

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 822 946**

51 Int. Cl.:

**C02F 3/34** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2016 PCT/EP2016/068211**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2017 WO17017263**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2016 E 16750420 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3328799**

54 Título: **Consorcio de microorganismos y su uso para reducir la demanda química de oxígeno del fluido consumido para trabajar metales**

30 Prioridad:

**30.07.2015 GB 201513431**

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

**05.05.2021**

73 Titular/es:

**FORD MOTOR COMPANY LIMITED (100.0%)  
Eagle Way Brentwood  
Essex, CM13 3BW, GB**

72 Inventor/es:

**POPE, WILLIAM;  
AGER, DUANE y  
GOODALL, TIMOTHY**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 822 946 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

Consortio de microorganismos y su uso para reducir la demanda química de oxígeno del fluido consumido para trabajar metales

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un nuevo consorcio de microorganismos que se pueden utilizar en el tratamiento de residuos industriales, métodos y usos del consorcio y biorreactores y sistemas de tratamiento que los contienen.

10

Antecedentes

Los fluidos para trabajar metales (MWF) son un componente esencial de instalaciones de fabricación pesada (que incluyen motores de automóviles, plantas de transmisión y estampado, industria aeroespacial y sus cadenas de suministro). Específicamente, se utilizan como refrigerantes y lubricantes para operaciones de corte y rectificado de metales y perforación. Los desechos de MWF contribuyen a la gran mayoría de compuestos orgánicos en las aguas residuales producidas por tales plantas de fabricación. En el Reino Unido, se producen más de 400 millones de litros de residuos MWF anualmente, y las cifras mundiales se estiman en más de  $22,4 \times 10^9$  litros anuales. Una vez que los MWF a base de petróleo se han agotado operativamente, deben ser tratados para que puedan eliminarse y para cumplir con los requisitos de las directivas federales de la Unión Europea y los EE. UU., que regulan la descarga de efluentes.

15

20

25

30

35

Un método para el tratamiento de MWF comprende el tratamiento biológico de MWF en el que se añaden microorganismos para digerir los constituyentes no deseados. Tales métodos de biorremediación de MWF a menudo no pueden reducir la demanda química de oxígeno (DQO) lo suficiente sin un procesamiento inicial, tal como la filtración o ultrafiltración del MWF consumido (véase, por ejemplo, van der Gast y Thompson (2005) *Biotechnology & Bioengineering* 89, 3, 357-366), que añade tiempo, inconvenientes y gastos considerables a los métodos biológicos. Otros métodos biológicos que se han descrito para producir alguna reducción en la DQO han utilizado una inoculación líquida de microorganismos en un biorreactor, en el que los microorganismos son capaces de reducir el contenido de DQO del MWF consumido. Por ejemplo, Muszynski & Lebkowska (2005) *Polish Journal of Environmental Studies* 14, 1, páginas 73-79 e Hila et al., (2005) *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (2005) 80, páginas 641-648 describen la selección y cultivo de microorganismos de MWF consumido y su posterior inoculación líquida en un biorreactor. Otro método biológico que se ha descrito para producir alguna reducción en la DQO es utilizar un consorcio definido de microorganismos. A este respecto, el documento WO2008/102131 describe el uso de un consorcio de microorganismos que consta de al menos *Rhizobium* spp., *Comamonas* spp., *Methylobacterium* spp. y *Microbacterium* spp., para tratar MWF consumido. En concreto, el consorcio de microorganismos estaba formado por *Rhizobium radiobacter*, *Comamonas testosteroni*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Microbacterium esteraromaticum* y *Microbacterium saperdae*.

40

El documento WO2011/104509 describe un método para tratar el fluido consumido para trabajar metales (MWF), que comprende la etapa de proporcionar una biopelícula de microorganismos en una matriz de soporte sólido. Los microorganismos pueden ser un consorcio de dos o más bacterias, por ejemplo, como se divulga en el documento WO2008/102131.

45

Existe una necesidad continua en la técnica de métodos mejorados para reducir el contenido de DQO de fluidos industriales o efluentes industriales, tales como MWF consumidos. La presente invención busca abordar esta necesidad.

50

Sumario de la invención

Los presentes inventores han ideado un nuevo consorcio, combinación o mezcla de microorganismos que se comporta mejor en la reducción de la DQO de los MWF que el consorcio divulgado en el documento WO2008/102131. El rendimiento es mejor porque la DQO se puede reducir a niveles más bajos con el consorcio actual en comparación con el consorcio descrito en el documento WO2008/102131. Los niveles más bajos de reducción de DQO también se pueden lograr en un período de tiempo más corto. Con base en los datos presentados en este documento, se estima que el nuevo consorcio puede lograr alrededor de al menos un 25% más de reducción en los niveles de DQO en comparación con el consorcio descrito en el documento WO2008/102131. El nuevo consorcio puede utilizarse en el tratamiento de fluidos industriales o efluentes industriales o MWF consumidos sin que se requiera ningún fraccionamiento o separación previos o cualquier otra forma de proceso de pretratamiento.

60

En la presente se describe un consorcio o una mezcla o una combinación de microorganismos que comprenden, consisten o consisten esencialmente en *Rhizobium* spp., *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. El consorcio puede utilizarse para reducir la DQO de MWF consumidos.

65

Las *Rhizobium* spp. pueden comprender la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1.

Las *Bacillus* spp. pueden comprender la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3.

Las *Pseudomonas* spp. pueden comprender la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 5.

5 Las *Rhizobium* spp. pueden ser *Rhizobium radiobacter*, las *Bacillus* spp. pueden ser *Bacillus subtilis* y/o *Bacillus thuringiensis*, y las *Pseudomonas* spp. pueden ser *Pseudomonas putida* y/o *Pseudomonas stutzeri*.

El consorcio de microorganismos puede comprender, consistir o consistir esencialmente en *Rhizobium radiobacter*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas putida* y/o *Pseudomonas stutzeri*.

10 El consorcio de microorganismos puede comprender, consistir o consistir esencialmente en *Rhizobium radiobacter* NCIMB 42280 y/o *Bacillus subtilis* NCIMB 42282 y/o *Bacillus thuringiensis* NCIMB 42283 y/o *Pseudomonas putida* NCIMB 42441 y/o *Pseudomonas stutzeri* NCIMB 42281.

15 La presente invención proporciona un consorcio de microorganismos que comprende, consiste en o consiste esencialmente en *Rhizobium radiobacter* NCIMB 42280, *Bacillus subtilis* NCIMB 42282, *Bacillus thuringiensis* NCIMB 42283, *Pseudomonas putida* NCIMB 42441 y *Pseudomonas stutzeri* NCIMB 42281, en lo sucesivo denominado NCIMB 42281 como 'el consorcio de la invención'.

20 Se proporciona una biopelícula que comprende el consorcio de microorganismos. La presente invención proporciona una biopelícula que comprende el consorcio de la invención, en la que la biopelícula está colonizada sobre un soporte sólido.

25 Se proporciona un método para reducir la demanda química de oxígeno (DQO) de un fluido consumido para trabajar metales (MWF), que comprende poner en contacto el MWF con el consorcio de microorganismos o la biopelícula. La presente invención proporciona un método para reducir la DQO del MWF consumido, que comprende poner en contacto el MWF con el consorcio de la invención, o la biopelícula de la invención, o el biorreactor de la invención. Opcionalmente, el método comprende las etapas de: (a) proporcionar la biopelícula de la invención sobre una matriz de soporte sólido en un primer biorreactor; (b) transferir al menos una parte de la matriz de soporte sólido que comprende la biopelícula de microorganismos desde el primer biorreactor a un segundo biorreactor; y (c) incubar los microorganismos en el segundo biorreactor para reducir la DQO del MWF consumido contenido en el mismo.

35 Se proporciona un biorreactor para reducir la DQO de los MWF consumidos, comprendiendo el biorreactor el consorcio de microorganismos o la biopelícula. La presente invención proporciona un biorreactor para reducir la demanda química de oxígeno (DQO) de los fluidos consumidos para trabajar metales (MWF), comprendiendo el biorreactor dicha biopelícula que comprende dicho consorcio, en el que el soporte sólido está fijado al biorreactor. Opcionalmente, al menos una parte del soporte sólido se puede retirar del biorreactor. Opcionalmente, el biorreactor comprende además MWF consumido. El biorreactor puede comprender además (i) una segunda matriz de soporte sólido, en la que dicha segunda matriz de soporte sólido no está o no está sustancialmente colonizada por una biopelícula de microorganismos; y (ii) opcionalmente, MWF consumido diluido.

Se proporciona el uso de un biorreactor en la reducción de la DQO del MWF consumido.

45 Se proporciona un método para reducir la DQO del MWF consumido, que comprende poner en contacto el MWF con el biorreactor.

50 Se proporciona un método para tratar MWF consumido, que comprende las etapas de: (a) proporcionar la biopelícula en una matriz de soporte sólido en un primer biorreactor; (b) transferir al menos una parte de la matriz de soporte sólido que comprende la biopelícula de microorganismos desde el primer biorreactor a un segundo biorreactor; y (c) incubar los microorganismos en el segundo biorreactor para reducir la DQO del MWF consumido contenido en el mismo.

55 Se proporciona un método para preparar una biopelícula de microorganismos que es capaz de reducir el contenido de DQO del MWF consumido que comprende las etapas de: (a) proporcionar la biopelícula en una matriz de soporte sólido en un primer biorreactor; (b) transferir la matriz de soporte sólido que comprende la biopelícula de microorganismos desde el primer biorreactor a un segundo biorreactor; y (c) cultivar la biopelícula de microorganismos en el segundo biorreactor en presencia de MWF consumido.

60 Se proporciona un biorreactor para tratar MWF que comprende: (i) una primera matriz de soporte sólido que comprende la biopelícula, en la que dicha biopelícula es capaz de reducir el contenido de DQO del MWF, opcionalmente en la que dicha biopelícula se ha establecido en un biorreactor diferente; (ii) una segunda matriz de soporte sólido, en la que dicha segunda matriz de soporte sólido no está o no está sustancialmente colonizada por una biopelícula de microorganismos; y (iii) opcionalmente, MWF consumido diluido. A modo de ejemplo, el soporte sólido no está sustancialmente colonizado por la biopelícula de microorganismos cuando menos de aproximadamente el 10% de la matriz de soporte sólido no está colonizada por la biopelícula de microorganismos, o menos de aproximadamente el 9%, o menos de aproximadamente el 8%, o menos de aproximadamente el 7%, o menos de

aproximadamente 6%, o menos de aproximadamente 5%, o menos de aproximadamente 4%, o menos de aproximadamente 3%, o menos de aproximadamente 2%, o menos de aproximadamente 1% o menos de aproximadamente 0,1%, o cuando una biopelícula de microorganismos no es visible o no es detectable o no está presente.

- 5 En la presente invención, se proporciona *Rhizobium radiobacter* NCIMB 42280.
- En la presente invención, se proporciona *Bacillus subtilis* NCIMB 42282.
- 10 En la presente invención, se proporciona *Bacillus thuringiensis* NCIMB 42283.
- En la presente invención, se proporciona *Pseudomonas putida* NCIMB 42441.
- 15 En la presente invención, se proporciona *Pseudomonas stutzeri* NCIMB 42281.
- Se proporciona un método o un biorreactor o un uso o un consorcio o una biopelícula como se describe en el presente documento con referencia a la descripción y los dibujos adjuntos.
- 20 En una realización, el segundo biorreactor se llena inicialmente ya sea antes o después de la etapa (b) con el MWF consumido, adecuadamente, el MWF consumido diluido, en el que la DQO del mismo está entre 5.000 y 10.000 mg/L.
- En una realización, la matriz de soporte sólido comprende, consiste o consiste esencialmente en tubos tejidos de plástico.
- 25 En una realización, el flujo de aire en el primer y/o segundo biorreactor está entre 250 y 300 litros por minuto por cada 5.000 litros del volumen del biorreactor de líquido.
- En una realización, al menos una parte del MWF consumido del segundo biorreactor se usa para inocular uno o más biorreactores adicionales, opcionalmente en el que el o los biorreactores adicionales comprenden una matriz de soporte sólido que no está sustancialmente colonizada por microorganismos.
- 30 En una realización, dicha etapa se repite una o más veces para inocular uno o más biorreactores adicionales.
- En una realización, la biopelícula de microorganismos en la primera matriz de soporte sólido es capaz de reducir la DQO del MWF consumido hasta 5.000 mg/L de DQO o menos.
- 35 En una realización, el 10% de la matriz de soporte sólido es la primera matriz de soporte sólido y el volumen restante del segundo biorreactor está ocupado por la segunda matriz de soporte sólido y/o en la que dicho segundo biorreactor está conectado reversiblemente a uno o más biorreactores adicionales para permitir el paso del MWF consumido desde los mismos, en los que el MWF consumido tiene una DQO de 5.000 mg/L o menos.
- También se describen las secuencias de nucleótidos expuestas en las SEQ ID Nos 1-5. También se divulga una secuencia de nucleótidos que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia establecida en las SEQ ID Nos 1-5.
- 45 También se divulga un consorcio, una biopelícula, un método, un biorreactor o un uso como se describe en el presente documento con referencia a la descripción y los dibujos adjuntos.
- Breve descripción de los dibujos
- 50 La Figura 1 muestra una comparación del rendimiento del consorcio de la presente invención (R4T) frente al consorcio descrito en el documento WO2008/102131 (Microcycle) en Hocut® 795B. Hocut® 795B es un aceite soluble de larga duración sin cloro de alta lubricidad, ampliamente disponible para su compra, a través de por ejemplo Houghton International). La figura superior muestra el nivel de reducción de DQO en un período de 11 días. La figura inferior muestra los mismos resultados presentados como un porcentaje de la DQO inicial eliminado.
- 55 La Figura 2 muestra comparaciones adicionales del rendimiento del consorcio de la presente invención (R4T) frente al consorcio descrito en el documento WO2008/102131 (Microcycle) en Hocut® 795B. Los experimentos se llevaron a cabo durante un período de 7 días o durante un período de 10 días.
- 60 La Figura 3 muestra una comparación adicional del rendimiento del consorcio de la presente invención (R4T) frente al consorcio descrito en el documento WO2008/102131 (Microcycle) en una corriente residual que contiene aproximadamente un 10% de emulsión de fluido de trabajo de metales.
- 65 Las Figuras 4a a 4c muestran el Comprobante de Depósito de la NCIMB para *Rhizobium radiobacter* NCIMB 42280.

Las Figuras 5a a 5c muestran el Comprobante de Depósito de la NCIMB para *Pseudomonas stutzeri* NCIMB 42281.

Las Figuras 6a a 6c muestran el Comprobante de Depósito de la NCIMB para *Bacillus subtilis* NCIMB 42282.

5 Las Figuras 7a a 7c muestran el Comprobante de Depósito de la NCIMB para *Bacillus thuringiensis* NCIMB 42283.

Las Figuras 8a a 8c muestran el Comprobante de Depósito de la NCIMB para *Pseudomonas putida* NCIMB 42241.

10 La Figura 9 muestra el rendimiento de un biorreactor a escala industrial que comprende el consorcio de la presente invención sobre los fluidos efluentes de una planta automotriz.

#### Descripción detallada

15 La DQO es una medida de cuánto oxígeno sería necesario para oxidar los componentes de materiales tales como efluentes residuales, y generalmente se considera que es una medida del contenido orgánico de tales materiales. La DQO se mide en mg/L. El nivel actualmente tolerado para la DQO de las aguas residuales en el Reino Unido es de 2.000 mg/L, aunque es probable que este nivel se reduzca.

20 Como se usa en este documento, el término 'consumido', como se usa en conexión con MWF, indica un MWF después de su uso. Los MWF se proporcionan generalmente como concentrados que deben diluirse entre aproximadamente un 6% y un 12% p/v en agua antes de su uso. Los métodos descritos en este documento son adecuados para tratar los concentrados diluidos sin tratamiento adicional, tal como etapas de ultrafiltración o de dilución adicionales. De hecho, se prefiere que el MWF a tratar no esté ultrafiltrado.

25 Como se usa en este documento, el término 'sin procesar' indica que el MWF no ha sido filtrado, ultrafiltrado, fraccionado, separado por ningún otro medio, tratado químicamente o procesado de otro modo después del uso normal y antes de entrar en contacto con el consorcio. El MWF consumido puede tratarse para mejorar la capacidad del consorcio para reducir la DQO del MWF consumido, o para facilitar su manipulación, y dicho tratamiento puede implicar el debilitamiento y/o amortiguación y/o dilución. Puede ser deseable la neutralización mediante un tratamiento ácido/alcalino adecuado para mejorar el entorno del consorcio. En general, tales tratamientos no son necesarios, y es una ventaja que los MWF consumidos puedan usarse en los métodos inmediatamente después del uso y sin ninguna forma de tratamiento previo.

35 El consorcio se puede utilizar de cualquier manera adecuada, y se puede añadir directamente, preferiblemente como cultivo, al MWF consumido, que se puede tratar con el consorcio en cubas, tanques o depósitos, preferiblemente con agitación mecánica mientras se reduce la DQO. El MWF consumido también puede procesarse junto con el consorcio de cualquier otra manera deseada, tal como por procesamiento continuo a través de una serie de tanques o depósitos, o mediante tuberías, y dejar que se libere al medio ambiente una vez que la DQO se haya reducido a los niveles deseados. El cultivo del consorcio se puede recolectar del MWF procesado para su reutilización, si se desea.

40 Se ha descubierto que el consorcio forma una biopelícula particularmente eficaz capaz de reducir la DQO hasta niveles bajos de 5.000 mg/L o menos.

45 Se ha descubierto que el consorcio forma una biopelícula particularmente eficaz capaz de reducir la DQO hasta niveles bajos de 5.000 mg/L o menos en períodos cortos de tiempo.

50 Una biopelícula cultivada a partir del consorcio descrito en el presente documento es capaz de reducir la DQO de Hocut® 795B en aproximadamente un 62% en aproximadamente 6 días. Una biopelícula cultivada a partir del consorcio descrito en el presente documento es capaz de reducir la DQO de Hocut® 795B en aproximadamente un 81% en aproximadamente 9 días. Una biopelícula cultivada a partir del consorcio descrito en este documento es capaz de reducir la DQO de Hocut® 795B en aproximadamente un 88% en aproximadamente 10 días.

55 Se proporciona un método para reducir la DQO de los MWF consumidos, preferiblemente sin procesar, que comprende poner en contacto el MWF con una biopelícula, en el que la biopelícula tiene al menos tres, cuatro o cinco elementos que se seleccionan de al menos uno de cada uno de *Rhizobium* spp., *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp., de forma adecuada, siendo dicha biopelícula capaz de crecer en MWF semisintéticos sin tratar.

60 Como se usa en este documento, 'sin tratar' indica que el MWF no ha sido diluido, filtrado, ultrafiltrado o tratado de otro modo después de su uso principal en el trabajo de metales y antes de entrar en contacto con la biopelícula.

65 El término 'biopelícula' se usa en este documento para describir una comunidad de microorganismos que, juntos, son capaces de una mayor reducción de DQO de un MWF dado, y preferiblemente todos los MWF, que la que podría lograrse mediante el efecto acumulativo de cada uno de los miembros de la familia individualmente. Por conveniencia, generalmente se hará referencia a las biopelículas a continuación, pero se apreciará que esto incluye una referencia a los consorcios, a menos que sea evidente por el contexto.

Debido a que las biopelículas son comunidades, en lugar de asociaciones sueltas de microorganismos individuales, generalmente son capaces de resistir perturbaciones de condiciones tales como variación de temperatura, pH o carga de contaminación. Las biopelículas son autosuficientes en condiciones permisivas, y las biopelículas se seleccionan preferiblemente para que sean autosuficientes en un MWF semisintético, tal como Hysol X®. Las condiciones permisivas también implicarán preferiblemente una temperatura de entre 10 °C y 37 °C y/o un pH de entre 6 y 9, aunque las temperaturas y los pH fuera de este intervalo con frecuencia serán suficientes para permitir el crecimiento, pero esto puede no ser tan adecuado como cuando estos parámetros están en los intervalos preferidos. Asimismo, se prefiere que las biopelículas sean capaces de crecer en todos los MWF disponibles comercialmente, tanto cuando los MWF se han preparado para su uso como una vez consumidos. Se apreciará que las biopelículas son particularmente preferidas para su uso con MWF consumidos.

Se proporciona un biorreactor adecuado para reducir la DQO de los MWF consumidos, preferiblemente sin procesar, comprendiendo el biorreactor una biopelícula que tiene al menos tres, cuatro de cinco miembros que se seleccionan de al menos uno de cada *Rhizobium* spp., *Bacillus* spp., y *Pseudomonas* spp., siendo dicha biopelícula capaz de crecer en MWF semisintéticos sin tratar.

Se proporciona un método para reducir la DQO de los residuos de MWF sin procesar, que comprende poner en contacto el MWF con una biopelícula o biorreactor como se describe en el presente documento. Este método es particularmente adecuado para MWF sintéticos, así como para MWF semisintéticos y con base en aceite.

Los MWF que se van a tratar mediante biopelículas o biorreactores de la presente divulgación preferiblemente no están procesados. Las etapas de tratamiento se pueden emplear como se indica en este documento, y pueden implicar calentamiento si la temperatura ambiente puede resultar en un catabolismo lento de la biopelícula, tal como cuando la temperatura cae por debajo de aproximadamente 10 °C, y/o dilución, preferiblemente con agua, para diluir el lodo para un mejor acceso al biorreactor, por ejemplo.

Es una ventaja que los biorreactores sean autosuficientes y que, en ausencia de una ocurrencia tal como un evento tóxico, la biopelícula no necesita ser reemplazada, incluso después de que se hayan tratado varios lotes.

El término 'biorreactor' se utiliza en este documento para describir un aparato adaptado para soportar una biopelícula y permitir que la biopelícula se ponga en contacto con el MWF consumido. Dichos biorreactores también se pueden utilizar para el tratamiento de cualquier otro residuo líquido susceptible de degradación por las biopelículas, pero están destinados principalmente al tratamiento de los MWF consumidos.

Los biorreactores comprenden generalmente uno o más soportes para la biopelícula que puede crecer para formar una película sobre ellos, y en los que el soporte está adaptado para proporcionar una superficie significativa para la exposición al MWF. El biorreactor comprenderá generalmente un lumen o depósito en el que se introduce el MWF, proporcionándose la biopelícula sobre el soporte a lo largo de todo, o una parte sustancial, del lumen del depósito. En cualquier escenario, generalmente es preferible retener el MWF en el biorreactor durante un período suficiente para reducir la DQO a un nivel objetivo. Como se describe a continuación, un nivel objetivo adecuado es 2.000 mg/L o menos, pero puede seleccionarse cualquier valor objetivo adecuado. También se puede desear operar biorreactores en secuencia, de modo que el MWF se cicle a través de los biorreactores o se alimente a través de los biorreactores en secuencia hasta que se alcanza un nivel objetivo de DQO. Como se señaló anteriormente, los biorreactores también pueden adaptarse para un rendimiento continuo. También quedará claro para el experto en la materia que, a medida que crece la biopelícula, no solo crecerá y se extenderá para cubrir la superficie disponible dentro del biorreactor, sino que también permeará el MWF, de modo que los desechos tratados contendrán una cantidad sustancial del consorcio que compone la biopelícula. Por esta razón, es importante evitar en la medida de lo posible el uso de patógenos en la biopelícula. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona además una biopelícula y/o biorreactor como se define, en el que la biopelícula no contiene sustancialmente patógenos detectables y, preferiblemente, no contiene patógenos detectables en absoluto.

Se apreciará que la presente divulgación proporciona el uso de un biorreactor, como se define en el presente documento, en la reducción de la DQO del MWF consumido. La divulgación proporciona además un aparato para su uso como biorreactor y una preparación bacteriana adecuada para sembrar dicho aparato para proporcionar un biorreactor. Se proporciona además el líquido residual tratado mediante un método o biorreactor, especialmente cuando dicho residuo es MWF consumido, y más especialmente cuando la DQO del residuo es de 2.000 mg/L o menos.

La presente divulgación también proporciona un método para reducir la DQO de MWF consumidos, que comprende poner en contacto el MWF con una combinación de microorganismos capaces de crecer en los MWF semisintéticos no tratados.

Los MWF consumidos son aquellos que se han usado, tal como se describió anteriormente, y son apropiados para su eliminación. Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse en MWF no utilizados, pero se apreciará que esto normalmente no se contemplará, ya que desperdiciaría MWF que de otro modo podrían usarse para su propósito declarado.

Aunque se prefiere particularmente usar MWF semisintéticos y con base en aceite, ya sea que estén consumidos o destinados a su eliminación, la presente divulgación también es aplicable a los MWF sintéticos. La DQO de los MWF con base en aceite, tal como Shell Dromus B®, puede superar los 60.000 mg/L. Estos altos niveles de contaminación orgánica también se han asociado previamente con la incapacidad de utilizar cualquier forma de biorremediación, ya que la alta carga de contaminación impide el crecimiento.

La presente divulgación proporciona un método para reducir la DQO de un MWF que tiene una DQO de 15.000 mg/L o más, y adecuadamente 20.000 mg/L o más, y lo más convenientemente incluso hasta 95.000 mg/L o 100.000 mg/L o superior, que comprende poner en contacto el MWF con una biopelícula o biorreactor como se describe en el presente documento. Este método es particularmente adecuado para MWF sintéticos, así como para MWF semisintéticos y con base en aceite.

Es una ventaja particular que sea posible reducir la DQO de los MWF a menos de 5.000 mg/L, preferiblemente, a menos de 2.000 mg/L, y preferiblemente a menos de 1.000 mg/L, y lo más preferiblemente hasta 500 mg/L o menos. Los métodos también pueden reducir la toxicidad del MWF medida por el ensayo de bioluminiscencia de *Vibrio fischeri*.

Las combinaciones o consorcios de microorganismos descritos en el presente documento se pueden usar para reducir la DQO de cualquier fluido que tenga un contenido de hidrocarburos significativo y una DQO alta. Dichos fluidos incluyen MWF, preferiblemente MWF consumidos, de la industria automotriz, la industria aeroespacial y sus cadenas de suministro. Dichos fluidos también pueden incluir fluidos de industrias de productos alimenticios, industrias de fabricación de latas de bebidas, desechos de glicol de descongelación de plataformas de aeropuertos, manejo y procesamiento de aceites usados, aceites para cajas de engranajes de generadores eólicos, materiales radiactivos de origen natural aceitoso (NORM) tal como los de la exploración petrolera corrientes de residuos de la industria y la industria de la fracturación hidráulica.

Las combinaciones de microorganismos utilizados en los métodos descritos en el presente documento se denominan en el presente documento como consorcios, y cada consorcio comprende al menos 3 bacterias como se define en el presente documento. No hay un límite particular para el número de miembros que puede tener cualquier consorcio, pero generalmente se prefiere constituir un consorcio para usar en los métodos descritos en este documento a partir de preparaciones individuales o cultivos de los miembros del consorcio, para que los miembros no competan en ausencia del MWF. Se apreciará, por lo tanto, que restringir el número de miembros proporcionará una ventaja logística, aunque no debería haber menos de tres miembros.

En los Ejemplos adjuntos, cinco bacterias constituyen el consorcio. Estas son *Rhizobium radiobacter*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas stutzeri* aisladas de MWF. Las especies de estas bacterias se han depositado en virtud del Tratado de Budapest en la NCIMB Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Reino Unido el 26 de junio de 2015 o el 22 de julio de 2015 de la siguiente manera:

- *Rhizobium radiobacter* - NCIMB 42280 - depositada el 26 de junio de 2015;
- *Bacillus subtilis* - NCIMB 42282 - depositada el 26 de junio de 2015;
- *Bacillus thuringiensis* - NCIMB 42283 - depositada el 26 de junio de 2015;
- *Pseudomonas putida* - NCIMB 42441 - depositada el 22 de julio de 2015; y
- *Pseudomonas stutzeri* - NCIMB 42281 - depositada el 22 de julio de 2015;

Los comprobantes de depósito se muestran en las Figuras 4 a 8.

Se apreciará que las bacterias para su inclusión en un consorcio se seleccionan de *Rhizobium* spp., *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp., y mezclas de las mismas. Se apreciará que cualquier bacteria seleccionada debería ser capaz de crecer en el MWF para su tratamiento en presencia de los otros miembros del consorcio, y preferiblemente en ausencia de otros miembros del consorcio.

El consorcio de microorganismos puede comprender al menos una de *Rhizobium* spp., *Bacillus* spp., y *Pseudomonas* spp. El consorcio de microorganismos puede comprender al menos tres, cuatro o cinco microorganismos seleccionados de *Rhizobium* spp., *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. Las *Rhizobium* spp. pueden ser *Rhizobium radiobacter*, *Bacillus* spp. pueden ser *Bacillus subtilis* y/o *Bacillus thuringiensis*, y *Pseudomonas* spp. pueden ser *Pseudomonas putida* y/o *Pseudomonas stutzeri*. El consorcio de microorganismos puede comprender, consistir o consistir esencialmente en el grupo que consiste en *Rhizobium radiobacter*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas stutzeri* o al menos tres, cuatro o cinco miembros de los mismos. El consorcio de microorganismos puede comprender, consistir o consistir esencialmente en *Rhizobium radiobacter*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas stutzeri*. El consorcio de microorganismos puede comprender, consistir o consistir esencialmente en *Rhizobium radiobacter* NCIMB 42280, *Bacillus subtilis* NCIMB 42282, *Bacillus thuringiensis* NCIMB 42283, *Pseudomonas putida* NCIMB 42441 y *Pseudomonas stutzeri* NCIMB 42281.

Los métodos se llevarán a cabo generalmente durante un tiempo y en condiciones tales que la DQO se reduzca al nivel deseado. La cantidad de tiempo dependerá de parámetros tales como la naturaleza del MWF, el nivel de DQO

inicial, la temperatura y el pH, pero generalmente estará entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 días o más.

El MWF no necesita tratamiento antes de entrar en contacto con el consorcio, aunque si se desea se pueden aplicar tratamientos previos que no sean excesivamente tóxicos, y preferiblemente no tóxicos en absoluto, para la biopelícula. Después de su uso, el MWF de desecho o consumido generalmente tendrá una DQO de alrededor de 100.000 mg/L o menos, con un promedio preferido de alrededor de 50.000-60.000 mg/L, y los consorcios han demostrado ser capaces de tratar dichos MWF. Sin embargo, puede ser deseable diluir el MWF para ayudar a una reducción más rápida de la DQO, por ejemplo, o puede ser deseable diluir el MWF tratado.

Los métodos se pueden llevar a cabo en un intervalo de pH. Los MWF a menudo tienen un pH natural que es bastante alto, en la región de pH 9, y se ha establecido que los métodos descritos en este documento se optimizan alrededor de un pH neutro, con un pH de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 7, inclusive, siendo deseable.

Es posible calentar el MWF durante el tratamiento con el consorcio, pero esto puede resultar costoso y no es necesario. Sin embargo, si se desea calentar el MWF consumido, entonces es posible usar temperaturas de hasta 40 °C pero preferiblemente no superiores a 37 °C, pero las temperaturas de entre 10 y 30 °C son generalmente aceptables con una temperatura óptima de aproximadamente 28 °C. Cualquier temperatura fuera de este intervalo puede seleccionarse de acuerdo con el consorcio utilizado y las condiciones ambientales.

El método utilizado para tratar el MWF puede ser cualquiera que sea adecuado. Por ejemplo, una preparación del consorcio se puede agregar directamente al MWF y dejar reposar durante un período de tiempo adecuado, tal como dos semanas. Transcurrido este tiempo, se puede tomar una muestra del fluido para inocular el siguiente lote. El inconveniente de este proceso es que la eficacia del consorcio a menudo tiende a reducirse después de varios ciclos, y se debe agregar más cultivo. El proceso puede ser asistido por agitación y/o aireación. Este proceso, por ejemplo, puede usarse para sembrar un biorreactor.

Se prefiere usar biorreactores y, como se describió anteriormente, estos pueden tomar cualquier forma estándar. Se ha descubierto que las bacterias preferidas crecen y recubren soportes estándar sin condiciones especiales. Sin embargo, generalmente es ventajoso preparar el consorcio deseado y luego exponer al consorcio al apoyo. Se prefiere particularmente mezclar el consorcio con medio de crecimiento, que puede ser el MWF cuando se siembra por primera vez en el biorreactor.

Los métodos se pueden practicar en MWF, particularmente MWF con base en aceite, que no han sido fraccionados o filtrados o, preferiblemente, tratados previamente de cualquier otra forma antes del tratamiento, reduciendo así sustancialmente los gastos y los inconvenientes.

Se apreciará que los métodos pueden usarse para el tratamiento de cualquier MWF, o cualquier otro efluente industrial de naturaleza similar, pero que es particularmente ventajoso que los MWF con base en aceite no tratados puedan tratarse. El biorreactor puede usarse para tratar MWF con base en aceite, particularmente un MWF con base en aceite sin tratar y más preferiblemente sin filtrar.

El método de inoculación de la matriz sólida se puede usar para inocular un biorreactor como se describe en el documento WO2011/104509. En la inoculación de la matriz sólida, una vez que la biopelícula ha madurado en un primer biorreactor y es capaz de reducir la DQO del MWF consumido al nivel deseado, al menos una parte de la matriz sólida que contiene la biopelícula se retira del primer biorreactor y luego se transfiere a un segundo biorreactor que se va a inocular. La biopelícula se puede transferir desde el primer biorreactor al segundo biorreactor inmediatamente o la biopelícula se puede incubar durante un período de tiempo entre la transferencia. El tiempo y las condiciones de incubación se elegirán de manera que la viabilidad de la biopelícula no se altere sustancialmente.

Según una realización, el volumen de la matriz sólida que se transfiere entre los biorreactores es aproximadamente al menos aproximadamente de 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15% o 20% o más del volumen del segundo biorreactor. En una realización, el volumen de la matriz sólida que se transfiere es aproximadamente al menos aproximadamente el 5% o al menos aproximadamente el 10% del volumen del biorreactor que se va a inocular. Por lo tanto, por ejemplo, se introducen 500 mL de matriz de soporte sólido en un biorreactor de laboratorio de 5 litros o se introducen 1.000 litros de la matriz de soporte sólido en un reactor de 10.000 litros. De manera adecuada, el volumen restante del segundo biorreactor está ocupado por una matriz de soporte sólido que no tiene una biopelícula de microorganismos en la misma. Por consiguiente, el volumen restante del biorreactor está ocupado por una matriz de soporte sólido que está libre o sustancialmente libre de microorganismos. Por lo tanto, por ejemplo, la matriz de soporte sólido puede ser una nueva matriz de soporte sólido o puede ser una matriz de soporte sólido limpia sobre la cual la cantidad de crecimiento de microorganismos está sustancialmente ausente.

Adecuadamente, la matriz de soporte sólido del segundo biorreactor puede comprender por lo menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100% del volumen restante del segundo biorreactor. El segundo biorreactor puede no incluir ningún MWF consumido en el momento de la transferencia. Alternativamente, el segundo biorreactor puede comprender ya el MWF consumido antes de la transferencia o al menos una parte del MWF consumido antes de la transferencia. Las condiciones de funcionamiento en el segundo biorreactor son tales que la

matriz de soporte sólido en el segundo biorreactor es colonizada por microorganismos y se cubre con una biopelícula durante un período de días o semanas, preferiblemente días, dependiendo de, por ejemplo, la toxicidad de la corriente de desechos y el método de inoculación. Por lo tanto, por ejemplo, si el segundo biorreactor se inocula con líquido, entonces los tiempos de maduración típicos son típicamente de aproximadamente 70 días o más; si el segundo biorreactor se inocula en una matriz sólida, entonces los tiempos de maduración son típicamente de aproximadamente 30 días o menos. Durante el período de puesta en servicio inicial del primer y/o segundo biorreactores, los biorreactores deberían alimentarse deseablemente con MWF consumido diluido de entre aproximadamente 5.000 y aproximadamente 10.000 mg/l de DQO. También se puede usar MWF consumido con una DQO más alta, tal como un MWF consumido de entre aproximadamente 5.000 a aproximadamente 20.000 mg/L de DQO, de entre aproximadamente 5.000 a aproximadamente 30.000 mg/L de DQO, de entre aproximadamente 5.000 a aproximadamente 40.000 mg/L de DQO o entre aproximadamente 5.000 a aproximadamente 50.000 mg/L de DQO. De forma adecuada, el MWF consumido que se añade al biorreactor o biorreactores se diluye para alcanzar este nivel de DQO deseado. Esto es para minimizar el choque tóxico impuesto por los componentes tóxicos que pueden estar presentes en la corriente de desechos, tal como los biocidas. De acuerdo con una realización, el primer y/o segundo biorreactores pueden complementarse con un suplemento de crecimiento, tal como caldo de soja triptico o una solución de oligoelementos (por ejemplo, una solución de oligoelementos a base de algas) y similares para ayudar a establecer el crecimiento de los microorganismos en una biopelícula en el biorreactor o biorreactores. Normalmente, esta suplementación se produce a niveles bajos, tal como aproximadamente 1 y 10 µL por litro del volumen del biorreactor. El nivel de DQO del MWF consumido puede aumentar a medida que los microorganismos presentes en la biopelícula se acostumbran a la creciente toxicidad de la corriente de desechos. A medida que crece la biopelícula en el soporte de matriz sólida en el biorreactor, se extenderá y crecerá para cubrir cualquier soporte sólido restante que no haya sido poblado por la biopelícula. La biopelícula también puede cubrir otras superficies disponibles dentro del biorreactor. La biopelícula también puede desprender células muertas y activas en el MWF líquido. Cuando se retira, la biomasa suspendida representa típicamente entre aproximadamente 500 mg/L y aproximadamente 1.500 mg/L de DQO.

El primer y/o segundo biorreactores se pueden poner en marcha a diversas temperaturas, tal como la temperatura ambiente (que normalmente es de aproximadamente 18 a 20 °C) aunque son posibles temperaturas más bajas, tales como temperaturas tan bajas como 12 °C. Una vez que el biorreactor o biorreactores han madurado y son capaces de reducir el contenido de DQO de MWF consumido al nivel deseado, entonces se pueden utilizar temperaturas de entre aproximadamente 1 °C y aproximadamente 35 °C. La temperatura de funcionamiento puede caer excepcionalmente fuera de este intervalo, dependiendo de la composición de microorganismos de la biopelícula. De forma adecuada, se usa una temperatura de entre aproximadamente 25 °C y aproximadamente 35 °C; más adecuadamente, se usa una temperatura de entre aproximadamente 26 °C y aproximadamente 34 °C; más adecuadamente, se usa una temperatura de entre aproximadamente 26 °C y aproximadamente 33 °C; más adecuadamente, se usa una temperatura de entre aproximadamente 26 °C y aproximadamente 31 °C; más adecuadamente, se usa una temperatura de entre aproximadamente 26 °C y aproximadamente 30 °C; más adecuadamente, se usa una temperatura de entre aproximadamente 27 °C y aproximadamente 29 °C; lo más adecuadamente, se usa una temperatura de aproximadamente 28 °C. Esta temperatura generalmente permite que la reducción de DQO se mantenga a un nivel alto durante varios días.

Después del tratamiento en el primer y/o segundo biorreactor, el MWF consumido tendrá típicamente un contenido de DQO de menos de aproximadamente 3.000 mg/L, más adecuadamente, menos de aproximadamente 2.500 mg/L, más adecuadamente, menos de aproximadamente 2.000 mg/L, o más adecuadamente, menos de aproximadamente 1.500 mg/L.

El efluente del segundo biorreactor se puede utilizar para inocular uno o más biorreactores adicionales. Normalmente, el tercer biorreactor comprenderá una matriz de soporte sólido que no está sustancialmente colonizada por microorganismos de modo que el efluente que se introduce en el mismo puede colonizar la matriz de soporte sólido. Esta etapa puede repetirse una o más veces para inocular uno o más biorreactores adicionales. De acuerdo con una realización, el segundo biorreactor puede conectarse de forma reversible a uno o más biorreactores adicionales para permitir el paso del MWF consumido desde el mismo. De forma adecuada, el paso del MWF consumido es controlable de modo que se pueda transferir una vez que la DQO del MWF consumido en el segundo biorreactor haya alcanzado 2.000 mg/L o menos. De acuerdo con otra realización, los biorreactores adicionales pueden llenarse manualmente con efluente del segundo biorreactor. De manera adecuada, los biorreactores adicionales también comprenderán una matriz de soporte sólido que está sustancialmente libre de microorganismos de manera que puedan ser colonizados por el MWF consumido introducido en el mismo. De forma adecuada, al menos aproximadamente el 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% del volumen del o de los biorreactores adicionales estará ocupado por la matriz de soporte sólido que está sustancialmente libre de microorganismos.

El soporte sólido sobre el que se desarrolla la biopelícula en el biorreactor puede fijarse al biorreactor y/o retirarse del biorreactor. De forma adecuada, al menos una parte del soporte sólido se puede retirar del biorreactor para permitir la transferencia del soporte sólido entre biorreactores. El soporte sólido puede ser cualquier soporte sólido que sea adecuado para establecer una biopelícula. El soporte sólido puede estar formado por plástico, tal como polipropileno, metal, fibras naturales, tales como algodón y combinaciones de las mismas. El soporte sólido puede estar formado y/o incluir un revestimiento formado por un material hidrófobo, tal como polietileno. De forma adecuada, el material

seleccionado para formar el soporte sólido no se degrada sustancialmente en presencia de MWF. El soporte sólido puede ser sustancialmente plano, sustancialmente cilíndrico, sustancialmente cónico, sustancialmente esférico, sustancialmente rectangular, sustancialmente cuadrado, de forma sustancialmente ovalada y/o de forma irregular. De forma adecuada, uno o más microorganismos pueden acoplarse al soporte sólido en un biorreactor para formar la biopelícula, que puede transferirse de un biorreactor a otro. De manera adecuada, los microorganismos que forman la biopelícula no pueden desprenderse sustancialmente del soporte sólido durante el uso. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen, entre otros, una biotorre, un contactor biológico giratorio, piedras bruto, listones, medios plásticos, una partícula de espuma reticulada, un microportador y/o partículas de medio, tierra de diatomeas, sílice, alúmina, perlas de cerámica, carbón o perlas poliméricas o de vidrio y similares.

Un tipo preferido de soporte sólido comprende o consiste en una red de plástico, tal como una red de polietileno extrudido. Otro tipo preferido de soporte sólido comprende tubos tejidos de plástico, tales como polipropileno, que proporcionan una gran superficie para el crecimiento de la biopelícula y, al mismo tiempo, permiten un flujo de líquido adecuado sobre la superficie de la biopelícula. Otro tipo preferido de soporte sólido es una superficie rugosa para aumentar la adhesión bacteriana. Otro tipo preferido de soporte sólido comprende una combinación de una o más, por ejemplo todas, estas características.

En otra realización, la matriz de soporte sólido comprende, consiste o consiste esencialmente en tubos de plástico, tales como tubos tejidos de plástico (por ejemplo, polipropileno). Los tubos de plástico pueden comprender aproximadamente 200 tubos de red, convenientemente, con un diámetro aproximado de 70 mm en una longitud de 1 m. Cada tubo de red comprende típicamente aproximadamente 30 hilos de polietileno con un diámetro de aproximadamente 2-3 mm. Los hilos de la red se pueden soldar entre sí de modo que formen agujeros cuadrados en la pared del tubo. El tamaño de los agujeros es de aproximadamente 8 mm x 8 mm. Estos hilos dan un área total de aproximadamente 100 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> en estado seco. Otro formato de tubos de red comprende aproximadamente 300 tubos de red, de manera adecuada, con un diámetro de aproximadamente 50 mm en una longitud de 1 m. Cada tubo de red comprende típicamente aproximadamente 30 hilos de polietileno con un diámetro de aproximadamente 2-3 mm. Los hilos de la red se pueden soldar entre sí de modo que formen agujeros cuadrados en la pared del tubo. El tamaño de los agujeros es de aproximadamente 4 mm x 4 mm. Estos hilos dan una superficie total de aproximadamente 150 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> en estado seco. Otro formato de tubo de red tiene un diámetro exterior de aproximadamente 50 mm. Cada metro cúbico consta de aproximadamente 300 tubos de red con unos 50 mm de diámetro en una longitud de 1 m. Cada tubo de red comprende aproximadamente 30 hilos de polietileno con un diámetro teórico de aproximadamente 3-4 mm. Los hilos de la red se sueldan entre sí de modo que formen agujeros cuadrados en la pared del tubo. El tamaño de los agujeros es de aproximadamente 3 mm x 3 mm. Estos hilos dan un área total de aproximadamente 200 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> en estado seco. La matriz sólida está disponible comercialmente.

Los biorreactores que se describen en este documento pueden incluir un controlador. Se puede configurar un controlador para automatizar el sistema. El controlador puede medir varios parámetros del sistema, tales como la presión; la temperatura; el pH; el contenido de DQO, una corriente de aguas residuales y/o una corriente de salida; una cantidad, tipo y/o relación de tipos de bacterias en el biorreactor; caudales, corriente de burbujas de aire; y/o un volumen de agua y similares. El controlador puede usar mediciones de los diversos parámetros para modificar los valores de uno o más parámetros del sistema. El controlador puede medir y/o modificar parámetros del sistema de forma continua o periódica. El biorreactor puede adaptarse para un funcionamiento continuo o por lotes. El biorreactor puede ser un biorreactor de columna de burbujas aeróbico. El biorreactor puede estar formado por plástico, metal y/u otros materiales. El biorreactor puede incluir uno o más recubrimientos. El recubrimiento puede inhibir la corrosión y/o facilitar la eliminación de sólidos de un recipiente. Por ejemplo, un biorreactor puede tener un recubrimiento de politetrafluoruro para inhibir la corrosión e inhibir que los sólidos se adhieran al biorreactor. La huella del biorreactor puede ser sustancialmente cuadrada, sustancialmente circular, sustancialmente ovalada, sustancialmente rectangular y/o de forma irregular. El biorreactor puede tener una forma configurada para minimizar las regiones estancadas en el biorreactor. En determinadas realizaciones, la forma de la superficie interior del biorreactor puede minimizar las regiones estancadas en el recipiente durante la mezcla. Las superficies internas del biorreactor pueden redondearse en lugar de encontrarse en un borde. Por ejemplo, la superficie interior del biorreactor puede tener una forma sustancialmente similar a un óvalo o un círculo para minimizar la presencia de regiones estancadas en el biorreactor, durante el uso. En una realización, el biorreactor puede tener una forma en la que sustancialmente todo el líquido en uno o más de los biorreactores circula cuando se mezcla con un agitador durante el uso. El biorreactor puede incluir uno o más agitadores para agitar el MWF consumido y/o los gases en el biorreactor. Se pueden colocar uno o más agitadores para reducir las zonas muertas de mezcla en el biorreactor. Por ejemplo, el biorreactor con un área de sección transversal ovalada puede incluir dos agitadores aproximadamente igualmente espaciados a lo largo de una superficie inferior para inhibir áreas de estancamiento en el biorreactor. El biorreactor puede incluir una o más entradas para corrientes de aguas residuales, corrientes de burbujas de aire y/o bacterias. El biorreactor puede incluir una o más salidas para la eliminación de líquidos y/o sólidos del biorreactor. Los filtros se pueden acoplar a entradas y/o salidas. Se puede acoplar un filtro o una trampa por gravedad a una entrada para eliminar y/o romper sólidos grandes. Se puede acoplar un filtro a una salida para evitar que los sólidos tales como residuos sólidos, microorganismos, biopelículas y/o materia particulada fluyan fuera del biorreactor. En una realización, un filtro puede inhibir los contaminantes del agua que sale del biorreactor. Por ejemplo, se puede acoplar papel de filtro o un filtro de carbón activado a una salida para eliminar los contaminantes de una corriente que fluye del biorreactor. En ciertas realizaciones, se puede acoplar un sistema de electrocoagulación a entradas y/o salidas. Puede usarse un sistema de

electrocoagulación antes de permitir que el MWF consumido entre al biorreactor que comprende una biopelícula y/o después de permitir que el MWF consumido salga del biorreactor que incluye una biopelícula. El sistema de electrocoagulación puede hacer que los compuestos se precipiten y floten hacia una superficie superior o inferior del biorreactor para su eliminación. En una realización, un sistema de electrocoagulación puede cargar iones en el MWF consumido. Los iones cargados pueden unirse a iones cargados de manera opuesta y formar un precipitado. Luego, los precipitados pueden flotar hasta una superficie superior o hundirse hasta la superficie inferior del biorreactor para eliminarlos del MWF consumido. En una realización, los precipitados se pueden filtrar del MWF consumido.

De forma adecuada, la primera matriz de soporte sólido se ha preparado previamente en el primer biorreactor como se describe en el presente documento. De manera adecuada, la biopelícula de microorganismos en la primera matriz de soporte sólido es capaz de reducir la DQO del MWF consumido a aproximadamente 5.000 mg/L de DQO o menos, hasta aproximadamente 4.000 mg/L de DQO o menos, hasta aproximadamente 3.000 mg/L de DQO o menos, hasta aproximadamente 2.000 mg/L de DQO o menos, hasta aproximadamente 1.000 mg/L de DQO o menos, o hasta aproximadamente 500 mg/L de DQO o menos. De manera adecuada, el volumen de la primera matriz de soporte sólido que comprende la biopelícula de microorganismos es al menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% o aproximadamente 10% del volumen del biorreactor. De manera adecuada, el volumen de la primera matriz de soporte sólido que comprende la biopelícula de microorganismos es al menos aproximadamente el 5% del volumen del biorreactor. Más adecuadamente, el volumen de la primera matriz de soporte sólido que comprende la biopelícula de microorganismos es al menos aproximadamente el 10% del volumen del biorreactor. De manera adecuada, el volumen restante del biorreactor está ocupado por una matriz de soporte sólido sobre la cual no hay o no está sustancialmente presente una biopelícula de microorganismos. De forma adecuada, la primera y segunda matrices de soporte se pueden mover dentro y fuera del biorreactor. Más adecuadamente, la primera matriz de soporte se puede mover hacia adentro y hacia afuera del biorreactor y la segunda matriz de soporte se fija dentro del biorreactor.

Una vez que se ha alcanzado el nivel de DQO deseado, el agua gris que queda del tratamiento puede liberarse en el alcantarillado o puede usarse para inocular biorreactores adicionales. Opcionalmente, las aguas grises pueden tratarse adicionalmente antes de su liberación para matar cualquier microorganismo residual. Los tratamientos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ozono, calor por irradiación o cualquier otro tratamiento que no aumente la toxicidad de las aguas grises. En esta etapa, se puede introducir un nuevo lote de MWF consumido en el reactor para su procesamiento.

Los siguientes ejemplos tienen fines ilustrativos y no limitan la invención en modo alguno.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Materiales y métodos

#### Crecimiento de consorcios bacterianos

Se seleccionan cinco bacterias para constituir un consorcio. Estas son *Rhizobium radiobacter* (NCIMB 42280), *Bacillus subtilis* (NCIMB 42282), *Bacillus thuringiensis* (NCIMB 42283), *Pseudomonas putida* (NCIMB 42441) y *Pseudomonas stutzeri* (NCIMB 42281). Estas cinco bacterias han sido depositadas en la NCIMB bajo el Tratado de Budapest como se describe en este documento. Los Comprobantes de Depósito de la NCIMB se presentan en las Figuras 4 a 8.

La nueva combinación de *Rhizobium radiobacter* (NCIMB 42280), *Bacillus subtilis* (NCIMB 42282), *Bacillus thuringiensis* (NCIMB 42283), *Pseudomonas putida* (NCIMB 42441) y *Pseudomonas stutzeri* (NCIMB 42281) se denomina en el presente documento 'R4T'.

La combinación de *Rhizobium radiobacter* (NCIMB 41462), *Comamonas testosteroni* (NCIMB 41463), *Methylobacterium mesophilicum* (NCIMB 41464), *Microbacterium esteraromaticum* (NCIMB 41465) y *Microbacterium saperdae* (NCMB 41466) como se describe en el documento WO2008/102131 se denomina 'Microcycle'.

Cada cepa se cultiva en placas de cultivo, y se extrae una sola colonia y se incuba durante la noche a 28 °C, antes de sembrar en placa y volverla a cultivar (durante la noche en una incubadora estática a 28 °C) para asegurar la pureza de la cepa. El procedimiento se repite tantas veces como sea necesario para confirmar que no hay otras morfologías, pero en promedio un procedimiento de "estriar nuevamente" es suficiente. Las bacterias se recolectan mediante técnicas asépticas. Se resuspenden aproximadamente 50 mg de biomasa bacteriana en un criotubo de almacenamiento con aproximadamente 8 mL de glicerol y aproximadamente 1 mL de caldo de tripticasa de soja (tsb). A continuación, las muestras se almacenan en un congelador a menos de -70 °C. Para obtener un cultivo del almacenamiento, el criotubo se retira del congelador, se mantiene en hielo y se usa un asa estéril para extraer las bacterias y colocarlas en placas de cultivo que se incuban durante la noche a 28 °C.

#### Identificación de consorcios bacterianos

Después de las etapas de enriquecimiento en caldo mínimo con MWF como única fuente de carbono, los aislados bacterianos se identifican mediante secuenciación parcial de nucleótidos del ADN de la subunidad ribosómica 16S. A continuación se describen ejemplos de secuencias de cada especie del consorcio R4T bajo el título 'Secuencias'.

#### Cribado rápido para la utilización de componentes del MWF

La capacidad de las bacterias aisladas de MWF para asimilar componentes del fluido como únicas fuentes de carbono se evalúa inoculando cada aislado en pozos de placas de microtitulación que contienen 100 µL de medio mínimo M9 y MWF semisintético u oleoso al 3% v/v como única fuente de carbono. Las placas maestras de microtitulación se incuban a 28 °C durante la noche o hasta que el caldo del medio se vuelve turbio. Las bacterias se transfieren de las placas maestras de microtitulación a placas de microtitulación de fondo plano de 96 pozos que contienen medio mínimo M9 y con componentes individuales del MWF sintéticos (biocida a base de formaldehído, benzotriazol, ácido cítrico, formaldehído, monoetanolamina, morfolina y trietanolamina) añadidos a una concentración de 5 mM, utilizando puntas de 200 µL dispuestas con el mismo patrón que los pozos de las placas de microtitulación. Las placas se cubren con una película Seal-plate (Sigma, Poole, Reino Unido) para evitar la contaminación cruzada o la evaporación y se incuban durante 7 días a 28 °C. La densidad óptica se mide cada 24 horas a una longitud de onda de 620 nm utilizando un espectrofotómetro LUCY 1. Este método permite un cribado rápido de todos los 300 aislados bacterianos en cuanto a tolerancia y capacidad para asimilar componentes individuales del MWF como fuente de carbono.

Las cepas aisladas se inoculan por separado en matraces cónicos de 250 mL que contienen 100 mL de caldo de soja triptico (10% v/v, Difco, Reino Unido) y se filtran previamente (usando un filtro de tamaño de poro de 0,2 µm, Millipore, Reino Unido), aguas residuales de MWF (3% v/v). Los cultivos individuales se incuban a 28 °C en un agitador orbital durante 12 horas (recuentos de células aproximados de  $10^7$  células mL<sup>-1</sup>). Las suspensiones celulares se retiran y se resuspenden en aguas residuales de MWF, se mezclan y se añaden como un inóculo al 10% v/v en los biorreactores.

#### Condiciones de inoculación

El consorcio bacteriano se reconstituye inoculando las cepas almacenadas individualmente por separado en matraces cónicos de 250 mL que contienen 50 mL de caldo de soja triptico (10% v/v, Difco, Reino Unido) y concentrado de MWF fresco (3% v/v). Los monocultivos se incuban luego a 28 °C en un agitador orbital durante 12 h. Las suspensiones celulares se eliminan por centrifugación y se resuspenden en el efluente de MWF, se mezclan y se añaden como un inóculo al 10% v/v en los biorreactores. Los biorreactores, después de la centrifugación, se inoculan con 3 g de biomasa en suspensión húmeda como se describió anteriormente.

#### MWF

El MWF semisintético puede ser una fuente de nutrientes. El fluido comprende varios constituyentes químicos que incluyen una base de amina ácida, un paquete de lubricación (aceite y emulsionantes) y un paquete de biocidas. Se suministra como un concentrado y normalmente se diluye con agua para formar un fluido de trabajo al 6% v/v antes de su uso en operaciones de mecanizado.

#### Inoculación de la matriz sólida

Una biopelícula madura que ha crecido en una matriz de soporte sólido se transfiere desde un primer biorreactor a un segundo biorreactor. El biorreactor del que se obtiene la biopelícula ha estado reduciendo constantemente la DQO del MWF consumido hasta aproximadamente 2.000 mg/L de DQO o menos durante más de aproximadamente 1 semana para flujo continuo o durante un mínimo de 2 procedimientos por lotes en modo discontinuo. La biopelícula madura se puede obtener de biorreactores que originalmente se inocularon con líquido y se han sometido al largo proceso de maduración en un laboratorio, por ejemplo, o se pueden obtener de un biorreactor previamente propagado por transferencia de matriz sólida de una biopelícula madura. Si se utilizan cultivos aislados para establecer la biopelícula, entonces el inóculo puede comprender una comunidad bacteriana seleccionada de MWF operativos en caldo de soja triptico 1/10 con la adición de un 1-5% de MWF o un medio mínimo que contenga MWF o componentes de MWF como única fuente de carbono (véase van der Gast Env. Micro (2004) 6 (3) 254-263). Los matraces se incuban a aproximadamente 100 rpm en una incubadora con agitación durante aproximadamente 16 horas. Los aislados cultivados se identifican mediante secuenciación de ADN para excluir a los patógenos de su consideración como inóculos. Se pueden utilizar especies individuales o consorcios de microorganismos para inocular biorreactores. La matriz que contiene la biopelícula madura se retira de un biorreactor en funcionamiento y se transfiere al reactor que se va a inocular. Se utiliza un volumen de biopelícula de matriz madura que es aproximadamente el 10% del volumen del reactor a inocular (es decir, un tubo de 500 mL de matriz de soporte sólido en un biorreactor de 5 litros, 1.000 litros en un reactor de 1.0000 litros). El volumen restante del reactor está ocupado por una matriz limpia (sin biopelículas). A continuación, se llena el reactor con residuos de MWF diluidos y se inicia inmediatamente la aireación para evitar la acción anaeróbica y la producción de sulfuro de hidrógeno. Se monitorea el nivel de DQO del MWF consumido. La matriz sin biopelícula se coloniza y se cubre con biopelícula durante un período de días o semanas dependiendo de la corriente de desechos.

#### Puesta en servicio del biorreactor

El biorreactor se pone en marcha a una temperatura de aproximadamente 18-20 °C, aunque se pueden usar temperaturas inferiores a 12 °C. Una vez maduros, los biorreactores pueden tolerar entre +1 y + 35 °C. La reducción de DQO es insignificante a 1 °C, pero la operación puede mantenerse a un nivel alto a 30 °C durante varios días. Los

reactores se airean usando aire de un compresor e inyectándolo en las tuberías en la parte inferior del biorreactor para distribuirlo. La acción de las burbujas que se elevan proporciona agitación en la superficie del biorreactor pero no es tan violenta como para desprender la biopelícula adherida. En la práctica, esto da un flujo de aire de aproximadamente 250-300 litros por minuto por cada 5.000 litros de volumen del reactor. Los niveles de oxígeno disuelto son típicamente de aproximadamente 10 mg/L al comienzo del proceso de puesta en servicio debido a la baja densidad celular. En la madurez, el oxígeno disuelto medible es típicamente menor de 1 mg/L debido a la utilización de oxígeno libre por parte de los microorganismos para oxidar los aceites y otros componentes del MWF.

#### Alimentación del biorreactor

Durante el período inicial de puesta en servicio, el inóculo líquido o el biorreactor inoculado con biopelícula se alimentan con residuos de MWF diluidos de entre aproximadamente 5.000 hasta aproximadamente 10.000 mg/L de DQO para minimizar el choque tóxico impuesto por los componentes tóxicos de la corriente de residuos, tal como los biocidas. A escala de laboratorio, los reactores a veces se suplementan con caldo de soja triptico. Esto no es práctico ni rentable a gran escala. En una escala mayor a 1.000 litros, se utiliza un nivel extremadamente bajo de suplemento (1-10 µL por litro de volumen del reactor) con una solución de oligoelementos a base de algas.

#### **Ejemplo 2: Una comparación del rendimiento del consorcio R4T frente al consorcio Microcycle en Hocut® 795B.**

Una corriente residual de Hocut® 795B se trata en biorreactores inoculados de matriz sólida que se inoculan con R4T o Microcycle. Hocut® 795B es un MWF semisintético.

La DQO inicial de Hocut® 795B es de aproximadamente 45.000 mg/L y la reducción de la DQO se controla durante un período de 10 días. Los resultados de este experimento se presentan en la Figura 1. La tasa y el alcance de la degradación es significativamente mayor para el consorcio R4T que para el consorcio Microcycle. La figura de la parte inferior muestra los datos de DQO sin procesar. La figura superior muestra los datos como % de reducción de DQO. Después de 10 días, la DQO para el consorcio Microcycle se reduce hasta aproximadamente 17.000 mg/L, mientras que para el consorcio R4T, se reduce hasta aproximadamente 5.000 mg/L. Además, la reducción de DQO ocurre más rápidamente para el consorcio R4T en comparación con el consorcio Microcycle.

Se concluye que el consorcio R4T es más eficaz para reducir la DQO de MWF semisintético en comparación con el consorcio Microcycle.

#### **Ejemplo 3: Una comparación adicional del rendimiento del consorcio R4T frente al consorcio Microcycle en Hocut® 795B.**

Se trata una corriente residual de Hocut® 795B en biorreactores inoculados de matriz sólida que se inoculan con R4T o con Microcycle. Hocut® 795B es un MWF semisintético.

Se llevan a cabo dos experimentos durante un periodo de 7 días y durante un período de 10 días. Los resultados se presentan en la Figura 2.

En el primer experimento (mostrado en el lado izquierdo de la Figura 2), el consorcio R4T reduce la DQO en 13.620 mg/L en comparación con solo 6.800 mg/L del consorcio Microcycle, una eficiencia aumentada del 50%. El nivel de DQO que se alcanza con el consorcio R4T al final de la prueba es mucho más bajo que el nivel de DQO alcanzado con el consorcio Microcycle. El DQO también alcanza un nivel más bajo en un período de tiempo más corto con el consorcio R4T.

En el segundo experimento (mostrado en el lado derecho de la Figura 2), fue evidente una mejora del 15%. El nivel de DQO que se alcanza con el consorcio R4T al final de la prueba es mucho más bajo que el nivel de DQO alcanzado con el consorcio Microcycle. El DQO también alcanza un nivel más bajo en un período de tiempo más corto con el consorcio R4T.

La tendencia de los dos experimentos muestra la mejora del rendimiento del consorcio R4T. Por el contrario, el consorcio Microcycle se ha estabilizado con un rendimiento inferior. Se espera que la divergencia entre los resultados de los dos consorcios aumente a medida que el consorcio R4T madura y se vuelve más robusto.

Se concluye que el consorcio R4T es más eficaz para reducir la DQO de MWF semisintético en comparación con el consorcio Microcycle.

#### **Ejemplo 4 - Una comparación adicional del rendimiento del consorcio R4T frente al consorcio Microcycle en una emulsión de MWF al 10%.**

Una corriente residual de una emulsión de MWF al 10% (que no es Hocut® 795B) se trata en biorreactores inoculados de matriz sólida con R4T o Microcycle.

Los resultados de este experimento se presentan en la Figura 3. El consorcio R4T redujo la DQO de manera más efectiva que Microcycle y también alcanzó una DQO más baja en un tiempo de procesamiento más corto.

5 Se concluye que el consorcio R4T es más eficaz para reducir la DQO de la emulsión de MWF al 10% en comparación con el consorcio Microcycle.

**Ejemplo 5 - Evaluación del rendimiento de un biorreactor a escala industrial**

10 Se instaló un biorreactor a escala industrial en una planta automotriz que comprende el consorcio de microorganismos descritos en el presente documento para demostrar la reducción de DQO que se puede lograr partiendo del efluente de la planta automotriz.

15 La Figura 9 muestra el rendimiento del biorreactor en detalle durante un período de prueba del 22 de febrero al 24 de marzo de 2014. La DQO del efluente real en los fluidos residuales de la planta automotriz y, por lo tanto, las entradas para el biorreactor variaron mucho y ascendieron a casi 85.000 mg/L. Esto contrasta con la intención de que una DQO máxima en el efluente de la planta sea de aproximadamente 40.000 mg/L, como se muestra en la línea discontinua horizontal. La DQO objetivo actual del efluente de la planta es 20.000 mg/L que se muestra en la línea horizontal punteada superior y se esperaba que la DQO objetivo de salida del biorreactor fuera de aproximadamente 5.000 mg/L que se muestra en la línea horizontal punteada inferior.

20 El biorreactor logró mucho mejor que las salidas de DQO objetivo, como se muestra en la línea • x • x •, de aproximadamente 2.000 mg/L. Esto confirma que el nuevo consorcio de microorganismos es altamente efectivo y puede reducir los niveles de DQO de efluentes con diferentes DQO altos.

25 **Secuencias**

SEQ NO: 1 Secuencia de ADN de la subunidad ribosomal parcial 16S de *Rhizobium radiobacter* NCIMB 42280

```

nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnttcacnnnnnncgctgannctaccgtggtagctgcctccttgcggt
tagnnnnnnnnnnnnnggtaaaaccaactcccatgggtgtgacgggagggtgtgtacaaggcccggaac
gtattcaccgcagcatgctgatctgcgattactagegatccaacttcatgcactcgagttgcagagt
gcaatccgaactgagatggcttttgagattagctcgacatcgctgtctcgctgccactgtcaccac
cattgtagcacgtgtgtagcccagccgtaagggccatgaggacttgacgtcatccccaccttctct
cggcttatcaccggcagtcaccttagagtgcccaactcaatgctggcaactaagggcgaggggttgcgc
tcgttgcgggacttaaccaacatctcacgacacgagctgacgacagccatgcagcacctgttctggg
gccagcctaactgaaggacatcgtctccaatgccataccccgaatgtcaagagctggtaagggtctg
cgcgttgcttgaattaaaccacatgctccaccgcttgtgcgggcccccgtaattcctttgagttt
aatcttgcgaccgtactccccaggcgaatgtttaatgcgtagctgcgccaccgaacagtatactgc
ccgacggctaacattcatcgttttacggcgtggactaccagggtatctaactcctgtttgctccccacg
ctttcgcacctcagcgtcagtaatggaccagtaagcgcctncgccaactggtgttctcctccgaatac
tacgaatttcacctctacactcggaaattccacttacctctnccatnntcnagataccagtatcaaag
gcagttncagagttgagctctggganttcacccccctgacttaaanntccnncctacgtgcgcttac
ncccagtaanttcnaacangnnnnccccctncgnnttaccnnggctgntgnnnaantnngcnggg
cttnttctcngnnnnncgtcattatnnttnnncggnnangnnnctttnnnnnntnngnctttcat
cncnncnnnngcnnngnctggannnggcttgngcennntgtcnannnnnnncnncnnnnnnctnnc
nnnnnnnanttngngcngggtnnnnnnnnncnannnnnnnggctnnnnnnnnntnnnnnannn
nnnnnatnnncnnnnnnntgnnnnnngcnnnttaccnccnanannnnntannnnnnannnnnggggc
nannnnnnnttnnnnn
    
```

30

SEQ NO 2: Secuencia de ADN de la subunidad ribosomal parcial 16S de *Bacillus subtilis* NCIMB 42282

# ES 2 822 946 T3

nnnnnnnnnnnnngnnnnnnnnncnngnngttagcggcggacgggtgagtaaacacgtgggtaacctgcc  
tghtaagactgggataaactccgggaaaccggggctaataaccggatgggtgtttgaaccgcatgggtcaa  
acataaaaaggtggcttcggctaccacttacagatggaccgcggcgcattagctagttgggtgaggtaa  
cggctcaccaaggcaacgatgcgtagccgacctgagaggggtgatcggccaactgggactgagacacg  
gcccagactcctacgggagggcagcagtagggaatcttccgcaatggacgaaagtctgacggagcaacg  
ccgcgtgagtgatgaaggTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAA  
TAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT  
aca

## SEQ NO: 3 Secuencia de ADN de la subunidad ribosomal parcial 16S de *Bacillus thuringiensis* NCIMB 42283

5 nnnnnnnnnnnntgctcttanganttagcggcggacgggtgagtaaacacgtgggtaacctgccata  
agactgggataaactccgggaaaccggggctaataaccggataatTTTTGAACTGCATGGTTCGAAATT  
gaaaggcggcttcggctgtcacttatggatggaccgcgtcgcattagctagttgggtgaggtaacggc  
tcaccaaggcaacgatgcgtagccgacctgagaggggtgatcggccaactgggactgagacacggccc  
agactcctacgggagggcagcagtagggaatcttccgcaatggacgaaagtctgacggagcaacgccgc  
gtgagtgatgaaggcttccgggtcgtaaaactctgttgttagggaagaacaagtgctagttgaataag  
ctggcaccttgacgggtacctaaccagaaagccacggctaaactacgtgccagcagccgcggtaataca

## 10 SEQ NO: 4. Secuencia de ADN de la subunidad ribosomal parcial 16S de *Pseudomonas putida* NCIMB 42441

nnnnnnnnnnnnnnngnnnnnnntgcagtcgagcggatgagaagagcttgccttcgattcagcggc  
ggacgggtgnntaataacctaggaatctgcctggtagtgggggacaacgtttcgaaaggaacgctaata  
ccgcatacgtcctacgggagaaagcaggggaccttcgggacctgcgctatcagatgagcctaggtcgg  
attagctagttgggtgaggtaatggctcaccaaggctacgatccgtaactgggtctgagaggatgatcag  
tcacactggaactgagacacgggtccagactcctacgggagggcagcagtaggggaatattggacaatggg  
cgaaagcctgatccagccatgccgcgtgtgtgaagaaggcttccgattgtaaagcactttaagttgg  
gaggaagggcagtaagcgaataccttgcgtgttttgacgttaccgacagaataagcaccggctaactct  
gtgccagcagccgcggtaatcacagaggggtgcaagcgttaactcggaattactgggcgtaaagcgcgcgt  
aggtgggttcgttaagttggatgtgaaatccccgggctcaacctgggaactgcatccaaaactggcgag  
ctagagtggggcaganggtgggtggaatttctctgtgtagcggtgaaatgcgtagatataggaaggaaca  
ccagtggcgaangcaccacctgggctcactgacactgaggtgcgaaagcgtggggagcaaacagg  
attagataacctggtagttccacgccgtaaacgatgtcaactagccggttggaaatccttgagattttagt  
ggcgcagctaacgcattaagttgaccgcctgggggagtagcgnccgcaagggttaaaactcnaatgaatt  
gacgggggcccgcacagcggnggagcatgtggtttaaatttcgaagcaacgcnaagaaccttaccnggc  
cntgacatccnatgaactttccnnananggattgggtgccttcgggancattganacagngctgncat  
nggntntcgtcagcctcnngtctgagatntngnttaagtccntnacnnnnnnnancnnntnctt  
tanttncnncnnntnntggngnnnnntctangnnaactgncngnnnnnaaccnccccnnngnnnnna  
nnnncagctentcnnngnnnnngncnngnnnnncnnnnngnnnnnaangnngnnnnannnccnncn  
nnnnnnnnnantnnnnnnaaaannnn

## 15 SEQ NO: 5. Secuencia de ADN de la subunidad ribosomal parcial 16S de *Pseudomonas stutzeri* NCIMB 42281

nnnnnnnnnnctgctcntgattcngcggcggacgggtgagtaatgcctaggaatctgcctggtagtgg  
gggacaacgtttcgaaaggaacgctaataaccgcatacgtcctacgggagaaagtgggggatcttcgga  
cctcacgctatcagatgagcctaggtcggattagctagttggcgaggtaaaggctcaccaaggcgacg  
atccgtaactgggtctgagaggatgatcagtcacactggaactgagacacgggtccagactcctacggga  
ggcagcagtaggggaatattggacaatgggcgaaagcctgatccagccatgccgcgtgtgtgaagaagg  
tcttcggattgtaaagcactttaagttgggaggaagagcagtaagttaatccttgcgtgttttgacgt  
taccgacagaataagcaccggctaacttcgtgccagcagccnnggtaataca

# ES 2 822 946 T3

Listado de secuencias

<110> Microbial Solutions Limited

<120> CONSORCIO

5 <130> P128336PC00

<150> GB1513431.5

<151> 2015-07-30

10 <160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

15 <211> 1308

<212> ADN

<213> *Rhizobium radiobacter* NCIMB 42280 (subunidad ribosomal parcial 16S)

<220>

20 <221> característica miscelánea

<222> (1)..(1308)

<223> n = cualquiera de A, T, G, C

<400> 1

25

```

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nttcacnnnn nncgctgann ctaccgtggt tagctgcctc      60
cttgcggtta gnnnnnnnnn nnnnggtaa accaactccc atggtgtgac gggcggtgtg      120
tacaaggccc ggaacgtat tcaccgcagc atgctgatct gcgattacta gcgattccaa      180
cttcatgcac tcgagttgca gagtgcaatc cgaactgaga tggcttttgg agattagctc      240
gacatcgctg tctcgctgcc cactgtcacc accattgtag cacgtgtgta gccagccccg      300
taagggccat gaggacttga cgtcatcccc accttcctct cggcttatca ccggcagtcc      360
ccttagagtg cccaactcaa tgctggcaac taagggcgag ggttgcgctc gttgcgggac      420
ttaacccaac atctcacgac acgagctgac gacagccatg cagcacctgt tctggggcca      480
gcctaactga aggacatcgt ctccaatgcc cataccccga atgtcaagag ctggtaagggt      540
tctgcgctt gcttcgaatt aaaccacatg ctccaccgct tgtgcgggcc cccgtcaatt      600
cctttgagtt ttaatcttgc gaccgtactc cccaggcgga atgtttaatg cgttagctgc      660
gccaccgaac agtatactgc ccgacggcta acattcatcg ttttacggcg tggactacca      720
gggatctaa tcctgtttgc tccccacgct ttgcacctc agcgtcagta atggaccagt      780
aagccgcnt ncgccactgg tgttcctccg aatatctacg aatttcacct ctacactcgg      840
aattccactt acctcttnca tnntcnagat acccagtatc aaaggcagtt nccagagttg      900
agctctggga nttcaccccc tgacttaaan ntccnnccta cgtgcgcttt acncccagta      960
anttnaaca ngnnnncccc ctncgnntt accnnnggct gntgnnnaa ntngcnggg      1020
ctnnttnt cngnnnnncg tcattatnnt tnnncgna ngnnnctttn nnnntnng      1080

```

ES 2 822 946 T3

nctttcatcn cnnncnnngc nnnngnctgga nnnnggcttgn gccnntgtc nannannnnn 1140  
 cnnncnnnnn nctnncnnnn nnnnanttng ngncngggtn nnnnnnnncn cannnnnng 1200  
 gctnnnnnnn nnnntnnnnn annnnnnna tnnncnnnnn nntgnnnnnn gcnnttaccn 1260  
 ccnanannnn ncntannnnn nannnnnggg gcnannnnnn nttnnnnn 1308

<210> 2  
 <211> 479  
 <212> ADN  
 <213> *Bacillus subtilis* NCIMB 42282 (subunidad ribosomal parcial 16S)

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(479)  
 <223> n = cualquiera de A, T, G, C

<400> 2

nnnnnnnnnn nngnnnnnnn nncnngnngt tagcggcgga cgggtgagta acacgtgggt 60  
 aacctgcctg taagactggg ataactccgg gaaaccgggg ctaataccgg atggttgttt 120  
 gaaccgcatg gttcaaact aaaaggtggc ttcggctacc acttacagat ggaccccgcg 180  
 cgcattagct agttggtgag gtaacggctc accaaggcaa cgatgcgtag ccgacctgag 240  
 aggtgatcg gccacactgg gactgagaca cggcccagac tcctacggga ggcagcagta 300  
 gggaatcttc cgcaatggac gaaagtctga cggagcaacg ccgctgagat gatgaagtt 360  
 ttcggatcgt aaagctctgt tgtagggaa gaacaagtac cgttcgaata gggcgggtacc 420  
 ttgacggtac ctaaccagaa agccacggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaataca 479

<210> 3  
 <211> 475  
 <212> ADN  
 <213> *Bacillus thuringiensis* NCIMB 42283 (subunidad ribosomal parcial 16S)

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(475)  
 <223> n = cualquiera de A, T, G, C

<400> 3

nnnnnnnnnn nnntgctctt anganttagc ggcggacggg tgagtaacac gtgggtaacc 60  
 tgcccataag actgggataa ctccgggaaa ccggggctaa taccggataa tattttgaa 120  
 tgcattggtc gaaattgaaa ggcggcttcg gctgtcactt atggatggac ccgctcgca 180  
 ttagctagtt ggtgaggtaa cggctcacca aggcaacgat gcgtagccga cctgagaggg 240  
 tgatcggcca cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcagtaggga 300  
 atcttccgca atggacgaaa gtctgacgga gcaacgccgc gtgagtgatg aaggctttcg 360  
 ggtcgtaaaa ctctgttgtt agggaagaac aagtgctagt tgaataagct ggcacctga 420

ES 2 822 946 T3

cggtacctaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta ataca 475

<210> 4  
 <211> 1252  
 5 <212> ADN  
 <213> *Pseudomonas putida* NCIMB 42441 (subunidad ribosomal parcial 16S)

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 10 <222> (1)..(1252)  
 <223> n = cualquiera de A, T, G, C

<400> 4

nnnnnnnnnn nnnnngnnnn nnnntgcagt cgagcggatg agaagagctt gctcttcgat 60  
 tcagcggcgg acgggtgnnt aatacctagg aatctgcctg gtagtggggg acaacgtttc 120  
 gaaaggaacg ctaataccgc atacgtccta cgggagaaag caggggacct tcgggccttg 180  
 cgctatcaga tgagcctagg tcggattagc tagttggtga ggtaatggct caccaaggct 240  
 acgatccgta actggtctga gaggatgatc agtcacactg gaactgagac acgggtccaga 300  
 ctctacggg aggcagcagt ggggaatatt ggacaatggg cgaaagcctg atccagccat 360  
 gccgcgtgtg tgaagaaggt cttcggattg taaagcactt taagttggga ggaagggcag 420  
 taagcgaata ccttgctggt ttgacgttac cgacagaata agcaccggct aactctgtgc 480  
 cagcagccgc ggtaatacag agggtgcaag cgттаатсgg aattactggg cgtaaagcgc 540  
 gcgtaggtgg ttcgttaagt tggatgtgaa atccccgggc tcaacctggg aactgcatcc 600  
 aaaactggcg agctagagta gggcagangg tgggtggaatt tcctgtgtag cggtgaaatg 660  
 cgtagatata ggaaggaaca ccagtggcga ancgaccac ctgggctcat actgacactg 720  
 aggtgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg 780  
 atgtcaacta gccgttgga tccttgagat tttagtgggc cagctaacgc attaagttga 840  
 ccgcctgggg gactacggnc gcaaggttaa aactcnaatg aattgacggg ggccccgaca 900  
 gcgngggagc atgtggttta atttcgaagc aacgcnaaga accttaccng gccntgacat 960  
 ccnatgaact ttccnnanan ggattggtgc cttcggganc attganacag gngctgncat 1020  
 ngntnntcg tcagcctcnn gtcntgagat ntngnttaag tcccntnacn nnnnnnancn 1080  
 nntncttta nttncnncn nntnntggnn gnnnnntcta ngnnactgnc ngnnnnnaac 1140  
 ccnnnnnnng nnnnnannnn cagtcntcnn ngnnnnnngn cnnngnnnnc nnnnngnnnn 1200  
 15 naangngnn nannnnccnn ncnnnnnnnn nnnnantnnn nnnaaaannn nn 1252

<210> 5  
 <211> 461  
 <212> ADN  
 20 <213> *Pseudomonas stutzeri* NCIMB 42281 (subunidad ribosomal parcial 16S)

<220>

# ES 2 822 946 T3

<221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(461)  
 <223> n = cualquiera de A, T, G, C

5 <400> 5

nnnnnnnnnn	ctgctcntga	ttcngcggcg	gacgggtgag	taatgcctag	gaatctgcct	60
ggtagtgggg	gacaacgttt	cgaaaggaac	gctaataccg	catacgtcct	acgggagaaa	120
gtgggggatc	ttcggacctc	acgctatcag	atgagcctag	gtcggattag	ctagttggcg	180
aggtaaaggc	tcaccaaggc	gacgatccgt	aactggctctg	agaggatgat	cagtcacact	240
ggaactgaga	cacggtccag	actcctacgg	gaggcagcag	tggggaatat	tggacaatgg	300
gcgaaagcct	gatccagcca	tgccgcgtgt	gtgaagaagg	tcttcggatt	gtaaagcact	360
ttaagttggg	aggaagagca	gtaagttaat	accttgctgt	tttgacgtta	ccgacagaat	420
aagcaccggc	taacttcgtg	ccagcagccn	nnggtaatac	a		461

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un consorcio de microorganismos que comprende, consiste o consiste esencialmente en *Rhizobium radiobacter* NCIMB 42280, *Bacillus subtilis* NCIMB 42282, *Bacillus thuringiensis* NCIMB 42283, *Pseudomonas putida* NCIMB 42441 y *Pseudomonas stutzeri* NCIMB 42281.
- 10 2. Una biopelícula que comprende el consorcio de microorganismos de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la biopelícula está colonizada sobre un soporte sólido.
- 15 3. Un biorreactor para reducir la demanda química de oxígeno (DQO) de los fluidos consumidos para trabajar metales (MWF), comprendiendo el biorreactor la biopelícula de la reivindicación 2, en el que el soporte sólido se fija al biorreactor, opcionalmente en el que al menos una parte del soporte sólido es extraíble del biorreactor y, opcionalmente, en el que el biorreactor comprende además MWF consumido.
- 20 4. El biorreactor de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende además:  
(i) una segunda matriz de soporte sólido, en la que dicha segunda matriz de soporte sólido no está o no está sustancialmente colonizada por una biopelícula de microorganismos; y  
(ii) opcionalmente, MWF consumido diluido.
- 25 5. Un método para reducir la DQO de MWF consumido, que comprende poner en contacto el MWF con el consorcio de acuerdo con la reivindicación 1, o la biopelícula de acuerdo con la reivindicación 2, o el biorreactor de acuerdo con la reivindicación 3 o 4.
- 30 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende las etapas de:  
(a) proporcionar la biopelícula de la reivindicación 2 en una matriz de soporte sólido en un primer biorreactor;  
(b) transferir al menos una parte de la matriz de soporte sólido que comprende la biopelícula de microorganismos desde el primer biorreactor a un segundo biorreactor; y  
(c) incubar los microorganismos en el segundo biorreactor para reducir la DQO del MWF consumido contenido en el mismo.
- 35 7. *Rhizobium radiobacter* NCIMB 42280.
- 40 8. *Bacillus subtilis* NCIMB 42282.
9. *Bacillus thuringiensis* NCIMB 42283.
10. *Pseudomonas putida* NCIMB 42441.
11. *Pseudomonas stutzeri* NCIMB 42281.

FIGURA 1

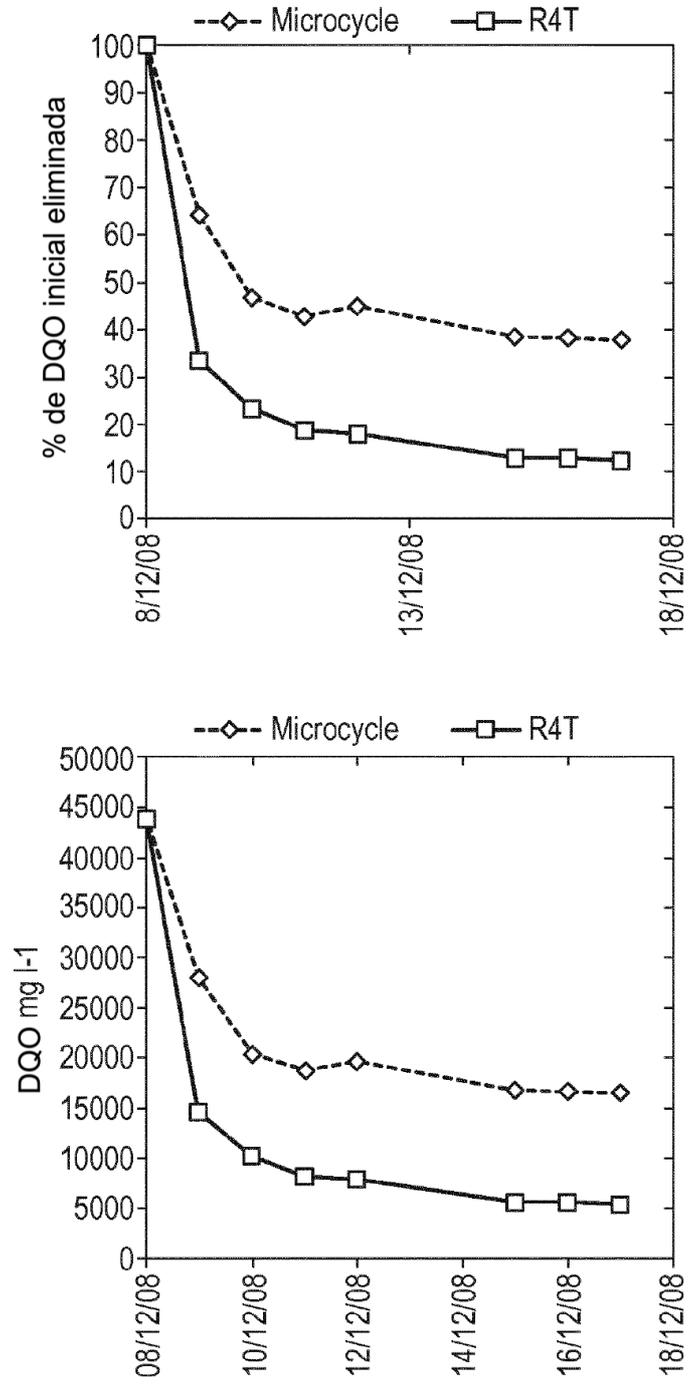


FIGURA 2

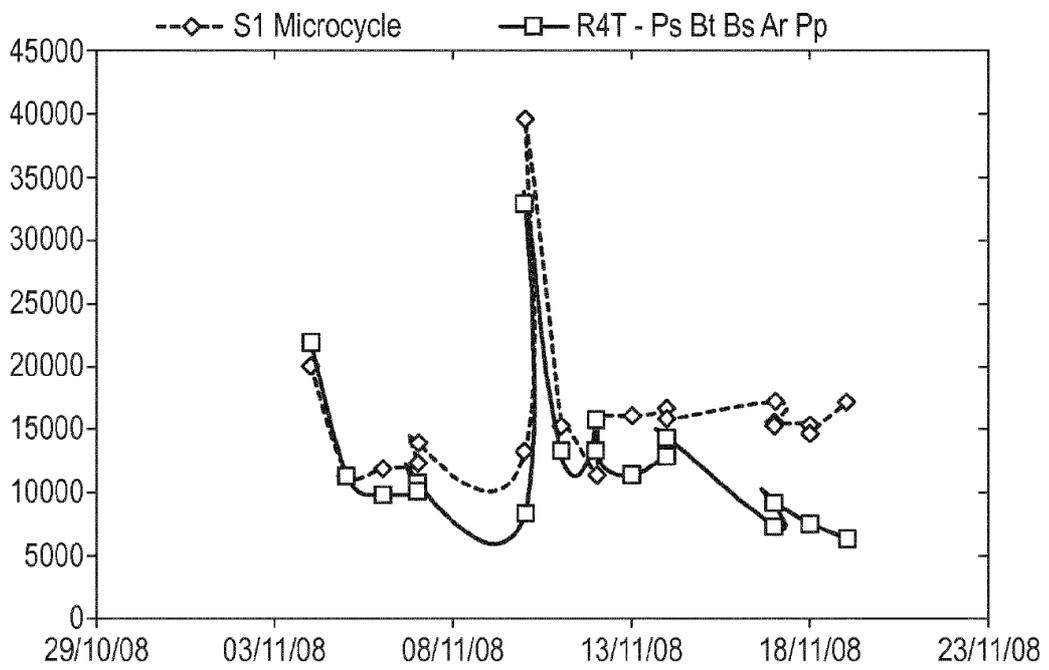


FIGURA 3

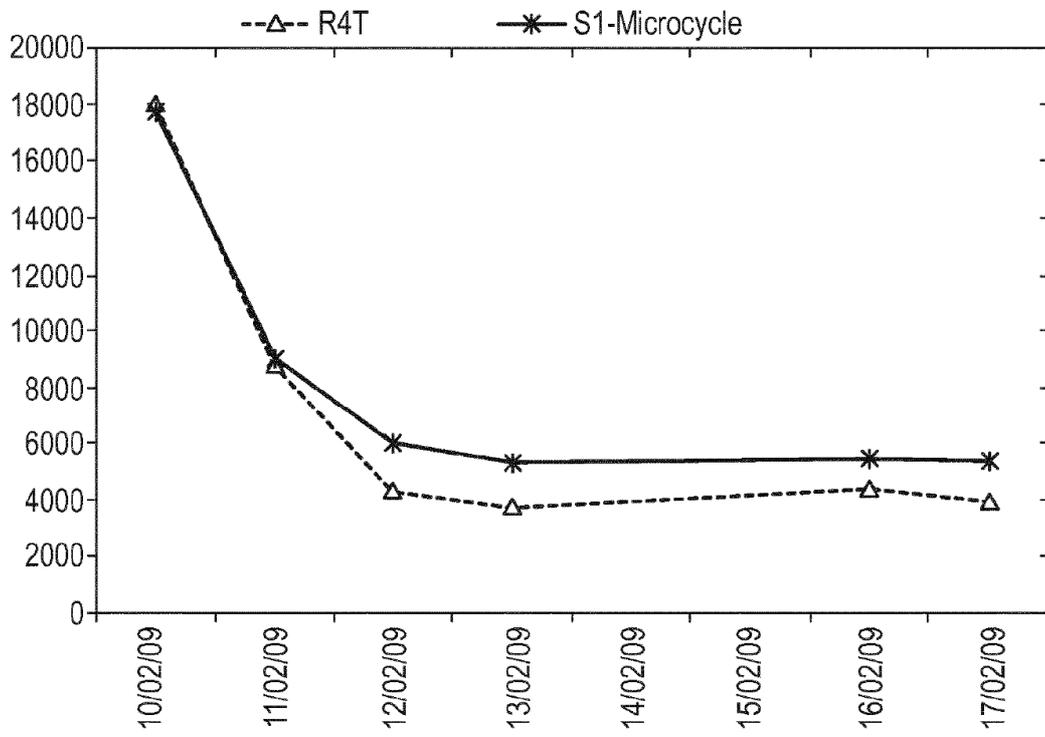


FIGURA 4a

**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO  
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS  
PARA LOS FINES DE PROCEDIMIENTO DE PATENTES**

NC 008963

Microbial Solutions Ltd. The Christian Building Oxford University Begbroke Science Park Yamton Oxford OX5 1PF	<p><b>FORMULARIO INTERNACIONAL</b></p> <p><b>RECEPCIÓN EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL emitido según la regla 7.1 de la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada en la parte inferior de esta página</b></p>
NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE	
<b>I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>	
Referencia identificativa dada por el DEPOSITANTE:  <i>Rhizobium radiobacter</i>	Número de registro dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL  NCIMB 42280
<b>II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DENOMINACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA</b>	
El microorganismo en I. anteriormente se acompañó de:	
<input type="checkbox"/> una descripción científica	
<input checked="" type="checkbox"/> una denominación taxonómica propuesta	
(Marque con una cruz lo que sea aplicable)	
<b>III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN</b>	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I. anteriormente, que recibió el 26 de junio de 2015 (Fecha del depósito original) <sup>1</sup>	
<b>IV. RECEPCIÓN DE LA SOLICITUD PARA CONVERSIÓN</b>	
El microorganismo identificado I. anteriormente se recibió por esta Autoridad Depositaria Internacional el (fecha del depósito original) y se recibió una solicitud para convertir el depósito original en un depósito según el Tratado de Budapest el (fecha de recepción de la solicitud para conversión)	
<b>V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL</b>	
Nombre: NCIMB Ltd.  Ferguson Building Craibstone Estate Dirección: Bucksburn Aberdeen AB21 9YA	Firma(s) de la(s) persona(s) que tiene(n) el poder para representar a la Autoridad Depositaria Internacional u oficial(es) autorizado(s)  [Firma legible]  Fecha: 2 de julio de 2015

<sup>1</sup> cuando se aplica la Regla 6.4 (d), tal fecha es la fecha en la que se adquirió el estado de Autoridad Depositaria Internacional.

FIGURA 4b

**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO  
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS  
PARA LOS FINES DE PROCEDIMIENTO DE PATENTES**

Microbial Solutions Ltd.  
The Christian Building  
Oxford University  
Begbroke Science Park  
Yamton  
Oxford  
OX5 1PF

**FORMULARIO INTERNACIONAL**

**RECEPCIÓN EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL**  
emitido según la regla 7.1 de la  
**AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL**  
identificada en la parte inferior de esta página

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE  
A LA QUE SE EMITE LA DECLARACIÓN  
DE VIABILIDAD

I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre:  Como anteriormente  Dirección:	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: NCIMB 42280  Fecha del depósito <sup>1</sup> : 26 de junio de 2015
III. DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
La viabilidad del microorganismo identificado en II. anteriormente se sometió a prueba el 26 de junio de 2015 <sup>2</sup> <sup>2</sup> En esta fecha, dicho microorganismo era  <input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> viable  <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> no viable	

<sup>1</sup> Indicar la fecha del depósito original o, cuando se ha realizado un nuevo depósito o una transferencia, la fecha relevante más reciente (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).

<sup>2</sup> En los casos a los que se hace referencia en la Regla 10.2(a)(ii) y (iii), se hace referencia a la prueba de viabilidad más reciente.

<sup>3</sup> Marcar con una cruz el recuadro aplicable.

**FIGURA 4c**

**NC 008963**

IV. CONDICIONES BAJO LAS CUALES SE HA LLEVADO A CABO LA PRUEBA DE VIABILIDAD <sup>4</sup>	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre:  Dirección: Ferguson Building Craibstone Estate Bucksburn Aberdeen AB21 9YA	Firma(s) de la(s) persona(s) que tiene(n) el poder para representar a la Autoridad Depositaria Internacional u oficial(es) autorizado(s)  <p style="text-align: center;">[Firma legible]</p> Fecha: 2 de julio de 2015

<sup>4</sup> Llenar si la información ha sido solicitada y si los resultados de la prueba fueron negativos.

FIGURA 5a

**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS FINES DE PROCEDIMIENTO DE PATENTES**

Microbial Solutions Ltd. The Christian Building Oxford University Begbroke Science Park Yamton Oxford OX5 1PF	<p><b>FORMULARIO INTERNACIONAL</b></p> <p><b>RECEPCIÓN EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL emitido según la regla 7.1 de la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada en la parte inferior de esta página</b></p>
<p>NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE</p>	
<p>I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</p>	
Referencia identificativa dada por el DEPOSITANTE:  <i>Pseudomonas stutzeri</i>	Número de registro dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL  NCIMB 42281
<p>II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DENOMINACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA</p>	
El microorganismo en I. anteriormente se acompañó de:  <input type="checkbox"/> una descripción científica  <input checked="" type="checkbox"/> una denominación taxonómica propuesta  (Marque con una cruz lo que sea aplicable)	
<p>III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN</p>	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I. anteriormente, que recibió el 22 de julio de 2015 (Fecha del depósito original) <sup>1</sup>	
<p>IV. RECEPCIÓN DE LA SOLICITUD PARA CONVERSIÓN</p>	
El microorganismo identificado I. anteriormente se recibió por esta Autoridad Depositaria Internacional el (fecha del depósito original) y se recibió una solicitud para convertir el depósito original en un depósito según el Tratado de Budapest el (fecha de recepción de la solicitud para conversión)	
<p>V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL</p>	
Nombre: NCIMB Ltd.  Ferguson Building Craibstone Estate Dirección: Bucksburn Aberdeen AB21 9YA	Firma(s) de la(s) persona(s) que tiene(n) el poder para representar a la Autoridad Depositaria Internacional u oficial(es) autorizado(s)  [Firma legible]  Fecha: 27 de julio de 2015

<sup>1</sup> cuando se aplica la Regla 6.4 (d), tal fecha es la fecha en la que se adquirió el estado de Autoridad Depositaria Internacional.

FIGURA 5b

**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO  
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS  
PARA LOS FINES DE PROCEDIMIENTO DE PATENTES**

Microbial Solutions Ltd.  
The Christian Building  
Oxford University  
Begbroke Science Park  
Yamton  
Oxford  
OX5 1PF

**FORMULARIO INTERNACIONAL**

**RECEPCIÓN EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL  
emitido según la regla 7.1 de la  
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL  
identificada en la parte inferior de esta página**

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE  
A LA QUE SE EMITE LA DECLARACIÓN  
DE VIABILIDAD

I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre:  Como anteriormente  Dirección:	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: NCIMB 42281  Fecha del depósito <sup>1</sup> : 22 de julio de 2015
III. DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
La viabilidad del microorganismo identificado en II. anteriormente se sometió a prueba el 22 de julio de 2015 <sup>2</sup> <sup>2</sup> En esta fecha, dicho microorganismo era  <input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> viable  <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> no viable	

<sup>1</sup> Indicar la fecha del depósito original o, cuando se ha realizado un nuevo depósito o una transferencia, la fecha relevante más reciente (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).

<sup>2</sup> En los casos a los que se hace referencia en la Regla 10.2(a)(ii) y (iii), se hace referencia a la prueba de viabilidad más reciente.

<sup>3</sup> Marcar con una cruz el recuadro aplicable.

FIGURA 5c

IV. CONDICIONES BAJO LAS CUALES SE HA LLEVADO A CABO LA PRUEBA DE VIABILIDAD <sup>4</sup>	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Dirección: Ferguson Building Craibstone Estate Bucksburn Aberdeen AB21 9YA	Firma(s) de la(s) persona(s) que tiene(n) el poder para representar a la Autoridad Depositaria Internacional u oficial(es) autorizado(s)  [Firma legible] Fecha: 27 de julio de 2015

<sup>4</sup> Llenar si la información ha sido solicitada y si los resultados de la prueba fueron negativos.

FIGURA 6a

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO  
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS  
PARA LOS FINES DE PROCEDIMIENTO DE PATENTES

NC 008963

Microbial Solutions Ltd. The Christian Building Oxford University Begbroke Science Park Yamton Oxford OX5 1PF	<p><b>FORMULARIO INTERNACIONAL</b></p> <p><b>RECEPCIÓN EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL</b> emitido según la regla 7.1 de la <b>AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL</b> identificada en la parte inferior de esta página</p>
NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE	
I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia identificativa dada por el DEPOSITANTE:  <i>Bacillus subtilis</i>	Número de registro dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL  NCIMB 42282
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DENOMINACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo en I. anteriormente se acompañó de:	
<input type="checkbox"/> una descripción científica	
<input checked="" type="checkbox"/> una denominación taxonómica propuesta	
(Marque con una cruz lo que sea aplicable)	
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I. anteriormente, que recibió el 26 de junio de 2015 (Fecha del depósito original) <sup>1</sup>	
IV. RECEPCIÓN DE LA SOLICITUD PARA CONVERSIÓN	
El microorganismo identificado I. anteriormente se recibió por esta Autoridad Depositaria Internacional el (fecha del depósito original) y se recibió una solicitud para convertir el depósito original en un depósito según el Tratado de Budapest el (fecha de recepción de la solicitud para conversión)	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: NCIMB Ltd.  Ferguson Building Craibstone Estate Dirección: Bucksburn Aberdeen AB21 9YA	Firma(s) de la(s) persona(s) que tiene(n) el poder para representar a la Autoridad Depositaria Internacional u oficial(es) autorizado(s)  [Firma legible]  Fecha: 2 de julio de 2015

<sup>1</sup> cuando se aplica la Regla 6.4 (d), tal fecha es la fecha en la que se adquirió el estado de Autoridad Depositaria Internacional.

FIGURA 6b

**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO  
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS  
PARA LOS FINES DE PROCEDIMIENTO DE PATENTES**

NC 008963

Microbial Solutions Ltd.  
The Christian Building  
Oxford University  
Begbroke Science Park  
Yamton  
Oxford  
OX5 1PF

**FORMULARIO INTERNACIONAL**

**RECEPCIÓN EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL  
emitido según la regla 7.1 de la  
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL  
identificada en la parte inferior de esta página**

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE  
A LA QUE SE EMITE LA DECLARACIÓN  
DE VIABILIDAD

I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre:  Como anteriormente  Dirección:	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: NCIMB 42282  Fecha del depósito <sup>1</sup> : 26 de junio de 2015
III. DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
La viabilidad del microorganismo identificado en II. anteriormente se sometió a prueba el 26 de junio de 2015 <sup>2</sup> <sup>2</sup> En esta fecha, dicho microorganismo era  <input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> viable  <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> no viable	

<sup>1</sup> Indicar la fecha del depósito original o, cuando se ha realizado un nuevo depósito o una transferencia, la fecha relevante más reciente (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).

<sup>2</sup> En los casos a los que se hace referencia en la Regla 10.2(a)(ii) y (iii), se hace referencia a la prueba de viabilidad más reciente.

<sup>3</sup> Marcar con una cruz el recuadro aplicable.

**FIGURA 6c**

**NC 008963**

IV. CONDICIONES BAJO LAS CUALES SE HA LLEVADO A CABO LA PRUEBA DE VIABILIDAD <sup>4</sup>	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre:  Dirección: Ferguson Building Craibstone Estate Bucksburn Aberdeen AB21 9YA	Firma(s) de la(s) persona(s) que tiene(n) el poder para representar a la Autoridad Depositaria Internacional u oficial(es) autorizado(s)  <p style="text-align: center;">[Firma legible]</p> Fecha: 2 de julio de 2015

<sup>4</sup> Llenar si la información ha sido solicitada y si los resultados de la prueba fueron negativos.

FIGURA 7a

**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO  
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS  
PARA LOS FINES DE PROCEDIMIENTO DE PATENTES**

NC 008963

Microbial Solutions Ltd. The Christian Building Oxford University Begbroke Science Park Yamton Oxford OX5 1PF	<p><b>FORMULARIO INTERNACIONAL</b></p> <p><b>RECEPCIÓN EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL</b> emitido según la regla 7.1 de la <b>AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL</b> identificada en la parte inferior de esta página</p>
NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE	
<b>I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>	
Referencia identificativa dada por el DEPOSITANTE:  <i>Bacillus thuringiensis</i>	Número de registro dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL  NCIMB 42283
<b>II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DENOMINACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA</b>	
El microorganismo en I. anteriormente se acompañó de:	
<input type="checkbox"/> una descripción científica  <input checked="" type="checkbox"/> una denominación taxonómica propuesta  (Marque con una cruz lo que sea aplicable)	
<b>III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN</b>	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I. anteriormente, que recibió el 26 de junio de 2015 (Fecha del depósito original) <sup>1</sup>	
<b>IV. RECEPCIÓN DE LA SOLICITUD PARA CONVERSIÓN</b>	
El microorganismo identificado I. anteriormente se recibió por esta Autoridad Depositaria Internacional el (fecha del depósito original) y se recibió una solicitud para convertir el depósito original en un depósito según el Tratado de Budapest el (fecha de recepción de la solicitud para conversión)	
<b>V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL</b>	
Nombre: NCIMB Ltd.  Ferguson Building Craibstone Estate Dirección: Bucksburn Aberdeen AB21 9YA	Firma(s) de la(s) persona(s) que tiene(n) el poder para representar a la Autoridad Depositaria Internacional u oficial(es) autorizado(s)  [Firma legible]  Fecha: 2 de julio de 2015

<sup>1</sup> cuando se aplica la Regla 6.4 (d), tal fecha es la fecha en la que se adquirió el estado de Autoridad Depositaria Internacional.

FIGURA 7b

**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO  
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS  
PARA LOS FINES DE PROCEDIMIENTO DE PATENTES**

NC 008963

Microbial Solutions Ltd.  
The Christian Building  
Oxford University  
Begbroke Science Park  
Yamton  
Oxford  
OX5 1PF

**FORMULARIO INTERNACIONAL**

**RECEPCIÓN EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL**  
emitido según la regla 7.1 de la  
**AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL**  
identificada en la parte inferior de esta página

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE  
A LA QUE SE EMITE LA DECLARACIÓN  
DE VIABILIDAD

I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre:  Como anteriormente  Dirección:	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: NCIMB 42283  Fecha del depósito <sup>1</sup> : 26 de junio de 2015
III. DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
La viabilidad del microorganismo identificado en II. anteriormente se sometió a prueba el 26 de junio de 2015 <sup>2</sup> <sup>2</sup> En esta fecha, dicho microorganismo era  <input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> viable  <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> no viable	

<sup>1</sup> Indicar la fecha del depósito original o, cuando se ha realizado un nuevo depósito o una transferencia, la fecha relevante más reciente (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).

<sup>2</sup> En los casos a los que se hace referencia en la Regla 10.2(a)(ii) y (iii), se hace referencia a la prueba de viabilidad más reciente.

<sup>3</sup> Marcar con una cruz el recuadro aplicable.

FIGURA 7c

NC 008963

IV. CONDICIONES BAJO LAS CUALES SE HA LLEVADO A CABO LA PRUEBA DE VIABILIDAD <sup>4</sup>	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Dirección: Ferguson Building Craibstone Estate Bucksburn Aberdeen AB21 9YA	Firma(s) de la(s) persona(s) que tiene(n) el poder para representar a la Autoridad Depositaria Internacional u oficial(es) autorizado(s)  [Firma legible]  Fecha: 2 de julio de 2015

<sup>4</sup> Llenar si la información ha sido solicitada y si los resultados de la prueba fueron negativos.

FIGURA 8a

**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO  
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS  
PARA LOS FINES DE PROCEDIMIENTO DE PATENTES**

Microbial Solutions Ltd. The Christian Building Oxford University Begbroke Science Park Yarnton Oxford OX5 1PF	<p><b>FORMULARIO INTERNACIONAL</b></p> <p><b>RECEPCIÓN EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL</b>                  emitido según la regla 7.1 de la  <b>AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL</b>                  identificada en la parte inferior de esta página</p>
NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE	
I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia identificativa dada por el DEPOSITANTE:  <i>Pseudomonas putida</i>	Número de registro dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL  NCIMB 42441
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DENOMINACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo en I. anteriormente se acompañó de:	
<input type="checkbox"/> una descripción científica  <input checked="" type="checkbox"/> una denominación taxonómica propuesta	
(Marque con una cruz lo que sea aplicable)	
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I. anteriormente, que recibió el 22 de julio de 2015 (Fecha del depósito original) <sup>1</sup>	
IV. RECEPCIÓN DE LA SOLICITUD PARA CONVERSIÓN	
El microorganismo identificado I. anteriormente se recibió por esta Autoridad Depositaria Internacional el (fecha del depósito original) y se recibió una solicitud para convertir el depósito original en un depósito según el Tratado de Budapest el (fecha de recepción de la solicitud para conversión)	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: NCIMB Ltd.  Ferguson Building Craibstone Estate Dirección: Bucksburn Aberdeen AB21 9YA	Firma(s) de la(s) persona(s) que tiene(n) el poder para representar a la Autoridad Depositaria Internacional u oficial(es) autorizado(s)  [Firma legible]  Fecha: 27 de julio de 2015

<sup>1</sup> cuando se aplica la Regla 6.4 (d), tal fecha es la fecha en la que se adquirió el estado de Autoridad Depositaria Internacional.

FIGURA 8b

**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO  
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS  
PARA LOS FINES DE PROCEDIMIENTO DE PATENTES**

Microbial Solutions Ltd.  
The Christian Building  
Oxford University  
Begbroke Science Park  
Yamton  
Oxford  
OX5 1PF

**FORMULARIO INTERNACIONAL**

**RECEPCIÓN EN CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL**  
emitido según la regla 7.1 de la  
**AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL**  
identificada en la parte inferior de esta página

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE  
A LA QUE SE EMITE LA DECLARACIÓN  
DE VIABILIDAD

I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre:  Como anteriormente  Dirección:	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: NCIMB 42441  Fecha del depósito <sup>1</sup> : 22 de julio de 2015
III. DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
La viabilidad del microorganismo identificado en II. anteriormente se sometió a prueba el 22 de julio de 2015 <sup>2</sup> <sup>2</sup> En esta fecha, dicho microorganismo era  <input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> viable  <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> no viable	

<sup>1</sup> Indicar la fecha del depósito original o, cuando se ha realizado un nuevo depósito o una transferencia, la fecha relevante más reciente (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).

<sup>2</sup> En los casos a los que se hace referencia en la Regla 10.2(a)(ii) y (iii), se hace referencia a la prueba de viabilidad más reciente.

<sup>3</sup> Marcar con una cruz el recuadro aplicable.

**FIGURA 8c**

IV. CONDICIONES BAJO LAS CUALES SE HA LLEVADO A CABO LA PRUEBA DE VIABILIDAD <sup>4</sup>	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Dirección: Ferguson Building Craibstone Estate Bucksburn Aberdeen AB21 9YA	Firma(s) de la(s) persona(s) que tiene(n) el poder para representar a la Autoridad Depositaria Internacional u oficial(es) autorizado(s)  <p style="text-align: right;">[Firma legible]</p> Fecha: 27 de julio de 2015

<sup>4</sup> Llenar si la información ha sido solicitada y si los resultados de la prueba fueron negativos.

FIGURA 9

