

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 373**

21 Número de solicitud: 201831189

51 Int. Cl.:

**C02F 3/34** (2006.01)

**C02F 101/30** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**07.12.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**08.06.2020**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)  
HOSPITAL REAL. AVDA DEL HOSPICIO S/N  
18071 GRANADA ES**

72 Inventor/es:

**ARANDA BALLESTEROS, Elizabet;  
GONZÁLEZ LÓPEZ, Jesús;  
POZO LLORENTE, Clementina;  
CALVO SAINZ, Concepción;  
OLICÓN HERNÁNDEZ, Darío Rafael;  
ROBLEDO MAHÓN, Tatiana y  
CAMACHO MORALES, Reyna Lucero**

54 Título: **HONGOS ASCOMICETOS PARA LA ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS PRESENTES EN MEDIOS ACUOSOS**

57 Resumen:

Hongos ascomicetos para la eliminación de contaminantes orgánicos presentes en medios acuosos.

La presente invención describe la utilidad de hongos ascomicetos para la eliminación de contaminantes orgánicos presentes en medios acuosos, y más particularmente para la eliminación de compuestos aromáticos de menos de 4 anillos, preferentemente fármacos del grupo de los antiinflamatorios no esteroideos. Los resultados muestran eficiencias de eliminación de hasta el 100% de los fármacos contenidos en el agua.

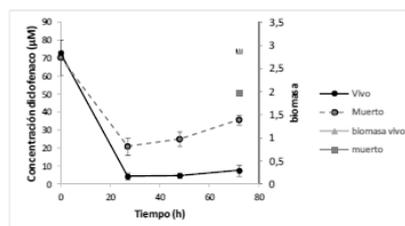


Figura 3

**DESCRIPCIÓN****HONGOS ASCOMICETOS PARA LA ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS PRESENTES EN MEDIOS ACUOSOS**

5

**SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención se enmarca dentro del campo de la biorremediación. Concretamente, se describe la utilidad de hongos ascomicetos para la eliminación de contaminantes orgánicos presentes en agua, y más particularmente para la eliminación de compuestos aromáticos de menos de 4 anillos.

La invención es especialmente útil para la eliminación de fármacos, y más concretamente fármacos del grupo de los antiinflamatorios no esteroideos.

15

**ESTADO DE LA TECNICA**Contaminantes emergentes

En los últimos años, los contaminantes emergentes han despertado un notable interés, social y medioambiental, debido a su presencia en cantidades trazas en la mayor parte de masas de agua. Su entrada en los ecosistemas parece estar relacionado con una ineficacia en los actuales sistemas de depuración que se lleva a cabo en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), además de otros factores. Dentro de este amplio grupo de sustancias cabe destacar la presencia de fármacos, cuyo efecto sobre las poblaciones microbianas y los ecosistemas determina que, a pesar de su baja concentración, su presencia y efecto prolongado pueda provocar cambios en las poblaciones microbianas, fenómenos de resistencia bacteriana a antibióticos y efectos que, a día de hoy, se desconocen en la salud humana.

Los avances en las técnicas analíticas han puesto de manifiesto que una gran cantidad de masas de aguas corren un alto riesgo de no lograr los límites de calidad exigidos [Directiva 2013/39/UE]. Esto se debe fundamentalmente a la presencia, en aguas regeneradas y aguas de consumo, de cantidades trazas de plaguicidas, metales pesados, fármacos e hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs, del inglés "*polycyclic aromatic hydrocarbons*") conocidos bajo el término de micro-contaminantes orgánicos (OMPs, del inglés "*organic micropollutants*"). La principal característica de los OMPs es su presencia en cantidades muy bajas (de µg/L o

menor) y en ellos se engloban contaminantes emergentes (CEs) (o no regulados) y prioritarios.

Dentro de los CEs, se encuentran los fármacos, como los antibióticos, cuya presencia en concentraciones puntuales en el suelo y el contacto prolongado con los acuíferos y aguas subterráneas pueden provocar cambios en las comunidades microbianas [Ding, C, & He, J, (2010). App. Microbiol. Biotechnol. 87(3):925-941] y la adquisición de resistencias bacterianas a fármacos [Kümmerer, K, (2009). J. Environ. Manag. 90(8): 2354-2366]. La presencia de estos fármacos en los cuerpos de aguas naturales, se debe principalmente a las descarga de los efluentes de las EDAR (Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales).

A pesar de existir estudios y nuevas tecnologías para mejorar el problema de los ECs, fundamentalmente durante los tratamientos biológicos secundarios (proceso de fangos activos y empleo de filtros de membrana), muchos de ellos no están diseñados para alcanzar una completa eliminación de estas sustancias. Por otro lado, algunas de estas tecnologías, fundamentalmente las que se realizan durante los tratamientos terciarios o avanzados, presentan una alta eficacia, sin embargo, resultan muy costosas, por lo que su uso debe limitarse a casos en los que otro tipo de tratamiento no puede aplicarse.

Es por ello que se requiera el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan una eliminación de estas sustancias.

#### Biorremediación mediante hongos

Los hongos representan un grupo de microorganismos poco estudiados y los cuales poseen la capacidad bioquímica y ecológica para degradar sustancias orgánicas, disminuir el riesgo asociado a metales, metaloides y radionúclidos, tanto por modificación química como por la alteración en su biodisponibilidad.

En este contexto, los hongos que habitan en ambientes altamente contaminados representan una alternativa como agentes de biorremediación debido a su gran resistencia y al potencial en la transformación de contaminantes ambientales.

En estos ambientes, la presión selectiva les hace adquirir una cierta plasticidad fenotípica para garantizar la colonización de estos nichos adversos [Agosta, S. J., Klemens, J. A. (2008). Ecol. Lett. 11:1123-1134]. Así, no es infrecuente encontrar aislados fúngicos de estos ambientes capaces de degradar una gran variedad de compuestos aromáticos, como las estructuras químicas de muchos fármacos.

En los últimos años, se ha demostrado la capacidad de este tipo de hongos para transformar antiinflamatorios no esteroideos, disruptores endocrinos como el bisfenol A y el nonilfenol y antibióticos como las quinolonas, siendo en su mayoría hongos de los géneros *Penicillium* 5 *notatum*, *P. expansum*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y *Aspergillus fumigatus* [Zhang, C.L., et al., (2012). *Journal of Molecular Liquids*, 173, 184-186]; [Bouchiat, R., et al., (2015). *Desalination and Water Treatment*, 1-7]. Las rutas de degradación para estos compuestos, cuya característica común es la presencia de estructuras químicas aromáticas, se lleva a cabo por enzimas extracelulares, así como enzimas intracelulares, como enzimas de la familia del citocromo P450 monooxigenasa, epóxido hidrolasas y transferasas [Cerniglia, CE, (1993). 10 *Curr. Opin. Biotech.* 4: 331-338].

Además, los hongos se caracterizan por su capacidad de adsorber diferentes compuestos en sus paredes celulares de quitina.

15 Resulta por tanto de gran interés el desarrollo de tecnologías basadas en estos microorganismos, los cuales a día de hoy están muy poco explotados.

## 20 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

La presente invención describe una herramienta microbiológica basada en hongos ascomicetos, para eliminar contaminantes orgánicos emergentes, en particular compuestos aromáticos de menos de 4 anillos, presentes en medios acuosos (normalmente aguas residuales),

25 Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de eliminación de contaminantes en agua que emplea hongos filamentosos, preferentemente de la división *Ascomycota*, más preferentemente del orden *Eurotiales* aún más preferentemente de la familia *Aspergillaceae*.

30 En dos realizaciones preferidas, se emplean los hongos *Penicillium oxalicum* o *Aspergillus tubingensis*.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un sistema de eliminación de contaminantes 35 presentes en agua, preferentemente fármacos, basado en la actividad de estos hongos filamentosos.

Los resultados obtenidos indican que los modelos fúngicos degradan de manera diferente contaminantes como el bisfenol A o distintas variedades de fármacos como diclofenaco, carbamacepina, o ciprofloxacino, encontrando eficiencias de eliminación hasta del 100% para  
5 unas especies químicas, como antiinflamatorios no esteroideos.

Así, en una realización preferida, la invención se refiere a un procedimiento para la eliminación de compuestos antiinflamatorios, preferentemente antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), empleando dichos hongos.

10

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.-** Representa la evolución del contenido en diclofenaco (línea roja) en los medios de cultivo incubados con distintas especies: *Penicillium oxalicum* (a), *P. chrysogenum* (b), *P. commune* (c), *P. verrucosum* (d), *P. echinulatum* (e), *P. janczewskii* (f) y *P. purpurogenum* (g) comparadas con su respectivo control inactivado por calor (línea negra). Los datos representan el valor promedio de tres réplicas biológicas independientes y las barras de error la desviación estándar. Se representa la biomasa expresada en g L<sup>-1</sup> (línea verde) y la variación del pH a lo largo del proceso (línea naranja).

20

**Figura 2.-** Representa la evolución del contenido en diclofenaco (línea roja) en los medios de cultivo incubados con las especies: *A. tubingensis* (a) *A. niger* (b), *A. europaeus* (c), *A. versicolor*, (d), *A. nidulans* (e), *A. terreus* (f) y *A. clavatus* (g) y comparadas con su respectivo control inactivado por calor (línea negra) en medios de cultivo líquido. Los datos representan  
25 el valor promedio de tres réplicas biológicas independientes y las barras de error la desviación estándar. Se representa la biomasa expresada en g L<sup>-1</sup> y la variación del pH a lo largo del proceso.

30

**Figura 3.-** Resultados del ensayo de degradación de diclofenaco empleando dos cultivos, uno de *Penicillium oxalicum* y otro de *Aspergillus tubingensis*, de forma simultánea.

35

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### Definiciones

35

“*Penicillium oxalicum*” se refiere al hongo perteneciente al género *Penicillium* y especie *oxalicum*, que se engloba dentro de la subdivisión de *Ascomycota*, concretamente en la clase *Eurotiomycetes*, y más concretamente en el orden de los *Eurotiales*, perteneciente a la familia de los *Aspergillaceae*.

5

En una realización particular, el término “*Penicillium oxalicum*” se refiere también a hongos del género *Penicillium* con una identidad genética superior al 90%, preferentemente al 95%, más preferentemente al 99% con *Penicillium oxalicum*.

10

“*Aspergillus tubingensis*” se refiere al hongo perteneciente al género *Aspergillus* y especie *tubingensis*, que se engloba dentro de la subdivisión de *Ascomycota*, concretamente en la clase *Eurotiomycetes*, y más concretamente en el orden de los *Eurotiales*, perteneciente a la familia de los *Aspergillaceae*.

15

En una realización particular, el término “*Aspergillus tubingensis*” se refiere también a hongos del género *Aspergillus* con una identidad genética superior al 90%, preferentemente al 95%, más preferentemente al 99% con *Aspergillus tubingensis*.

20

Por “eliminación de fármacos” se entenderá tanto la total eliminación de estos compuestos contaminantes en un medio como la reducción de su presencia en el medio, ya sea por degradación o descomposición en moléculas menos contaminantes.

25

El término “medio acuoso” se refiere a cualquier medio en estado líquido compuesto mayoritariamente por agua y, en particular, al agua.

30

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones el término “comprende”, que también podrá interpretarse como “consiste en”, y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

### **Procedimiento de la invención**

35

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la eliminación biológica de contaminantes orgánicos, en particular de compuestos aromáticos de menos de 4 anillos,

presentes en medios acuosos que emplea al menos un hongo ascomiceto, en adelante "procedimiento de la invención".

5 De forma preferente, el procedimiento de la invención emplea hongos *ascomycetes*, más preferentemente *ascomycetes* del orden *Eurotiales* y aún más preferentemente de la familia *Aspergillaceae*.

10 De forma aún más preferente, el procedimiento de la invención emplea hongos pertenecientes al género *Penicillium* y más preferentemente todavía, a la especie *oxalicum*.

15 En otra realización más preferente, el procedimiento emplea hongos del género *Aspergillus* y más preferentemente todavía, de la especie *tubingensis*.

20 En otra realización particular, el procedimiento de la invención emplea únicamente hongos de la misma especie, evitando la competencia entre distintas poblaciones.

25 En una realización preferente, la relación entre el peso del cultivo de hongos (biomasa) y el medio acuoso contaminado es de 2g/L.

30 Así, el procedimiento de la invención comprende poner en contacto el medio contaminado con un hongo o un cultivo de hongos *ascomycetes*, más preferentemente *ascomycetes* del orden *Eurotiales* y aún más preferentemente de la familia *Aspergillaceae*, preferentemente hongos pertenecientes al género *Penicillium* y especie *oxalicum*, al género *Aspergillus* y especie *tubingensis* o mezclas de ambos.

35 De forma particular, el procedimiento de la invención comprende las etapas de:

- a. Cultivar los hongos en cultivos líquidos mediante inoculación de esporas y dejar crecer hasta alcanzar una biomasa mínima de 2 g/L de biomasa seca por litro de medio acuoso contaminado; y
- b. Poner en contacto el medio acuoso contaminado con el cultivo obtenido en la etapa a).

A modo de ejemplo, para descontaminar 100 L de agua contaminada, será necesario obtener 200 g de biomasa en la etapa a).

En una realización preferente, la etapa a) se lleva a cabo durante al menos 2 días, preferentemente 2 días.

5 En una realización particular, el procedimiento de la invención es un procedimiento para eliminar al menos el 90%, preferentemente al menos el 95% y más preferente el 100% de contaminantes orgánicos presentes en medios acuosos, en particular compuestos orgánicos de menos de 4 anillos, preferentemente fármacos.

10 En una realización preferente, el procedimiento de la invención es útil para la eliminación de contaminantes como el bisfenol A

15 En una realización preferente, el procedimiento de la invención es útil para la eliminación de fármacos seleccionados del grupo formado por antiinflamatorios, anticonvulsivos y antibióticos, preferentemente diclofenaco, carbamacepina, o ciprofloxacino.

20 Se han encontrado eficiencias de eliminación hasta del 100% para algunas especies químicas, como antiinflamatorios no esteroideos, por lo que en otra realización preferente, el procedimiento de la invención es útil para la eliminación de compuestos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), y más preferentemente, para la eliminación total de diclofenaco presente en agua.

25 En una realización aún más preferente, el procedimiento de la invención es un procedimiento para eliminar 100% de diclofenaco presente en agua en 40h, preferentemente en 30h, más preferentemente en 24h. De forma particular, esta eficiencia se consigue empleando 2 g de biomasa por L de medio contaminado.

### **Sistema de la invención**

30 Un segundo objeto de la invención es un sistema con el que se lleva a cabo el procedimiento descrito previamente, en adelante "sistema de la invención", que comprende los medios necesarios para poner en contacto el hongo o los cultivos de hongos con los contaminantes orgánicos presentes en medios acuosos y proceder así a su degradación.

35 En una realización particular, este sistema comprende al menos los siguientes medios:

Recipientes para el cultivo del hongo, preferentemente matraces de vidrio que permitan mantener la misma relación medio de cultivo cantidad inicial de esporas fúngicas, con el medio anteriormente descrito. Dichos recipientes se taparán con tapón de algodón graso y se mantendrán en agitación a 120 rpm a una temperatura de 28 °C.

5

De forma preferente, el sistema puede comprender un biorreactor donde se cultive el hongo y se puedan añadir contaminantes emergentes al mismo, preferentemente un biorreactor de una capacidad de 3 L, con agitación mecánica y acoplado a una columna de burbujeo inferior.

10 Se pueden emplear biorreactores tipo *batch* o biorreactores en continuo.

En el caso de biorreactores en continuo, éstos dispondrán de un influente suministrado por bomba peristáltica y salida del efluente, con regulador de temperatura a 28 °C. El medio contendrá una fuente de carbono mínima de 3.5 g/L y una fuente de nitrógeno de 2 g/L. En cada caso se contará con electrodos para determinar temperatura, pH y oxígeno disuelto como medidas de monitoreo y control, así como una válvula de salida para la toma de muestras para determinaciones analíticas.

15

De forma preferente, el sistema comprende además un mecanismo de purga de biomasa que mejora su funcionamiento.

20

## **MODOS DE REALIZACIÓN**

25

Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## **Materiales y Métodos**

30

A continuación, se describe la procedencia de las especies empleadas en los diferentes ensayos.

35 La especie *Penicillium oxalicum* proviene de residuos de MARPOL (descargas portuarias de buques) de las instalaciones de CLH, Compañía Logística de Hidrocarburos y ha sido

identificado mediante técnicas moleculares [Aranda et al., Int. Biodeterior. Biodegradation. 2017. 122:141-150] y ha mostrado una alta eficacia en la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos [Aranda et al., Int. Biodeterior. Biodegradation. 2017. 122:141-150] así como una gran batería de contaminantes emergentes.

5

La especie *Aspergillus tubingensis* ha sido aislada de una pila de compostaje de lodos de depuradoras y ha mostrado una alta eficacia en la degradación de una gran diversidad de fármacos.

## 10 **Cuantificación**

La cuantificación de la tasa de desaparición de compuestos en los medios de cultivo se lleva a cabo empleando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución HPLC Agilent 1050, equipado con un detector de diodos (DAD) y una columna C18 Synergy Fusion 150x4.6 mm RP 80Å (Phenomenex®).

15

Estos compuestos se analizan con el equipo HPLC descrito según el método descrito a continuación usando como fase móvil acetonitrilo (Fase B) y tampón fosfato (fase A) y usando un gradiente al 85% de B. [Steffen KT, et al., (2002). Appl. Microbiol. Biotech. 60: 212-217]; [Aranda E, et al., (2009). Appl. Microbiol. Biotechnol. 82:1057-1066].

20

## **Cultivo**

El cultivo de cada hongo se ha llevado a cabo en medio definido Kirk modificado, con 5 g L<sup>-1</sup> de glucosa [Kirk, T.K. et al., (1978). Arch Microbiol. 117: 227-285]. Todos los hongos se cultivaron con una agitación y temperaturas definidas en matraces tapados

25

## 30 **Ejemplos de ensayos con los hongos de la invención**

Con estos dos ensayos se pretende demostrar los resultados obtenidos en la degradación de fármacos empleado este tipo de hongos, concretamente el fármaco seleccionado para llevar a cabo estos ensayos es el diclofenaco.

35

Ensayo 1. Se han realizado experimentos de degradación de diclofenaco con 6 especies de *Penicillium*: *P. chrysogenum*, *P. commune*, *P. purpurogenum*, *P. janczewskii*, *P. verrucosum* y *P. echinulatum* procedentes de distintas colecciones.

- 5 Para ello se ha sembrado y recolectado esporas de cada uno de los hongos empleados, y contabilizado con el fin de añadir el mismo número de esporas a cada ensayo ( $1 \times 10^5$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ) con objeto de alcanzar una biomasa fúngica mínima para que se lleve a cabo la degradación.
- 10 Cada experimento se ha llevado a cabo mediante el cultivo de cada hongo en medio definido Kirk modificado, con  $5 \text{ g L}^{-1}$  de glucosa [Kirk, T.K. et al., (1978). Arch Microbiol. 117: 227-285]. Este medio ha sido previamente comparado con otros medios de cultivo y seleccionado como el más apropiado para estos ensayos.
- 15 Este medio comprende: Glucosa ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ), Tartrato de amonio ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ), KCl, Extracto de levadura ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ), Solución mineral (1 mL), Peptona ( $4 \text{ g L}^{-1}$ ). Composición solución mineral:  $\text{B}_4\text{O}_2\text{Na}_2 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$  ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  ( $70 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$  ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$  ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ). El medio se ajusta a pH 4.5.
- 20 Todos los hongos se cultivaron en agitación a 120 rpm y a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  en matraces de 100 mL de capacidad con 25 mL del medio de cultivo descrito anteriormente y tapados con algodón hidrófilo. Una vez que se alcanzó la fase exponencial de crecimiento a las 24 h se les añadió el diclofenaco.
- 25 Para descartar posibles procesos de adsorción al micelio, se utilizaron como control un hongo inactivado por calor ( $120 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 min), crecido durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se añadió una concentración final de diclofenaco de  $100 \text{ } \mu\text{M}$ , para facilitar el método analítico.
- 30 Los cultivos de los hongos se mantuvieron en agitación a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ . Se sacrificaron los matraces pertinentes cada día durante un periodo total de 5 días para conseguir recuperar los compuestos adheridos al micelio y paredes del matraz.
- 35 Para medir la tasa de desaparición de los compuestos, los medios de cultivo se extrajeron con etanol (2:1 v/v), se sonicaron en un baño de ultrasonidos durante 10 min y el medio resultante se centrifuga 10 min a 12.000 rpm para posteriormente analizarlo con un equipo HPLC.

Todos los análisis se realizan por triplicado.

5 Además, se analizó la biomasa fúngica, el pH durante el transcurso del periodo, así como el consumo de azúcares de acuerdo con la metodología descrita [Miller, G.L., 1959. Analytical Chemistry, 31, 426] midiendo la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro.

10 Adicionalmente se ha estudiado la capacidad de producción de enzimas por estos hongos con el fin de corroborar la bibliografía que hay sobre la temática, analizándose actividades peroxidasas extracelulares y oxidoreductasas.

15 Ensayo 2. Se comprobó la capacidad de 6 especies de *Aspergillus* para reducir el diclofenaco en medios de cultivo líquidos. Concretamente las especies empleadas fueron: *A. niger*, *A. europaeus*, *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. terreus* y *A. clavatus* y se compararon con la especie *A. tubingensis*.

La metodología empleada fue la misma que la descrita en el apartado anterior.

## 20 Resultados

### Resultados obtenidos para las especies de *Penicillium*.

25 Como puede observarse en la figura 1 ninguno de los hongos estudiados, excepto el propuesto, fue capaz de eliminar el diclofenaco en el periodo de tiempo establecido.

Solamente *P. oxalicum* (Fig. 1a) es capaz de eliminar totalmente 100 µM de diclofenaco en un periodo de 24 horas. *P. oxalicum*, incluso a bajas cantidades de biomasa (1 g L<sup>-1</sup>) al inicio del experimento, lo que representa una clara ventaja a la hora del montaje de un posible biorreactor.

30 En el caso de *P. chrysogenum* (Fig. 1b) se detecta una leve absorción del diclofenaco a la biomasa fúngica (aprox. 20%), sin embargo, no se detecta disminución de la concentración del compuesto a lo largo del ensayo. En este caso, la biomasa fue superior a *P. oxalicum*, lo que podría explicar esta absorción al micelio detectada en la fase inicial del experimento.

35

El resto de especies, *P. commune* (Fig. 1c), *P. verrucosum* (Fig. 1d), *P. echinulatum* (Fig. 1e), *P. janczewskii* (Fig. 1f) y *P. purpurogenum* (Fig. 1g) no mostraron diferencias significativas en la reducción de este compuesto en el periodo estudiado.

- 5 En cuanto al contenido en azúcares (datos no mostrados), se determinó un contenido inicial de 5 g L<sup>-1</sup>, siendo esta la concentración de partida y se detectó una cantidad en la mayoría de las cepas de 2.3 g L<sup>-1</sup>, cantidad que no llegó a consumirse al finalizar el ensayo (datos no mostrados).
- 10 No se detectaron actividades enzimáticas perceptibles en ninguno de los hongos estudiados (datos no mostrados).

Resultados obtenidos para las especies de *Aspergillus*.

- 15 Como puede observarse en la figura 2, ninguno de los hongos estudiados, salvo el seleccionado, fue capaz de eliminar diclofenaco en el periodo de tiempo establecido.

*A. tubingensis* (Fig. 2a), la especie candidata, es capaz de eliminar el diclofenaco en un periodo de 48 h, con un contenido en biomasa de 2.8 g L<sup>-1</sup> que se mantuvo constante a lo largo del proceso. La captación de diclofenaco en el micelio fue imperceptible en todos los hongos estudiados.

20

*A. niger* (Fig. 2b) no eliminó el diclofenaco en el periodo de tiempo establecido, observándose un ligero aumento en la concentración del mismo como consecuencia de la concentración gradual del medio.

25

La biomasa se mantuvo en valores similares a *A. tubingensis* y mostró un pH de 6 con un leve aumento al final del proceso.

30 La especie *A. europaeus* (fig. 2c) no mostró ninguna reducción en el contenido inicial de diclofenaco con respecto a su control inactivado. Se detectó un leve aumento de la biomasa a lo largo del proceso y un pH en el medio de cultivo entre 5 y 6.

35 *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. terreus* y *A. clavatus* (Fig. 2d – 2g) no eliminó el diclofenaco en el periodo establecido y bajo las condiciones experimentales propuestas, observándose una

tendencia constante a lo largo de todo el experimento con una menor biomasa ( $1.2 \text{ g L}^{-1}$ ) a la detectada en *A. tubingensis*.

5 En cuanto al contenido en azúcares (datos no mostrados) al igual que ocurría en el caso de *Penicillium*, el contenido de glucosa no llega a consumirse en el tiempo establecido para el análisis.

10 No se detectaron actividades enzimáticas extracelulares perceptibles en ninguno de los hongos estudiados (datos no mostrados).

### **Conclusiones**

15 Así, en base a los resultados obtenidos, se puede afirmar que, de todos los hongos estudiados, solamente los dos hongos propuestos *P. oxalicum* y *A. tubingensis* son capaces de degradar diclofenaco en periodos muy cortos de tiempo. Estos hongos representan unos excelentes candidatos para la puesta a punto de un sistema que lleve a cabo el procedimiento de eliminar fármacos de aguas contaminadas.

20 Todas las especies se seleccionaron en base a la bibliografía disponible sobre la capacidad de degradar compuestos aromáticos por cepas de *Penicillium* y *Aspergillus*, concretamente PAHs y compuestos clorados [Marco-Urrea et al., 2015 New Biotechnol. 32:620 – 628] que pueden presentar una estructura aromática muy similar al compuesto seleccionado. Sin embargo, bajo las condiciones experimentales ensayadas y bajo las mismas condiciones de degradación para *P. oxalicum* y *A. tubingensis* ninguno de los hongos seleccionados es capaz  
25 de eliminar diclofenaco.

### **Ensayos conjuntos**

30 Para comprobar un posible efecto sinérgico entre las dos especies de hongos preferidas para llevar a cabo el procedimiento de la invención se inocularon  $0.5 \times 10^5$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  de *Penicillium oxalicum* y  $0.5 \times 10^5$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  de *Aspergillus tubingensis*.

35 Los resultados (Figura 3) muestran que no se consiguen eliminar antes el fármaco cuando ambos hongos están presentes, y en este caso no se consigue la eliminación del 100% del fármaco. Por otro lado se observa una fuerte adsorción del fármaco al micelio muerto, lo que

podría provocar un desprendimiento del compuesto a largo plazo, al no haber sido una transformación biológica.

5 La biomasa final fue muy similar a la biomasa detectada por *Penicillium oxalicum*, y las pruebas visuales mostraron un predominio de este hongo frente a *Aspergillus tubingensis*.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Procedimiento para la eliminación de compuestos aromáticos presentes en medios acuosos que emplea al menos un hongo ascomiceto.
- 5
- 2.- Procedimiento para la eliminación de compuestos aromáticos según reivindicación anterior, en el que los compuestos aromáticos presentan menos de 4 anillos.
- 3.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que emplea al menos un hongo de la familia *Aspergillaceae*.
- 10
- 4.- Procedimiento según reivindicación anterior que emplea al menos un hongo perteneciente al género *Penicillium* y especie *oxalicum*.
- 5.- Procedimiento según reivindicación 3 que emplea al menos un hongo perteneciente al género *Aspergillus* y especie *tubingensis*.
- 15
- 6.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que emplea únicamente hongos de la misma especie.
- 20
- 7.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende las etapas de:
- a. Cultivar los hongos en cultivos líquidos mediante inoculación de esporas y dejar crecer al menos 2 días, preferentemente 2 días hasta alcanzar una biomasa mínima de 2 g/L de biomasa seca por litro de medio acuoso contaminado; y
  - b. Poner en contacto el medio contaminado al cultivo obtenido en la etapa a).
- 25
- 8.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la eliminación de bisfenol A.
- 30
- 9.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la eliminación de fármacos.
- 35

10.- Procedimiento, según reivindicación anterior, donde los fármacos son compuestos anticonvulsivos, preferentemente carbamacepina.

5

11.- Procedimiento, según reivindicación 9, donde los fármacos son compuestos antibióticos, preferentemente ciprofloxacino.

12.- Procedimiento, según reivindicación 9, donde los fármacos son compuestos antiinflamatorios, preferentemente AINEs.

10

13.- Procedimiento, según reivindicación anterior, donde el fármaco es diclofenaco.

14.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, caracterizado porque la eliminación del contaminante es superior al 90%, preferentemente superior al 95% y más preferente del 100%.

15

15.- Procedimiento según reivindicación 13, que elimina el 100% de diclofenaco presente en agua en 40h, preferentemente en 30h, más preferentemente en 24h.

20

16.- Sistema para la eliminación de contaminantes orgánicos presentes en medios acuosos que comprende un cultivo de hongos ascomicetos y los medios necesarios para poner en contacto el cultivo de hongos con los contaminantes orgánicos presentes en el medio acuoso.

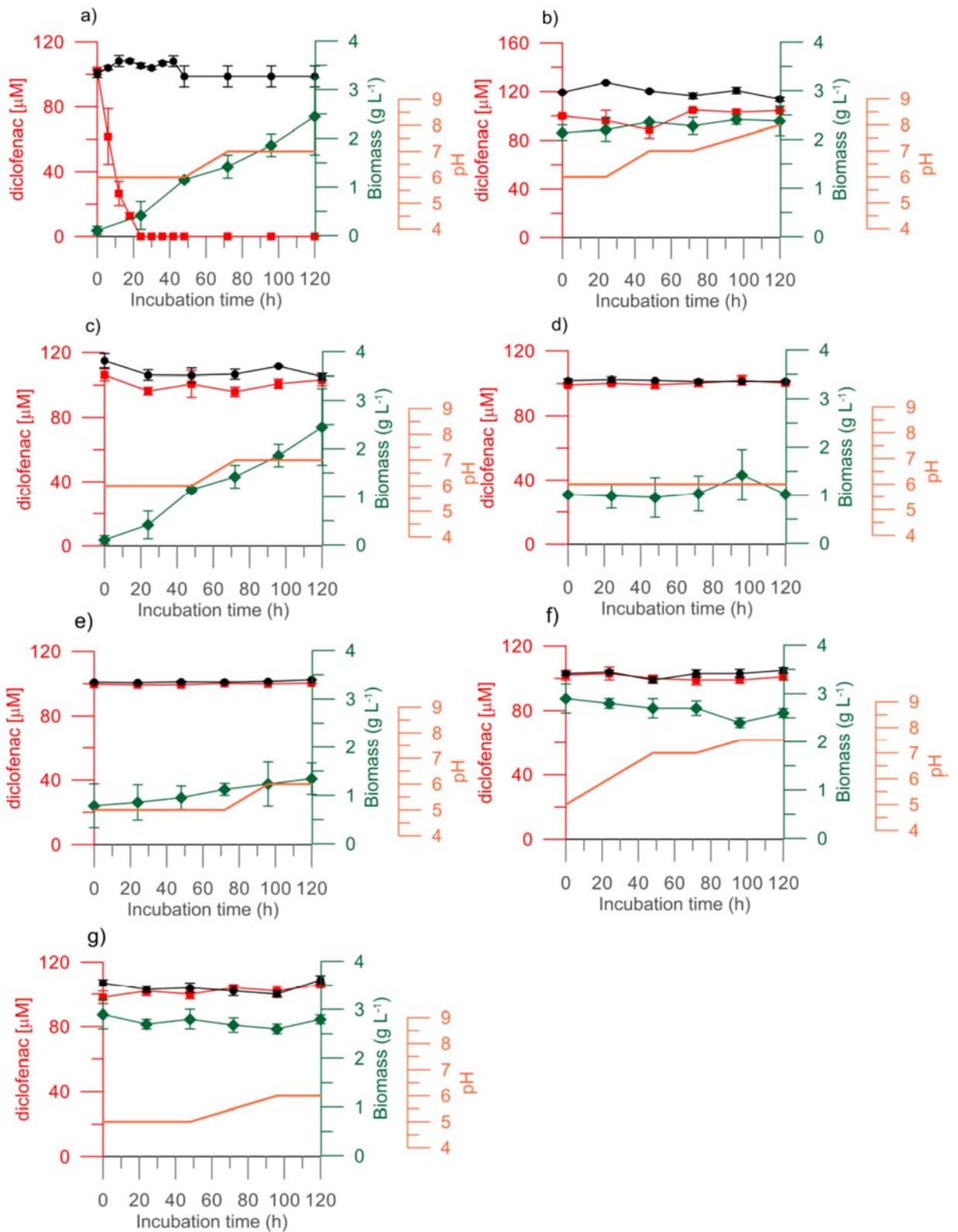


Figura 1

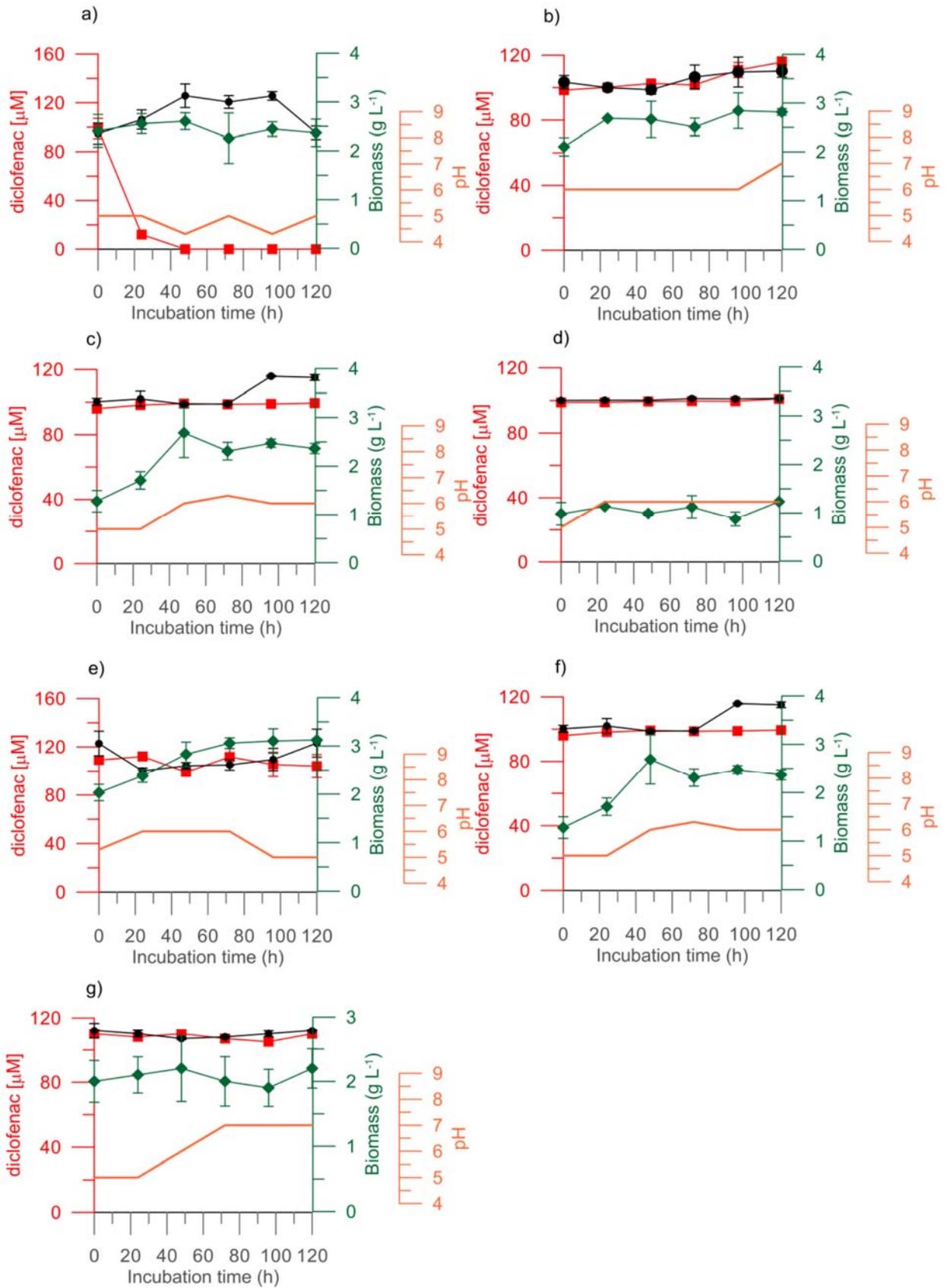


Figura 2

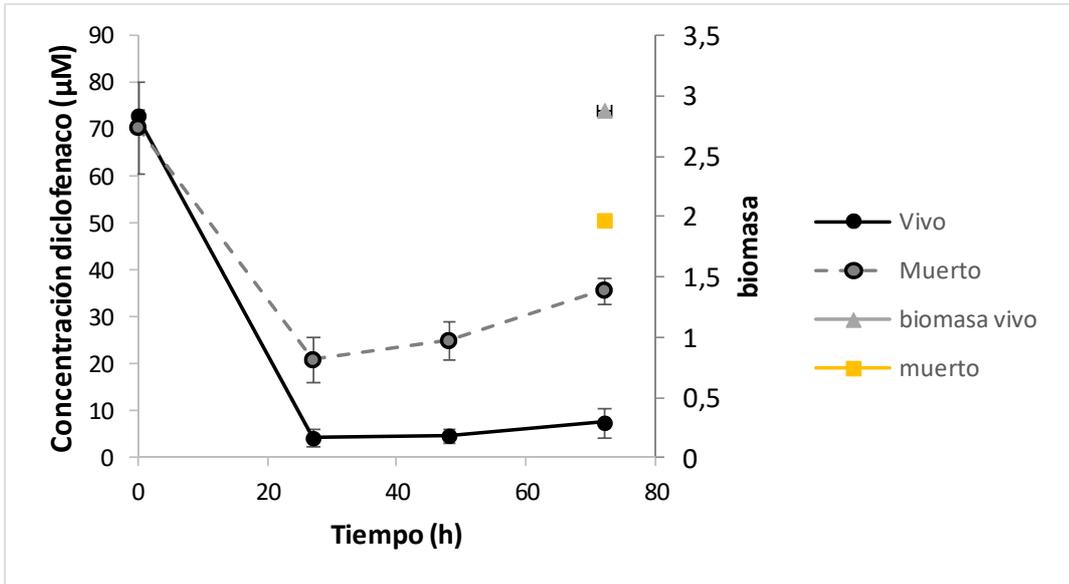


Figura 3



- ②1 N.º solicitud: 201831189  
②2 Fecha de presentación de la solicitud: 07.12.2018  
③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: **C02F3/34** (2006.01)  
**C02F101/30** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ARACAGOK Y DORUK et al. Biodegradation of diclofenac with fungal strains. Archives of Environmental Protection, 01/2018, vol. 44, (1), páginas 55-62, ISSN 2083-4772(print) ISSN 2083-4810(electronic), DOI: doi:10.24425/118181	1-3, 6, 7, 9, 12-16
X	GONDA SANDOR et al. Efficient biotransformation of non-steroid anti-inflammatory drugs by endophytic and epiphytic fungi from dried leaves of a medicinal plant, <i>Plantago lanceolata</i> L. International Biodeterioration & Biodegradation, 2016, vol. 108, páginas 115-121, ISSN 0964-8305(print) ISSN 1879-0208(electronic), DOI: doi:10.1016/j.ibiod.2015.12.018	1-3, 6, 7, 9, 12-16
X	HOFMANN U et al. Biochemical and physicochemical processes contributing to the removal of endocrine-disrupting chemicals and pharmaceuticals by the aquatic ascomycete <i>Phoma</i> sp. UHH 5-1-03. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, vol. 100, (5), páginas 2381 - 2399, ISSN 0175-7598 (print) ISSN 1432-0614 (electronic), DOI: doi:10.1007/s00253-015-7113-0 pubmed:26536880	1, 2, 6-16
X	MTIBAA RIM et al. Degradation of bisphenol A and acute toxicity reduction by different thermo-tolerant ascomycete strains isolated from arid soils. Ecotoxicology and Environmental Safety, 30/07/2018, vol. 156, páginas 87-96, ISSN 0147-6513(print) ISSN 1090-2414(electronic), DOI: doi:10.1016/j.ecoenv.2018.02.077	1, 2, 6-8, 16
X	SAROJ SAMTA et al. Biodegradation of azo dyes Acid Red 183, Direct Blue 15 and Direct Red 75 by the isolate <i>Penicillium oxalicum</i> SAR-3. Chemosphere, 2014, vol. 107, páginas 240-248, ISSN 0045-6535(print) ISSN 1879-1298(electronic), DOI: doi:10.1016/j.chemosphere.2013.12.049	1-4, 6, 7, 16
X	ARANDA ELISABET et al. Isolation of Ascomycota fungi with capability to transform PAHs: Insights into the biodegradation mechanisms of <i>Penicillium oxalicum</i> . International Biodeterioration & Biodegradation, 2017, vol. 122, páginas 141-150, ISSN 0964-8305(print) ISSN 1879-0208(electronic), DOI: doi:10.1016/j.ibiod.2017.05.015	1-4, 6, 7, 16

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: 1-4, 6-16

Fecha de realización del informe  
07.10.2019

Examinador  
A. I. Polo Diez

Página  
1/2

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

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, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, COMPENDEX, EMBASE, INTERNET