un 75 % para liberar el contenido intracelular de las células bacterianas utilizando hidróxido de sodio (NaOH) y moler para solubilizar el ADN/ARN y otros contaminantes presentes;
- 3) eliminar el ADN/ARN y otros contaminantes presentes, incluyendo cualquier SPE presente de células bacterianas en lodos de aguas residuales por digestión anaeróbica;
- 4) eliminar los restos de peptidoglicano del digerido utilizando una técnica adecuada de separación de líquidos sólidos, como filtración o centrifugación.

[0069] Para una mejor comprensión de la presente invención y para mostrar más claramente cómo se puede llevar a cabo, a continuación se analizarán los siguientes ejemplos. El ejemplo 1 es un ejemplo de referencia. Los ejemplos 2 y 3 son de acuerdo con la presente invención.

EJEMPLO 1

[0070] Las muestras de biopolímero se prepararon moliendo muestras de torta de lodos digeridos seguido de un procedimiento de extracción como sigue. (La torta de lodos digeridos es la fracción sólida de lodos obtenida al eliminar sustancialmente el agua de los lodos digeridos).

[0071] Se molió una torta de lodos digeridos con un contenido típico de masa seca del 25 % utilizando un molino de bolas Capco 12VS. Las muestras se procesaron durante tres días en un ambiente cáustico acuoso para descomponer la estructura celular. La molienda se realizó en botellas de 500 ml en las siguientes condiciones:

Torta de lodos	50 g (25 % de sólidos secos)
Agua destilada	150 ml
NaOH (masa seca)	superior al 5 %
Tiempo de molienda	superior a 48 horas
Final pH	9,0
Velocidad de molienda	100 rpm
Medio de molienda	ZrO ₂ de 2 mm (200 ml)

[0072] El biopolímero se precipitó a partir de lisado de células mediante la adición de una solución de cloruro de calcio (CaCl₂). Se utilizó una solución al 20 % de CaCl₂ a lisado en una proporción de 1:2. El precipitado

resultante de esta operación se recuperó por centrifugación y se lavó con agua destilada antes de usar como un biopolímero extraído.

[0073] El biopolímero extraído tenía una apariencia compacta pero granular con un contenido de sólido seco del 16,97 % peso/peso (p/p). El análisis inicial mostró que los gránulos tenían un contenido de fósforo (P) del 6,5 % en peso/peso (p/p, base seca) después del tratamiento con la solución al 20 % de CaCl_2 .

[0074] Se estimó que la pureza del biopolímero extraído tenía un contenido de ADN del 8 % en peso/peso (p/p en base seca).

EJEMPLO 2

[0075] Se realizaron varios experimentos para demostrar el uso de un biopolímero como agente para la eliminación de ortofosfato (OP) de las aguas residuales depositadas. Los niveles típicos de OP para las aguas residuales depositadas en un sitio de prueba se encontraban en la región de 2 mg/l, por lo que a los fines de los experimentos, las aguas residuales depositadas se enriquecieron con dihidrogenosfato de sodio para llevar el contenido de OP a un valor de 20 mg/l.

[0076] A continuación se usó un protocolo de prueba 'Jar' que comprendía una prueba a la cual se añadieron 500 ml de aguas residuales sedimentadas, cantidades variables de biopolímero en bruto (en forma de lisado celular) seguido de la adición de 20 ml de solución de CaCl_2 (al 20 %) con mezcla rápida (200 rpm) durante 1 minuto. Se permitió un período de 15 minutos para la floculación/coagulación seguido de un período de asentamiento de 15 minutos antes del análisis.

[0077] La Tabla 1 ilustra los resultados de poner en contacto el biopolímero en forma de lisado celular con aguas residuales sedimentadas. El protocolo de la "prueba de jar" indicó un grado variable de eliminación de ortofosfato dependiendo de la cantidad de biopolímero en bruto (lisado celular) añadido a la mezcla de prueba. Los resultados se muestran en la Tabla 1 que ilustra la efectividad del biopolímero en bruto en la eliminación de fósforo de las aguas residuales.

Tabla 1:

Cantidad de lisado celular añadido (ml)	OP total en el sistema (mg)	OP residual (mg/l)	Ca total en el sistema (mg)	Relación de Ca:P (p/p)	% de eliminación de OP de las de aguas residuales sedimentadas
5	13,3	7,4	103	7,8	62
10	16,8	2,9	206	12,3	85
15	20,3	1,4	309	15,2	93
20	23,8	1,4	412	17,3	93
OP - ortofosfato					

EJEMPLO 3

[0078] Se siguió el protocolo descrito en el ejemplo 2, excepto por que en el ejemplo 3 el biopolímero en bruto en forma de lisado celular se reemplazó por 10 g de biopolímero extraído y no se añadió CaCl_2 . Las aguas residuales depositadas también se reemplazaron con licor de lodo con contenido de ortofosfato (OP) hasta aproximadamente 100 mg/l y con cantidades variables de ácidos grasos volátiles (AGV) presentes.

[0079] Los resultados de los ensayos de biopolímeros que utilizan el licor de lodo que contiene ortofosfato se muestran en la Tabla 2.

[0080] La Tabla 2 ilustra la efectividad del biopolímero extraído en la eliminación de fósforo del licor de lodo.

Tabla 2

Muestra (VFA añadido, mg/l)	OP residual (mg P/l)	Eliminación de OP (%)	Calcio residual (mg/l)	pH
200	11,8	85,0	1542	6,8
300	25,7	72,7	1602	6,3
400	37,9	56,5	1472	6,0
500	49,4	48,5	1548	5,6
600	55,0	43,0	1572	5,5

[0081] Se apreciará que se pueden hacer muchas modificaciones y mejoras al método básico y al producto

descrito en el presente documento.

[0082] Por ejemplo, los métodos para separar ADN de peptidoglicano u otros contaminantes; y la precipitación de los biopolímeros se puede variar, por ejemplo, mediante el ajuste del pH o mediante la adición de
5 sales similares al CaCl_2 o incluso a disolventes orgánicos.

[0083] Otras posibles modificaciones serán evidentes para el experto en la materia.

REIVINDICACIONES

1. Uso de biopolímeros para eliminar el fósforo de las aguas residuales, en el que los biopolímeros se aíslan mediante el siguiente método:
5
- i) romper las paredes celulares bacterianas de las bacterias presentes en los lodos de aguas residuales en al menos un 75 % para liberar el contenido intracelular de las células bacterianas; y
 ii) separar los biopolímeros de cualquier contaminante presente.
- 10 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el método para aislar los biopolímeros además comprende la etapa de:

 eliminar sustancias poliméricas extracelulares (SPE) de las células bacterianas en el lodo de aguas residuales antes de romper las paredes celulares bacterianas.
15
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el método de aislamiento de los biopolímeros además comprende la etapa de:

 precipitar los biopolímeros solubles del lisado celular antes de separar los biopolímeros de cualquier contaminante
20 presente.
4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que los biopolímeros solubles precipitados comprenden ácidos nucleicos.
- 25 5. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el lisado celular se digiere anaeróbicamente y el peptidoglicano presente en el lisado celular se separa y se aísla.
6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el lodo de aguas residuales es un lodo biológico.
30
7. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las paredes celulares bacterianas rotas se muelen para dispersar o disolver el peptidoglicano presente en las mismas.
8. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) se eliminan usando medios mecánicos, medios químicos o tratamientos enzimáticos.
35
9. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las paredes celulares bacterianas se rompen por medio de uno o más de: ultrasonificación, y/o molinos de bolas, y/o tratamientos cáusticos.
- 40 10. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el peptidoglicano presente en el lisado celular se separa y se aísla del ADN celular.
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el lisado celular se digiere anaeróbicamente o se filtra.
45
12. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que los biopolímeros se tratan antes, durante o después de la etapa de precipitación con uno o más productos químicos.