(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 742 879**

(51) Int. CI.:

C12N 1/14 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C22B 3/18 (2006.01)
C12R 1/44 (2006.01)
C12R 1/46 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2015 E 15162520 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2940122**

(54) Título: **Cepas bacterianas y hongos que disuelven $CACO_3$**

(30) Prioridad:

28.04.2014 TR 201404763

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2020

(73) Titular/es:

YEDITEPE UNIVERSITESI (100.0%)
Inonu Mahallesi Kayisdagi Caddesi 26 Agustos Yerlesimi Kadikoy
34755 Istanbul, TR

(72) Inventor/es:

SAHIN, FIKRETTIN;
YILMAZER, GONCA ALTIN;
YAZICI, MÜGE y
EROGLU, SECKIN

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Cepas bacterianas y hongos que disuelven $CACO_3$

Campo de la invención

La presente invención se refiere a cepas bacterianas y aislados fúngicos que pueden disolver el mineral $CaCO_3$ en el mineral de magnesita a través de mecanismos biológicos.

Antecedentes de la invención

La magnesita es un mineral, que teóricamente comprende 47.8% de MgO y 52.2% de CO_2 y una cantidad traza de Fe_2O_3, y cuya gravedad específica varía en el intervalo de 2.9-3.1 g/cm^3 dependiendo de su contenido. La magnesita, que es la principal fuente de elementos de magnesio y diversos compuestos de los mismos, se puede usar en muchos campos, desde la producción de ladrillos refractarios hasta productos farmacéuticos (Ozdemir et al., 2009). Debido al hecho de que el magnesio es un elemento reactivo, el mineral de magnesita no está presente en ninguna fuente con una pureza que permita su uso directo (Bentl^1 et al., 2004). Los minerales de magnesita contienen diversas cantidades de elementos Ca, Si, Fe, Mg y Al como impurezas (Gürcan et al., 2012). Las impurezas alrededor de la magnesita deben eliminarse para que sea comercialmente utilizable. A medida que aumenta la pureza del mineral, también aumenta su valor. Por lo tanto, el mineral se somete a diversos procedimientos físicos y químicos, tales como la separación magnética, la clasificación manual, la separación de medios pesados y la flotación (Gence, 2001). La tecnología de procesamiento de magnesita comienza con la extracción de mineral del depósito mineral. El mineral se somete a diversos procedimientos de enriquecimiento después de ser extraído del depósito. El procedimiento de enriquecimiento es la separación del mineral de los minerales de la ganga. Los minerales característicos de la ganga de magnesita cristalina son dolomita, biotita, granate, talco, cuarzo; y de gel magnesita son serpentina y ópalo. En general, los métodos de triaje (clasificación manual), enriquecimiento en medio pesado, separación magnética, separación electrostática, enriquecimiento por flotación, calcinación y enriquecimiento óptico se usan para el enriquecimiento de magnesita (Kocaefe 1982; Erdog^{1}ğan and Y^{1}ld^{1}z 1995). El método de enriquecimiento de medio pesado se basa en la diferencia de densidad entre el material de magnesita y los minerales de la ganga. El ferrosilicio (6,8 g/cm^3), que es un material muy denso, se usa para este procedimiento. Con este método, las sustancias que son más densas que el ferrosilicio precipitan mientras que las sustancias más ligeras flotan. La clasificación manual es un método de observación, que se basa en el poder humano. La magnesita se separa de los otros minerales según las diferencias de color.

El método de enriquecimiento magnético es un tipo de separación basada en las propiedades magnéticas de los minerales. El enriquecimiento magnético se usa para separar los materiales de la ganga ferromagnéticos y paramagnéticos de la magnesita, ya que la magnesita es un mineral no metálico y no magnético. La flotación es un método de enriquecimiento para separar la magnesita del carbonato de calcio y la sílice, en el que se usan ácido oleico y una pequeña cantidad de dióxido de carbono como medio. La desventaja más importante de este método es el coste. Debido al alto coste de este método, se prefiere más el enriquecimiento magnético y los métodos de clasificación manual (Özdemir et al., 2009). La calcinación es el procedimiento de obtención de una magnesita más densa y sólida calentando a altas temperaturas y eliminando el dióxido de carbono. Cuando la magnesita se calienta a 650-1100 °C de manera controlada, se obtiene magnesita calcinada. Esta magnesita es reactiva. Cuando la magnesita se calienta hasta 1400-1800 °C, se obtiene magnesita sinterizada. Esta magnesita es ligeramente reactiva (Chen and Tao, 2004). Debido a razones económicas, los métodos de enriquecimiento más comunes son la clasificación manual, la separación magnética y la calcinación (Gence, 2001; Demir and Dönmez, 2009). Si bien estos métodos físicos y químicos se usan ampliamente para el tratamiento de sedimentos contaminados con metales, tienen desventajas tales como el alto coste y la gran cantidad de desechos que resultan debido a que los minerales de baja calidad no se pueden enriquecer, la cantidad de producto recuperado es baja, los materiales refractarios se usan en muchos procedimientos y se requieren grandes cantidades de energía (Rulkens 1995; Sever 2006). Además, los investigadores de muchos países llevan a cabo estudios sobre aplicaciones biológicas en la minería durante los últimos 40 años (Hoque and Philip, 2011). Este procedimiento, que se define como biominería, ha proporcionado una alternativa a los métodos físicos y químicos (Rawlings and Johnson, 2007; Brierley, 2008; Appana et al., 2011). La biominería, que es un método económico incluso en minas amigables con el medio ambiente y de baja calidad en comparación con los métodos convencionales, todavía se usa en minas de cobre, oro, plata, cobalto, níquel, molibdeno, zinc y plomo con microorganismos de *cidithiobacillus ferrooxidans, Acidithiobacillus thiooxidans, Leptospirillum ferrooxidans* ve *Leptospirillum ferriphilum* (Baret and Hughes, 1993; Watling, 2006; Siddiqui et al., 2009; Hoque and Philip, 2011).

El Documento de la Patente China No. CN102976640, una solicitud en el estado de la técnica, describe la obtención de magnesita de alta calidad y la calcinación llevada a cabo a una temperatura súper alta para obtenerla.

El Documento de la Patente China No. CN103241751, una solicitud conocida en el estado de la técnica, describe la obtención de un óxido de magnesio de alta pureza. Dicho documento también describe la descarga de una gran cantidad de dióxido de carbono y su eliminación del medio ambiente.

El Documento de la Patente China No. CN102126734, una solicitud del estado de la técnica, describe que se llevan a cabo procedimientos de lavado y neutralización para obtener magnesita.

Gulluce M. et al; describe la identificación convencional y molecular de bacterias con potencial de enriquecimiento de magnesita de canteras locales en Erzurum.

Orhan Furkan et. al; describe la identificación y aplicación de bacterias que disuelven $CaCO_3$ en canteras de magnesita.

Yanmis Derya et. al; el potencial de enriquecimiento de la magnesita mediante el uso de algunos actinomicetos aislados de cuevas.

Gangavarapu subrahmanyam et. al; bacterias que disuelven el carbonato de la "milolita", una piedra caliza bioclástica de la India.

Resumen de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar nuevas cepas bacterianas y aislados fúngicos que permitan enriquecer la magnesita.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar nuevas cepas bacterianas y aislados fúngicos que proporcionen un procedimiento de disolución más económico y respetuoso con el medio ambiente que los métodos conocidos.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar nuevas cepas bacterianas y aislados fúngicos que permitan enriquecer minas de baja calidad.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar nuevas cepas bacterianas y aislados fúngicos en los que no se usan productos químicos durante el procedimiento de disolución, y que no descargan desechos peligrosos para el medio ambiente.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar nuevas cepas bacterianas y aislados fúngicos que no consuman mucha energía durante la descalcificación.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar nuevas cepas bacterianas y aislados fúngicos que eliminen el coste de transporte de la mina, ya que se puede aplicar en un depósito mineral.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar nuevas cepas bacterianas y aislados fúngicos que disminuyan la mano de obra y reduzcan el coste del trabajador, ya que elimina una gran cantidad de etapas del procedimiento en comparación con los métodos conocidos en la descalcificación.

Descripción detallada de la invención

Las “cepas bacterianas y aislados fúngicos que disuelven $CaCO_3$ biológicamente” desarrollados para cumplir el objetivo de la presente invención se ilustran en las figuras adjuntas en las que,

La figura 1 es la representación gráfica de la desmineralización de magnesita de la cepa *Enterecoccus spp.* y el contenido libre de Mg y Ca.

La figura 2 es la representación gráfica de la desmineralización de magnesita de la cepa *Lactococcus spp.* y el contenido libre de Mg y Ca.

La figura 3 es la representación gráfica de la desmineralización de magnesita de la cepa Staphylococcus spp. y el contenido libre de Mg y Ca.

La figura 4 es la representación gráfica de la desmineralización de magnesita de la cepa Neurospora spp. y el contenido libre de Mg y Ca.

Se usan tres cepas de bacterias microbianas para descalcificar la magnesita según la presente invención. Una de las cepas de la presente invención se depositó en United States Department of Agriculture Research, Education and Economics Agricultural Research Service on November 29, 2008. De acuerdo con lo anterior, el número de depósito de la cepa llamada *Lactococcus garviae* A1 se registró como NRRL B-50196. Las otras dos cepas de la presente invención se depositaron en Leibniz Institute DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)) on October 17, 2013.

De acuerdo con lo anterior, números de depósito de la cepa *Staphylococcus warneri* GSK1 y el aislado *Neurospora tetrasperma* GNT1se registraron como DSM 27873 y DSM 27874 respectivamente.

Para obtener magnesio de alta pureza a partir de magnesita, se debe eliminar $CaCO_3$ (carbonato de calcio) en el medio.

Las cepas *Enterococcus* spp.y *Lactococcus* spp. se aislaron de la roca. *Staphylococcus warneri* y *Neurospora tetrasperma* se aislaron de una mina de magnesita. Mientras que los aislados de las bacterias *Enterococcus spp. Lactococcus* spp., *Staphylococcus warneir* son bacterias grampositivas, *Neurospora tetrasperma* es un hongo. Los microorganismos de la presente invención son mesofílicos ya que están aislados del entorno natural.

Estudios experimentales

Se usó mineral de magnesita granulada ($MgCO_3$) en los estudios experimentales. Al realizar estudios experimentales en un medio que contiene carbonato de calcio, se preparó un medio con magnesita. En preparación del medio; Se usaron 5 g de extracto de levadura, 5 g de glucosa, 6 g de magnesita ($MgCO_3$) y 500 ml de agua. El medio se esterilizó usando un autoclave. Las cepas de *Enterococcus* spp. *Lactococcus* spp. *Staphylococcus warneri* y el aislado de Neurospora tetrasperma se inocularon en el medio que contenía magnesita y se incubaron a 30 °C y 150 rpm (Sharafi et al. 2010). Se tomaron muestras durante el estudio a ciertos intervalos para realizar mediciones. Los análisis elementales se realizaron con el dispositivo ICP-MS. Las muestras, que se tomaron en una cabina estéril, se filtraron a través de un filtro de 0.2 μm. Las muestras filtradas se diluyeron a 100 μl/10 ml (filtrado/HNO_3 al 2%) y el dispositivo ICP-MS midió la cantidad de Mg y Ca.

Aunque estos microorganismos se usan solos en la purificación de magnesio, también se pueden usar en diferentes combinaciones entre sí.

Resultados experimentales

Se incubaron las esporas *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Staphylococcus warneir* y aislado de *Neurospora tetrasperma* en el medio que contiene magnesita; y se realizaron análisis elementales por medio de ICP-MS para medir la cantidad de Mg y Ca libres (Danadurai et al., 2011). Los resultados para la desmineralización de magnesita al final de la medición se muestran en las figuras 1, 2, 3, 4.

El magnesio libre que se libera como resultado de la desmineralización se muestra en la figura 1. El contenido de calcio libre que aumenta al mismo tiempo muestra que la cepa de *Enterecoccus* spp. disuelve el $CaCO_3$. Mientras que las columnas que nombramos como el total muestran los contenidos iniciales de Mg y Ca, las otras columnas muestran el contenido libre de Mg y Ca que se liberan al ser disueltos por los microorganismos a tiempo. Se observaron los mismos resultados cuando se usaron los otros microorganismos de la presente invención (Figura 2, 3, 4).

Los microorganismos de la presente invención pueden estar en forma de una solución líquida o sólida, polvo, gránulo.

Los microorganismos bacterianos se aplican para la desmineralización de las minas, la eliminación de la obstrucción en los sistemas de riego y la descalcificación de suelos alcalinos haciéndolos fértiles.

Referencias

Appanna, V., Lemire, J.,Hnatiuk, R., 2011. "Biomining: A Gren Technology to Mine Valuable Metals". Available on site

Barrett, J.,Hughes, M.N., Karavaiko, G.I.,Spencer, P.A., (Eds.), "Metal Extraction by Bacterial Oxidation of Minerals" Ellis Horwood Limited, 1993.

Bentl , I., Erdg'ğ;an, N., Birici, B., Topal, U., and Ş;ahbaz, O., 2004. "Manyezit ara ürünün kalsinasyon- manyetik ay1 rma yöntemleriyle zenginleŞ;tirilmesi" J. *Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu, Izmir, Türkiye*

Brierley, C. L., 2008. "How will biomining be applied in future?". Trans. Nonferrous.Met. Soc. Of China, 1302-1310

Chen, G.,and Tao, D., 2004. "Effect of solution chemistry on flotability of magnesite and dolomite". Int. J. Miner. Process. 74:343- 357

Danadurai, K.S.K.,Chellam, S., Lee, C., and Fraser, M.P., 2011."Trace elemental analysis of airborne particulate matter using dynamic reaction cell inductively coupled plasma - masss pectrometry: Application to monitoring episodic industrial emission events". AnalyticaChimicaActa686 : 40-49

Erdo'ğ;an N1, Y ld1 z R, 1995. *Manyezit ve Bazit Refrakter Malzeme Teknolojisi,* Kuma$1, Kütahya, 150s.

Refrakter Malzeme Teknolojisi, Kuma $1, Kütahya, 150s.

Gence, N., 2001. "Enrichment of magnesiteore". Eng.&Arch.Fac.OsmangaziUniversity, Vol.XIV(2*)*

Gürcan, H., Sesver, A., Ozdemir, N., Ozdemir, B., 2012."Cryptocrystalline and Macrocrystalline Magnesite Ores: Comparing Microstructures and Thermal Behaviour".http://www.arber.com.tr/imps2012.org/proceedingsebook/ Abstract/ ab sfilAbstractSubmissionFullContent386.pdf

Hoque, E.,and Philip, O.J., 2011. "Biotechnological recovery of heavy metals from secondary sources- An overview". MaterialsScienceandEngineering C, 57-66

Kocaefe M. 1982. Manyezit envanteri, MTA Yay1nlar1, Ankara.

Ozdemir, M., Çak1, D., K1pçak, I., 2009."Magnesium recovery from magnesite tailings by acid leaching and production of magnesium chloride hexahydrate from leaching solution by evaporation". *Int. J. Miner. Process.* 93:209-212

Rawlings, D. E., and Johnson, D. B., 2007."The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia". Microbiology, 153: 315-324

Rulkens WH, Grotenhuis, JTC, Tichy R, 1995. Methods of cleaning contaminated soils and sediments. In: Salomons W. Förstner U, Mader P. (Eds.) Heavy- Metals. Springer, Berlin, pp, 151-191.

Sever E, 2006. Iskenderun Demir Çelik Fabrikası At1 klarına Biyoliç Uygulaması. Yükseklisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye.

Sharafi, S.M.,Rasooli, I., Beheshti-Maal, K., 2010. "Isolation, characterization and optimization of indigenous acetic acid bacteria and evaluation of their preservation methods". Iranian Journal of Microbiology,2 : 41-48

Siddiqui, M. H., Kumar, A., Kesari, K. K., and Arif, J. M., 2009."Biomining - A UsefulApproachToward Metal Extraction". American-EurasianJournal of Agronomy 2, 2:84-88

Watling, H R., 2006."The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides-A review". Hydrometallurgy, 84:81-108

REIVINDICACIONES

1. La cepa bacteriana A1 que disuelve carbonato de calcio y magnesita que se deposita con el número NRRL B-50196.

2. La cepa bacteriana GSK1 que disuelve carbonato de calcio y magnesita que se deposita con el número DSM 27873.

3. Aislado fúngico GNT1 que disuelve carbonato de calcio y magnesita que se deposita con el número DSM 27874.

4. Cepas bacterianas y aislado fúngico que disuelven el carbonato de calcio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se pueden aplicar juntos en combinación.

5. Cepas bacterianas y aislado fúngico que disuelven el carbonato de calcio según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se pueden aplicar en campos de desmineralización de minas, eliminación de obstrucciones en los sistemas de riego y descalcificación de suelos alcalinos haciéndolos fértiles.

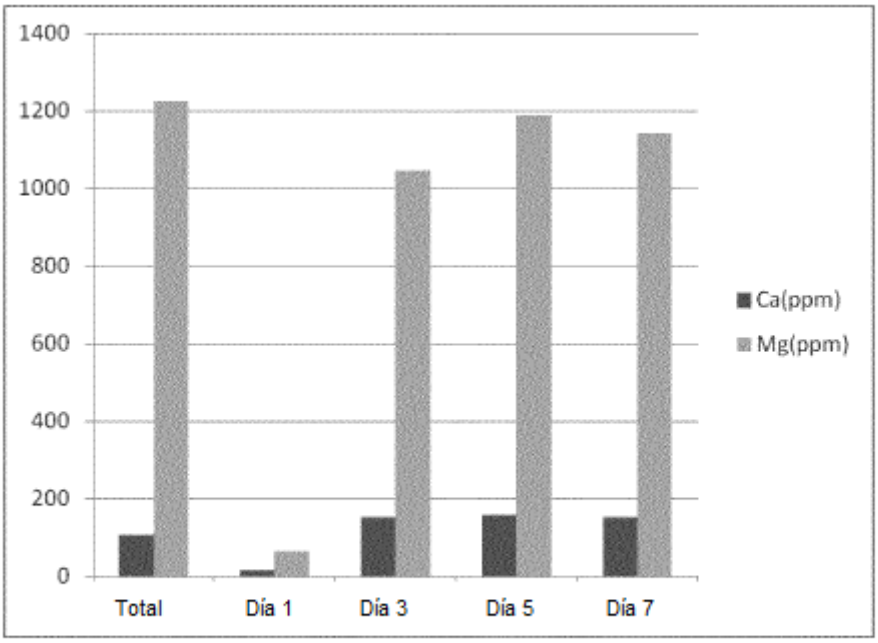

Figura 1

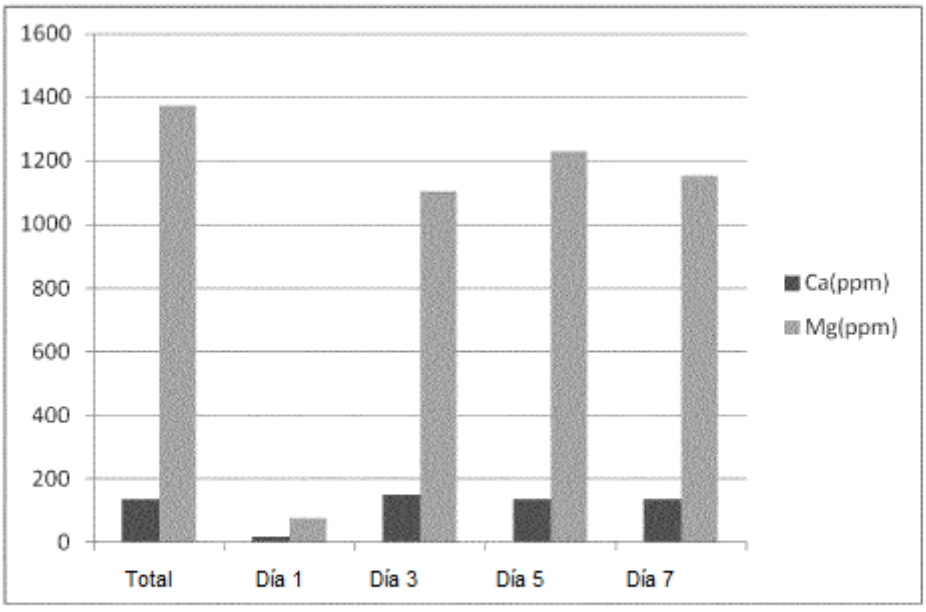

Figura 2

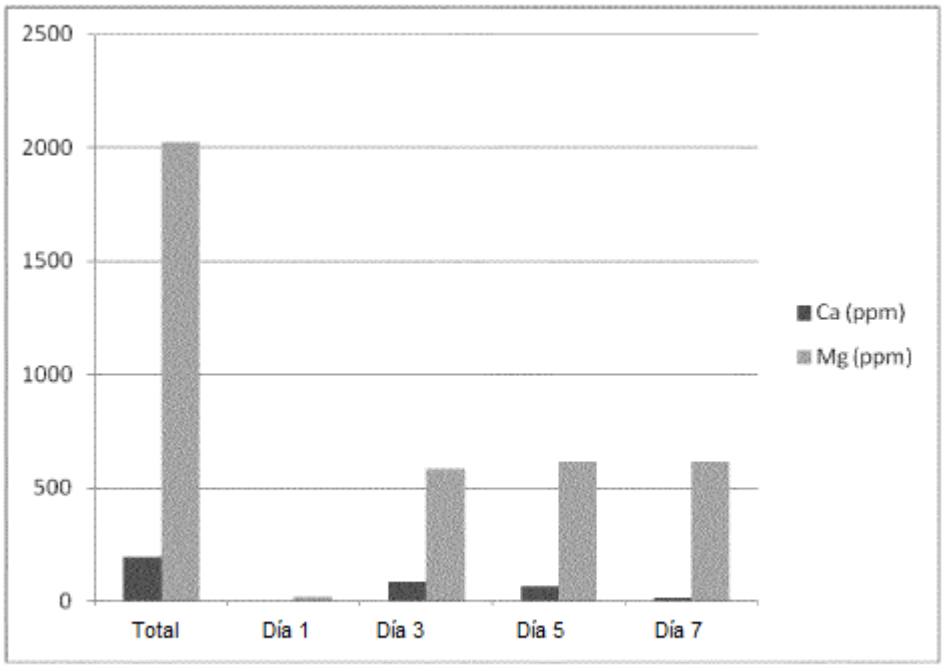

Figura 3

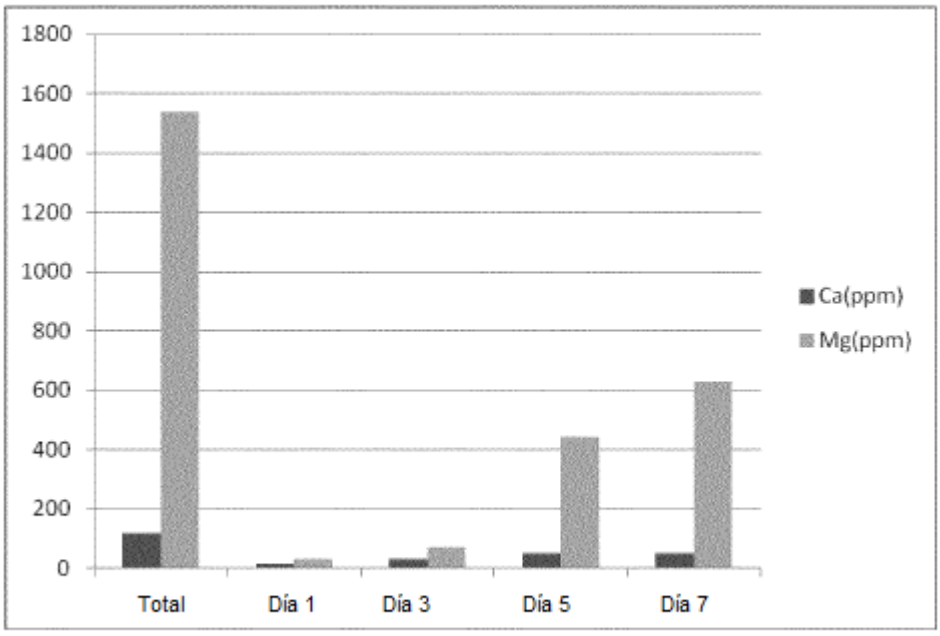

Figura 4