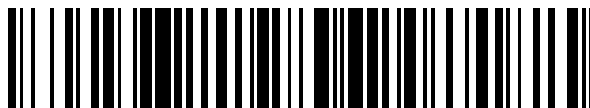


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 927 793**

21 Número de solicitud: 202130405

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/742 (2015.01)

B09C 1/10 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

06.05.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.11.2022

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)
Hospital Real. Avda. del Hospicio s/n
18071 Granada (Granada) ES

72 Inventor/es:

AGUILERA GÓMEZ, Margarita y
LÓPEZ MORENO, Ana

54 Título: **MICROORGANISMOS DE LAS ESPECIES *BACILLUS SPP.* PARA LA ELIMINACIÓN DE DISRUPTORES ENDOCRINOS**

57 Resumen:

Microorganismos de las especies *Bacillus spp.* para la eliminación de disruptores endocrinos.

La presente invención describe el uso de bacterias de las especies *Bacillus spp.*, tolerantes al bisfenol A y con actividad inulinasa, preferentemente aisladas de microbiota intestinal humana, y en particular el uso de *Bacillus sp.* AM1, para eliminar disruptores endocrinos presentes en medios acuosos y en organismos vivos, tanto animales como plantas.

ES 2 927 793 A1

DESCRIPCIÓN

**MICROORGANISMOS DE LAS ESPECIES *BACILLUS* SPP. PARA LA ELIMINACIÓN DE
DISRUPTORES ENDOCRINOS**

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención describe la utilidad microorganismos de las especies *Bacillus* spp., preferentemente aisladas de microbiota humana, para la metabolización y eliminación de
10 disruptores endocrinos, como los bisfenoles y, en particular, el Bisfenol A.

Su principal campo de aplicación es la nutrición animal, veterinaria o medicina, siendo útiles para la administración a animales, preferentemente a través de formulaciones probióticas que los contienen.

15

Estos microorganismos, llamados también microorganismos probióticos para plantas ("*Plant Probiotic Microorganisms*" (PPM)), pueden aplicarse adicionalmente en agricultura, incorporados en composiciones fitosanitarias destinadas a ser un producto para la administración en plantas.

20

Otro campo de aplicación es la biorremediación, y en particular la eliminación de este tipo de contaminantes en aguas.

25

ESTADO DE LA TECNICA

The microorganisms that colonize the human gut are functionally diverse and highly variable [1] where four phyla, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria and Proteobacteria, dominate the human gut. Daily exposure to industrial xenobiotics found in dermal products, food and
30 beverage containers trigger alterations in gut microbiota composition [2]. Dysbiosis, an imbalance in the composition and metabolic capacity of our microbiota, has being related to cumulative intake of a wide variety of xenobiotic substances that induce obesogenic phenotypes [3], and act as endocrine disruptors through microbiota interaction [4,5]. Bisphenol A (BPA) and its analogs (bisphenol-B, -S, -F and -E), used as a building blocks of

polycarbonate plastics, as well as parabens (methyl-, ethyl-, propyl- and phenylparaben), used as antimicrobial preservatives, have been associated with metabolic and endocrine / hormonal diseases [6,7]. Phthalates such as di-(2-ethylhexyl) phthalate are used as plasticizers and have been shown to exert obesogenic effects, affect the reproduction system and modify key glycemic parameters [8,9]. Perchlorates, organophosphates [10] and other pesticides trigger symptoms of diabetes and obesity [11].

Numerous gut microorganisms belonging to Firmicutes phylum possess a diverse and versatile array of enzymes. Species within *Bacillus* genus are consistently identified in the human gut and are a source of enzymes with potential technological applications in the modern food sector [12]. The use of bacterial enzymes in the current food industry has gained increasing recognition in recent years as a result of the demand for new and better products [13]. In this sense, due to the increase in the human population and the growing need for products to satisfy the nutritional requirements of an increasingly demanding population, enzymes of bacterial origin are presented as one of the most versatile alternatives in the current industrial context [14]. Commensal microorganisms isolated from human microbiota could fulfill the criteria of safety assessment and the status of Qualified Presumption of Safety (QPS) [15-16]. In this sense, most species within *Bacillus subtilis* cluster are considered QPS [17] and are increasingly considered as feed additives [18].

Taxonomic classification of *Bacillus* and specific WGS description of their encoded biochemical pathways is needed to consider the food and feed safety of *Bacillus* strains [19]. Ecological and phenotypical heterogeneity within *Bacillus* genus has rendered pure 16S rDNA-based taxonomy inefficient to discern between *Bacillus* species, even leading to misclassifications in the past [20]. Next Generation Sequencing platforms and in silico tools have been developed to perform appropriate phylogenomic classifications and predict metabolic pathways involved in industrial and environmental processes, expanding the molecular knowledge on the enzymatic arsenal for BPA degradation in *Bacillus* species. Few microbial cultivation studies explored the potential BPA degrading capacity of *Bacillus* species for environmental bioremediation [21].

Recent approaches to assess the degradation pathways of BPA in *Bacillus* and other microorganisms provided a new field of research to understand in the context of industrial and environmental biotechnology [22-23].

BPA is a dietary xenobiotic banned at specific levels, being gut microbiota a potential source for screening the capacities of tolerance and biodegradation capacities. Particular microorganisms might provide endogenous bioremediation and could become detoxifying probiotics.

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención describe el uso de bacterias de las especies *Bacillus* spp. tolerantes al bisfenol A y con actividad inulinasa, preferentemente aisladas de microbiota intestinal humana, en particular bacterias pertenecientes al grupo taxonómico *Bacillus amyloliquefaciens* y preferentemente *Bacillus* sp. AM1, para eliminar disruptores endocrinos presentes en medios acuosos (normalmente aguas residuales), y en organismos vivos, tanto animales como plantas.

El genoma completo WGS de la cepa *Bacillus* sp. AM1 resultó poseer el arsenal completo de genes que codifican enzimas para degradaciones versátiles de disruptores endocrinos, lo que da lugar a varios tipos de aplicaciones: El uso de estas cepas en biorremediación, para contribuir a la conservación del medio ambiente; Su aplicación para la producción de piensos y alimentos funcionales (probióticos) y / o para contribuir a la modulación de la patogénesis endocrina causada por estos contaminantes.

En un aspecto más concreto, la presente invención se refiere a una composición o formulación probiótica que comprende al menos una bacteria de esa especie.

En una realización particular, dicha composición probiotica es apta para su administración a animales, y/o preferentemente seres humanos.

En otra realización particular, la composición probiótica se emplea para eliminar disruptores endocrinos en plantas, siendo otro aspecto de la invención una composición bioprotectora que comprende estas bacterias como principio activo.

5 En otro aspecto, la invención está relacionada con el uso de estas bacterias para la prevención y/o el tratamiento complementario de pacientes con enfermedades asociadas a patogénesis endocrinas causadas por disruptores endocrinos con efectos obesógenicos, que desencadenan obesidad, diabetes, síndrome del hígado graso (NFLAD), trastornos de hiperactividad o cáncer

10

En otra realización, estas bacterias se emplean en el tratamiento de medios contaminados, preferentemente medios acuosos. Concretamente, la invención se refiere al uso de estas bacterias para la eliminación de estos contaminantes en agua.

15 La aplicación preferente de la invención es la metabolización y/o degradación de bisfenoles y, aún más preferente, Bisfenol A, ya que estas bacterias presentan una actividad de metabolización sorprendente sobre este disruptor endocrino. Los resultados obtenidos muestran eficiencias de eliminación superior al 80% en el caso de bisfenol A.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Representa un árbol filogenético basado en la secuencia parcial del gen de ARN 16S de cepas aisladas de *Bacillus* sp. y especies estrechamente relacionadas. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el modelo de Tamura-Nei. El árbol se infirió mediante el método de máxima verosimilitud. Se muestran los nombres de las especies y cepas, y los números de acceso se indican entre paréntesis. Los valores de bootstrap después de 1000 re-muestreos se indican en los nodos de rama. Bar, sustitución de 0,0020 nucleótidos por sitio.

30

Figura 2.- Representa (a) la morfología de la colonia de *Bacillus* sp. en medio MRS; (b) la curva de degradación del BPA por *Bacillus* sp. AM1. La capacidad de biodegradación del BPA se probó en cultivos líquidos TSB de *Bacillus* sp. AM1 expuesto a una concentración variables de 25 ppb de BPA a 30°C durante 72h (sistema LC-MS / MS para cuantificación); (c) las

curvas de biodegradación del BPA por *Bacillus* sp. AM1. La capacidad de biodegradación del BPA se probó en cultivos líquidos TSB de *Bacillus* sp. AM1 adicionado de con concentraciones variables de 5 ppm-150 ppm de BPA a 30°C durante 72h (sistema LC-MS / MS para cuantificación).

5

Figura 3.- Representa los árboles filogenómicos basados en secuencias de genes de *Bacillus* sp. AM1: (a) gen de ARNr 16S, las distancias evolutivas se calcularon utilizando Tamura-Nei; (b) gen *gyrA*, las distancias evolutivas se calcularon utilizando el modelo de JTT; (c) gen *rpoB*, las distancias evolutivas se calcularon utilizando el modelo de JTT. El árbol se infirió mediante el método de máxima verosimilitud. Se muestran los nombres de las especies y cepas, y los números de acceso se indican entre paréntesis. Los valores de Bootstrap se muestran después de 1000 re-muestreos.

10

Figura 4.- Representa las vías de biodegradación propuestas para degradación del BPA basadas en el análisis WGS de *Bacillus* sp. AM1: pasos de reacción, enzimas, números EC (Enzyme Commission numbers), ID de proteínas y loci de genes específicos.

15

20 DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

El término “disruptor endocrino” hace referencia a compuestos químicos que alteran el funcionamiento del sistema endocrino, mediante el bloqueo o mimetización de la respuesta a las hormonas esteroideas y alterando la biosíntesis, y que causan alteraciones fisiopatológicas y efectos adversos en la salud de animales y plantas, y en especial del ser humano. Ejemplos de disruptores endocrinos son los ftalatos, los parabenos, las benzofenonas o los bisfenoles

25

30

El término “bacteria tolerantes al bisfenol A” se refiere a bacterias que por exposición al bisfenol no se ven afectadas, manteniendo su viabilidad y la estabilidad fenotípica y genotípica.

El término “*bacteria degradadoras de bisfenol A*” se refiere a bacterias que son capaces de biodegradar el bisfenol A por rutas metabólicas (Figura 5).

El término “*actividad inulinasa*” hace referencia a la producción, por parte del microorganismo, de una enzima codificada internacionalmente con el código [EC:3.2.1.7] (3. Hydrolases, 3.2 Glycosylases, 3.2.1 Glycosidases, i.e. enzymes that hydrolyse O- and S-glycosyl compounds, 3.2.1.7 inulinase, K22245 INUA; inulinase) que cataliza la hidrólisis del polisacárido inulina en sus componentes elementales de fructosa.

Por “*AM1*”, “*Bacillus sp. AM1*” o “*Bacillus sp. AM1 WGS*”, se entenderá la cepa bacteriana de *Bacillus sp. AM1* cuyo genoma fue depositado en GenBank el 20 de enero de 2020 por la Universidad de Granada (número de depósito CP0476444.1). Esta cepa es un caso concreto de *Bacillus*, filogenéticamente relacionado con el grupo taxonómico *Bacillus amyloliquefaciens*, capaz de degradar Bisfenol A y que presenta actividad inulinasa.

La capacidad de biodegradación está apoyada tanto en ensayos fenotípicos, químicos, como en la presencia diferencial de los genes que codifican enzimas de 4 rutas metabólicas degradadoras de bisfenol.

Complete gene-encoded enzymes for the four reference pathways of BPA degradation were found in Bacillus sp. AM1 genome, a major difference with Bacillus sp. GZB strain.

Por “*eliminación de contaminantes*” se entenderá tanto la total eliminación de compuestos contaminantes en un medio como la reducción de su presencia en el medio, ya sea por degradación o descomposición en moléculas menos contaminantes. En particular, el término “contaminante” incluye compuestos que actúan como disruptores endocrinos como el bisfenol-A (BPA) y sus análogos (bisfenol-B, -S, -F y -E).

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

El término “tratamiento” o “tratar” en el contexto de este documento se refiere a la administración de una composición según la invención para prevenir, mejorar o eliminar niveles de disruptores endocrinos obesógenos que podrían desencadenar síntomas de una enfermedad, condición patológica o uno o más síntomas asociados con dicha enfermedad o condición en un mamífero, preferentemente en cánidos o humanos, más preferentemente en perros. “Tratamiento” también abarca la prevención, mejora o eliminación de las secuelas fisiológicas de la enfermedad. Concretamente, el concepto “tratar” se puede interpretar como:

- i. Inhibir o prevenir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- ii. Paliar síntomas o aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causa la regresión de la enfermedad o la condición patológica;
- iii. Estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

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

Uso de bacterias para la eliminación de disruptores endocrinos

En su aspecto más general, la presente invención propone el uso de bacterias aisladas de microbiota de las especies *Bacillus* spp. tolerantes al bisfenol A y con actividad inulinasa, en adelante “bacterias de la invención”, preferentemente aisladas de la microbiota intestinal humana, para eliminar, mediante su metabolización, disruptores endocrinos.

En una realización particular, las bacterias de la invención son bacterias pertenecientes al grupo taxonómico *Bacillus amyloliquefaciens*, y, de forma preferente bacterias de la cepa *Bacillus* sp. AM1.

Estas bacterias son útiles para la eliminación de disruptores endocrinos tanto en animales y plantas como en medios contaminados, preferentemente medios acuosos.

Probióticos o microorganismos beneficiosos de nueva generación (NGP)

En otro aspecto más concreto, la presente invención se refiere a una formulación probiótica (en adelante, también, “probiótico”) que comprende una población de bacterias de la invención, preferentemente bacterias de la cepa AM1.

5

En una realización particular, dicha composición probiótica es apta para su administración a animales, y/o preferentemente seres humanos.

10

En otra realización particular, la composición probiótica se emplea para metabolizar y eliminar disruptores endocrinos en plantas (PPM), siendo otro aspecto de la invención una composición bioprotectora que comprende estas bacterias como principio activo.

Prevención y/o tratamiento paliativo de síntomas de enfermedades asociados a disbiosis de la microbiota intestinal

15

En otro aspecto, la presente invención está relacionada con el uso de las bacterias de la invención para la prevención y/o el tratamiento de manifestaciones de enfermedades o trastornos que se han desencadenado por la alta exposición y presencia de obesógenos de la dieta, de tipo disruptores endocrinos en el organismo del paciente / asociadas a patogénesis endocrinas causadas por disruptores endocrinos, en particular, con el tratamiento de

20 pacientes con obesidad, diabetes, NFLAD, trastornos de hiperactividad o determinados cáncer hormono-dependientes [*Risk of Dietary Hazardous Substances and Impact on Human Microbiota: Possible Role in Several Dysbiosis Phenotypes*. *Frontiers in Microbiology*. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.669480>], [*ENDOBOLOME, a new concept for determining the influence of microbiota disrupting chemicals in relation to specific endocrine pathogenesis*. *Frontiers in Microbiology*. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.578007>].

25

Así, es objeto de la invención una bacteria de la invención, o una población de bacterias de la invención, o una preparación/composición que comprende bacterias de la invención, o un suplemento probiótico que comprende bacterias de la invención para la prevención y/o el

30 tratamiento de enfermedades, o para la fabricación de un nutracéutico o un medicamento.

De forma preferente, las enfermedades que se pueden prevenir, paliar y tratar síntomas con las bacterias de la invención o con un medicamento que comprende las bacterias de la

invención, son obesidad, diabetes, síndrome metabólico y/o NFLAD, trastornos de hiperactividad (axis brain-gut) o determinados cáncer hormono-dependientes.

5 En otra realización preferente, las bacterias de la invención pertenecen al grupo taxonómico *Bacillus amyloliquefaciens*, y más preferentemente son *Bacillus* sp. AM1, on *Bacillus* sp. AM1.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento paliativo de síntomas de pacientes afectados por un tumor, en adelante “método de tratamiento de la invención” mediante el uso de las bacterias de la invención, o de una composición o medicamento que las comprende. Los efectos de este método de prevención y/o tratamiento de síntomas incluyen, pero no se limitan, a los efectos de eliminación del tumor, el incremento del tiempo de progresión de la enfermedad y al índice de supervivencia. Los efectos del tratamiento incluyen a más largo plazo el control de la enfermedad.

15 Este tratamiento consiste en la administración a los individuos afectados por estas enfermedades de cantidades terapéuticamente efectivas de formulaciones con las bacterias de la invención, o de una composición o nutracéutico o un medicamento que las comprende.

20 De forma preferente, las bacterias de la invención administradas han sido aisladas de la microbiota intestinal de humana.

De forma preferente, las bacterias de la invención administradas pertenecen al grupo taxonómico *Bacillus amyloliquefaciens*, y más preferentemente son *Bacillus* sp. AM1.

25

Tratamiento de medios contaminados

En otra realización, las bacterias de la invención se emplean en el tratamiento de medios contaminados, preferentemente medios acuosos. Concretamente, la invención se refiere al uso de estas bacterias para la eliminación de estos contaminantes en agua.

30

En un aspecto particular, la invención se refiere a un método para eliminar disruptores endocrinos en medios contaminados que comprende poner en contacto el medio contaminado con una o más bacterias de la invención, preferentemente bacterias de la cepa *Bacillus* sp. AM1.

De forma preferente, en todas las aplicaciones anteriores, las bacterias de la invención, y preferentemente las bacterias de la cepa *Bacillus* sp. AM1 se emplean para eliminar o degradar bisfenoles y, aún más preferente, Bisfenol A.

5

Este método de eliminación de contaminantes en medios acuosos permite eliminar más del 80%, e incluso más del 84%, de los disruptores endocrinos presentes en el medio, y en realizaciones preferentes, este porcentaje de eliminación se consigue en 72h.

10

Así, en una realización particular, el procedimiento de eliminación de disruptores endocrinos es un procedimiento para eliminar al menos el 80%, preferentemente al menos el 84% de disruptores endocrinos presentes en medios acuosos, preferentemente bisfenoles, y aún más preferentemente bisfenol A.

15

En una realización preferente, el procedimiento de eliminación de disruptores endocrinos emplea al menos 0,8 a 1,8 g de biomasa bacteriana por litro de medio contaminado.

MODOS DE REALIZACIÓN

20

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

BPA-tolerant microorganisms isolated from human microbiota: 16S RNA partial gene identification and phylogenetic analysis

25

Our hypothesis was to seek for human microbes capable of tolerating and metabolizing the endocrine disruptor BPA [4], the most important bisphenol in a large family of chemicals that are utilized to produce polycarbonates and epoxy resins and found in foods, drinks and baby bottles. A comprehensive approach involved culturing and isolation of gut microbial species in BPA-enriched complete or minimal media for further morphology, phylogenetical, biochemical as well as WGS analyses was undertaken. It is an untested innovative strategy for rational and functional search of potential next generation probiotics for biotechnological use in BPA detoxification. This study sets the basis for future linked omics and multidisciplinary studies

30

aimed at the identification of new BPA-degrading microbes in human gut and their association with short and long-term daily intake of BPA.

Isolation and identification of BPA-tolerant strains from microbiota samples was successful from the different concentrations used [0.5; 10; 20 and 50 ppm] and demonstrated a clear predominance of Firmicutes phylum taxa. This is one of the most populated phyla in microbiota with wide compositional, clinical and functional variability [24-25]. Out of these 20 isolates analyzed, 83.3% were related to the genus *Bacillus*, and 16.7% of the strains were distributed within *Staphylococcus*, *Enterococcus*, and *Streptococcus* genera. However, the analysis of these minority genera was beyond the objective of the present work. The phylogenetic tree based on partial 16S RNA gene of *Bacillus* spp. isolated strains showed a main cluster related to *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* and *B. siamensis* (Figure 1), being only C1, C2 and B5 isolates different to the rest of *Bacillus* spp. The repeated presence of closely related *B. amyloliquefaciens* isolates in approximately 30% of fecal samples analyzed suggested differential metabolic detoxifying potential of these species in individuals under high dietary exposure level to BPA [7] or food endocrine microbiota disruptors (EMD) [4].

Moreover, preliminary data on parallel metagenomics analyses were in concordance with this percentage of *Bacillus* sp. presence (data not shown). We hypothesize that long-term daily intake of xenobiotic compounds such as BPA or parabens present in food containers may select specific taxa groups in the intestinal microbiota, thus increasing or reducing microbial populations according to their enzymatic capacity to tolerate and metabolize BPA. Increased isolation of species *Bacillus amyloliquefaciens* in individuals might reveal a clinical potential impact through high tolerance to BPA [26].

Interestingly, the potential BPA metabolism by *Bacillus* spp. has solely being investigated in relation to environmental and bioremediation resources [22-23]. The present study constitutes the first report on BPA-tolerant human microbiota species that might become a new extensive biotechnological source of probiotics for plants, food, and clinical purposes. In this sense, several *Bacillus* strains are proposed for being anti-obesogenic probiotics [27-28]. Still, the major limitation for using these new potential probiotics is the lack of standardized criteria and protocols for target disorders. Next-generation probiotics for obesity-related diseases promise to improve the rational of clinical trial design and outcomes [29]. Additional microbial food safety and risk assessments would be requested for strains proposed to food and feed, including strain characterization and genome sequencing, screening for undesirable attributes

and metabolites, and experimental evidence of safety by appropriately designed safety evaluation studies [18, 30].

Identification of the representative BPA-Tolerant microbiota strain and morphological features

All isolated and typified strains were able to tolerate between 0,5-50 ppm of BPA. *Bacillus* sp. AM1 (B1) was the BPA-tolerant selected strain representing the main phylogenetic cluster (Figure 1) for being further analyzed (phenotypic features and WGS). This selection was done based on the following enzymatic and phenotypic characteristics preliminary analyzed: B1 strain was able to tolerate higher concentration of BPA; B1 showed special morphological and phenotypic features, such as biopolymers EPS and PHA production that can protect from the xenobiotic exposure (Figure 2), specific gene-encoding enzymes for both biopolymers were also found in the WGS of *Bacillus* sp. AM1 ; and the phylogenetic identification as shown in Figure 1, B1 may represent the major close-related group. This cluster represented by B1 strain, and grouping B3, B4, C3, C4, C5 strains was close-related to the operational *B. amyloliquefaciens* group [20], became the most frequently identified related species from the microbiota samples analyzed.

Bacillus sp. AM1 is an anaerobic facultative rod with subterminal swollen spores. Pale yellow colonies forming oleaginous drops in MRS medium are typical (Figure 2.a). Similarly, lipid, wax ester, or PHA producers showed similar morphology and characteristics [31-32]. Transmission electron microscopy (TEM) revealed the presence of clear cytoplasmatic lipid accumulations similar to PHA granule accumulation. We also observed biopolymers type capsular EPS (Figure 2.b).

The hydrolytic enzyme capacities of *Bacillus* sp. AM1 (Table 1) revealed similar results to those described for *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, and *B. siamensis*, including inulinase activity. *Bacillus* genus is considered of interest for its enzyme productivity for many manufacturing processes . The antibiotic sensitivity testing revealed that *Bacillus* sp. AM1 was resistant to ampicillin, ceftazidime, penicillin and amoxicillin/clavulanic acid (Table 2). These resistances were previously described as intrinsic resistance showed commonly by *Bacillus* spp., not posing any safety concern [18].

Tabla 1.- Results derived from the enzymatic analysis of *Bacillus* sp. AM1.

Enzyme test	Microorganisms					
	<i>Bacillus</i> sp. AM1	<i>B.</i> <i>amyloliquefaciens</i> (DSM7)	<i>B.</i> <i>velezensis</i> (CR-502)	<i>B. siamensis</i> (KCTC13613)	<i>B.cereus</i> (B7)	<i>B.mycoides</i> (B12)
Starch	+	+	+	++	++	++
Inuline	+	-	-	-	+	+
DNase	++	+	+	-	-	-

Tabla 2.- Antibiotic sensitivity testing

Antibiotic	Concentration (µg)	Resistance (R) Sensitive (S)	Zone inhibition (mm)
Ampicillin	10	R	-
Amikacin	30	S	14
Ceftazidime	30	R	-
Ciprofloxacin	5	S	40
Chloramphenicol	30	S	42
Clindamycin	2	S	22
Erythromycin	15	S	25
Gentamicin	10	S	22
Imipenem	10	S	50
Penicillin	10	R	-
Rifampicin	30	S	29
Vancomycin	30	S	22
Kanamycin	30	S	19
Streptomycin	10	R	-
Tetracycline	30	S	17
Co-Trimoxazole	25	S	39
Amoxicillin/ Clavulanic acid	20/10	R	-

5

Bacillus sp. AM1 was able to grow in BPA-enriched M9 medium (0.5 ppm) showing a slower colony development compared to the control and M9 containing glucose as sole carbon source (0.5 ppm). Conversely, *Bacillus* sp. AM1 was not able to grow on M9 medium containing BPS (0.5 ppm), an analogue of BPA, indicating that BPS may be toxic or cannot be used as sole carbon source by this strain. *Bacillus* sp. AM1 was capable of degrading 84.68% of BPA after 72h, using a starting BPA concentration of 25 ppb (Figure 2.c). A similar pattern of biodegradation was shown by *Bacillus* sp. GZB [22].

10

15

Whole genome sequence of *Bacillus* sp. AM1 analysis

14

WGS of *Bacillus* sp. AM1 (GenBank CP047644.1) showed a total length (bp) of 4,203,926 and a G+C content value of 45.98 %. The genome of strain *Bacillus* sp. AM1 shared 67.67–98.36% ANI values with *Bacillus subtilis* cluster (Table S4). DNA–DNA hybridization (isDDH) relatedness between strain *Bacillus* sp. AM1 and the known *Bacillus* species ranged from 28.2 to 83%. Results from the ANI and isDDH analyses and the phylogenomic trees based on 16S RNA gene (Figure 3.a), *gyrB* (Figure 3.b) and *rpoB* (Figure 3.c) suggested that strain *Bacillus* sp. AM1 belongs to the safe operational group *B. amyloliquefaciens* [20], with no pathogenic or virulence factors or toxin genes. Moreover, rMLST analysis showed match to 55 genes and, within them, to 6 genes unique and specific of *Bacillus* sp. AM1: *rpmD*, *rplM*, *rplI*, *rplE*, *rplA*, *rpsG*. We are aware that many species of *Bacillus* are difficult to be taxonomically classified under the universal rules; thus additional phylogenomic and phenotypic data will be obtained for a more precise classification. Moreover, EPS and PHA biosynthesis complete gene pathways were also identified, confirming the observable features by TEM analyses (Figure 2.b).

Description of putative BPA biodegradation pathways by microbiota BPA-tolerant isolate

BPA biodegradation occurs due to the contribution and coordination of many expressed protein-coding genes. Complete gene-encoded enzymes for the four reference pathways of BPA degradation were found in *Bacillus* sp. AM1 genome, a major difference with *Bacillus* sp. GZB strain, isolated from recalcitrant environment, whose description seemed to lack 30 % of these enzymes [22]. Description of reaction steps, specific enzymes, EC number, genes loci, protein ID from each pathway are shown in Figure 4. This versatile gene arsenal for BPA metabolization enzymes should be confirmed with functional and chemical analyses, but underscores the huge potential of BPA biodegradation, possibly generating intermediate metabolites with more or less estrogenic-linked effects [22, 36]. Our results suggest that the establishment of routes linked to the degradation of estrogenic xenobiotics, such as BPA, involves the participation of a large number of microbial enzymes whose joint activity entails the production of a multitude of intermediate less toxic byproducts which can even be found related to other metabolic routes or destined to the energy production through the Cycle of Tricarboxylic Acids [23]. Likewise, numerous studies related to the metabolism of BPA highlighted the central role of cytochrome P450 in bacteria [37-38]. Lobos et al. [39] and Sasaki, et al. [40] revealed the existence of microorganisms belonging to *Sphingomonas* and

Bacillus genera capable of using BPA as a carbon source through its degradation in multiple stages, with the production of end byproducts of variable toxicity.

5 Materials and Methods

Tolerant-BPA bacterial isolation from human gut microbiota with biotechnological interest

Ten microbial isolates from fecal human microbiota collections of 0 to 1 year old infants (Isolates B- Project INFABIO) and 6 to 8 year children (Isolates C-Project OBEMIRISK) were obtained by a serial dilution method, exposition to different BPA concentrations [0.5; 10; 20
10 and 50 ppm] during 72 h and further spreading in BHI/MRS media incubated under aerobic and anaerobic conditions (anaerobic jars anaerocult®) at 37°C.

The BPA-tolerant bacterial colonies with distinguishing features were isolated as pure culture for subsequent morphological, phenotypic and genotypic identifications: bacterial cell counts,
15 gram staining, spore staining, capsule staining, catalase activity, oxidase, and motility tests.

Genomic DNA from tolerant-BPA bacterial isolates, taxonomy identification and phylogenetic analysis.

Genomic DNA was extracted using DNAeasy columns (Qiagen®, Germany) following the
20 manufacturing instructions. The isolated DNA was quantified using Nanodrop (Thermo Scientific) and biophotometer (Eppendorf® D30). The quality of DNA was monitored through gel electrophoreses. 16S RNA gene sequencing of selected bacterial strains was done by Sanger method. Forward and reverse sequences were provided separately. Reverse sequence was converted to complementary sequence with Chromas Pro 2.0 software
25 (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Australia). Sequences were inspected for maximum homology against GenBank using NCBI's BLASTn program. The collection of 16S RNA partial gene sequences is done using the Ezbiocloud platform. Phylogenetic trees were constructed using MEGA X applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms [41].

30 Morphological features and identification of BPA-Tolerant bacterial strain

The selection of a representative sample from fecal BPA-tolerant microorganisms for further phenotypic and WGS analysis was done according to specific phenotypic features and specific phylogenetic classification.

Transmission electron microscopy was used to examine possible structural changes in the selected strain. The samples were obtained after exposing the bacteria to the different BPA treatments. The techniques detailed below were carried out in the Laboratory for the Preparation of Biological Samples of the Microscopy Service of the Center for Scientific Instrumentation (CIC) of the University of Granada. Samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer (pH7.4, 0.05M) for 24 hours at 4 ° C. After washing them 3 times in sodium cacodylate buffer (pH7.4, 0.1M) for 15 min, the postfixation was carried out with 1% osmium tetroxide + 1% potassium ferricyanide in water for 2 hours. It was washed again 3 times in water 15 min. And dehydration was realized using ascending ethanol gradients (50%, 70%, 90% and 100%) for 15 min. Subsequently, the infiltration was carried out in a mixture of ethanol / resin (Epon 812) 2:1, 2:2 and 1:2 for 1 hour and then it was the inclusion in pure resin overnight. After polymerization at 60°C for 48 hours, ultrafine sections of 700 nm were made (in a Leica Ultracut R ultramicrotome) deposited on copper grids and contrasted with uranyl acetate and lead citrate.

The enzymatic assay were also determinate for starch, carboxymethyl cellulose, gelatin, inulin, tween 80, DNase supplemented media were used to test several enzymes production according to complementary methodologies previously described [42].

The antimicrobial resistance patterns of *Bacillus* sp. AM1 to 17 clinically important antibiotics, included those antibiotics recommending on the EFSA guidelines for testing antimicrobial susceptibility of the *Bacillus* species [43], were conducted using the agar disc-diffusion method. The strains were characterized as sensitive or resistant based on the size of the inhibition zones around each disc, according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI) criteria [44].

BPA tolerance testing

BPA biodegradation capacity was tested in TSB liquid cultures of *Bacillus* sp. AM1 exposed to 25 ppb concentration of BPA at 30°C during 72h. Microbial preparations were measured through LC-MS/MS system for BPA quantification. Minimal medium 9 (M9) and M9 containing BPA (0.5 ppm) as sole carbon source were used for the isolation of BPA tolerant or biodegradation strain. M9 containing glucose (0.5 ppm) and M9 containing BPS (0.5 ppm) were also used to compare the growth ability. Chemicals, reagents, instrumentation and software for bisphenols determination were carried out by CIC services under validated procedures previously described by García-Córcoles et al. [45].

Whole Genome Sequence of BPA-Tolerant bacterial strain

Genomic DNA extraction for WGS: *Bacillus* sp. AM1 (B1) selected for its phenotypic characteristics and its potential in biotechnology was inoculated in 2 ml nutrient broth, followed by overnight incubation at 37 °C. The cells were harvested by centrifugation at 5000 g for 10 min. Genomic DNA was extracted using DNAeasy columns (Qiagen®, Germany) as previously described.

High-throughput sequencing: Shotgun library preparation of *Bacillus* sp. AM1 (B1) strain was performed using the Nextera DNA Sample Preparation kit (Illumina, USA). Clusters generation and the sequencing were performed using the TruSeq™ PE Cluster kit v2-cBot-HS and TruSeq SBS v3-HS (200 cycle) kit respectively (Illumina, USA). The sequencing was performed on the HiScan SQ sequencer (Illumina, USA).

Genome assembly and annotation: Hybrid de novo assembly was performed with Illumina short reads (c.a. 440X coverage, 150bp pair end reads) and Oxford Nanopore long reads (c.a. 1800X coverage) using Unicycler1 with the “conservative” option and –threads 10 parameter [46].

Whole Genome Sequence analyses: Phylogenomic analysis

Genome-based taxonomic classification and genome assembly were searched at Microbial Genomes Atlas (MiGA) online server (<http://www.microbial-genomes.org>) that uses NCBI non-redundant prokaryotic genomes database, JSpeciesWS (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws>), and TrueBac™ ID system from the EzBio-Cloud server (<https://www.ezbiocloud.net/contents/genome>). The species identification carried out in TrueBac-ID was based on the comparison of average nucleotide sequence identity (ANI) between the genomes of *Bacillus* sp. AM1 and the related type strains. For a reliable identification of the strains, the Type (Strain) Genome Server (TYGS) was employed. Prediction from identified Ribosomal Multilocus Sequence Typing (rMLST) alleles linked to genomes (53 rps genes) was used as a means of integrating microbial taxonomy and typing [47]. 16S RNA gene and the housekeeping genes *gyrB* and *rpoB* sequences were used for phylogenomic identification.

Prokaryotic genome comparisons were performed by ANI calculator using the OrthoANLu algorithm available on Ezbiocloud [48]. Digital or isDDH analyses were carried out by Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) (formula 2) [49].

Whole Genome Sequence analyses: Molecular and gene prediction and annotations

Draft *Bacillus* sp. AM1 genome was annotated using the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP). The functional annotation of genes was also carried out using web-based Rapid Annotation Using Subsystem Technology (RAST) annotation server (<http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>). Protein coding genes were scanned for their organization into operons using the web server Operon-mapper. Functional annotation of genes in terms of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) orthology assignments and predictions of KEGG pathways were carried out through KEGG Automatic Annotation Server (KAAS) server (<https://www.genome.jp/kegg/kaas/>) using bidirectional best hit (BBH) method in GhostZ. Similarly, the *Bacillus* sp. AM1 genome were also scanned for cluster of orthologous groups (COGs) annotations using eggNOG-mapper v2 (<http://eggno-mapper.embl.de>). Automated Carbohydrate-active enzyme ANnotation web server, (dbCAN meta server (<http://bcb.unl.edu/dbCAN2/blast.php>), was employed to annotate Carbohydrate-Active enZymes (CAZy).

Whole Genome Sequence analyses: Identification of microbial enzymes isolated from bisphenol A tolerant microorganisms

Specific genes and amino acid sequences of the BPA-tolerant representative microorganism were searched by screening according to phenotypic and chemical characteristics such as EPS, PHA, and other enzymes related to the BPA degradation pathways: quinol enzymes, laccase, through BLAST (NCBI), EZBIOCLOUD, BRENDA, UNIPROT, and EXPASY. A more exhaustive and combined analysis using the KEGG database (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) allowed corroborating the identity of the enzymes involved in metabolic pathways of BPA degradation previously describe by Li et al. [22]. EC numbers results essential for the screening in WGS *Bacillus* sp. AM1 protein encoding genes.

References:

1. Gibson, M. K.; Crofts, T. S.; Dantas, G. Antibiotics and the Developing Infant Gut Microbiota and Resistome. *Curr Opin Microbiol* **2015**, 27, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.07.007>.
2. Quigley, E. M. M. Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. *Curr Neurol Neurosci Rep* **2017**, 17 (12), 94. <https://doi.org/10.1007/s11910-017-0802-6>.
3. Andújar, N.; Gálvez-Ontiveros, Y.; Zafra-Gómez, A.; Rodrigo, L.; Álvarez-Cubero, M. J.; Aguilera, M.; Monteagudo, C.; Rivas, A. A. Bisphenol A Analogues in Food and Their

Hormonal and Obesogenic Effects: A Review. *Nutrients* **2019**, *11* (9).
<https://doi.org/10.3390/nu11092136>.

4. Aguilera, M.; Gálvez-Ontiveros, Y.; Rivas, A. Endobolome, a New Concept for
 Determining the Influence of Microbiota Disrupting Chemicals (MDC) in Relation to
 Specific Endocrine Pathogenesis. *Front Microbiol* **2020**, *11*, 578007.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.578007>.

5. Gálvez-Ontiveros, Y.; Páez, S.; Monteagudo, C.; Rivas, A. Endocrine Disruptors in Food:
 Impact on Gut Microbiota and Metabolic Diseases. *Nutrients* **2020**, *12* (4).
<https://doi.org/10.3390/nu12041158>.

6. Verbanck, M.; Canouil, M.; Leloir, A.; Dhennin, V.; Coumoul, X.; Yengo, L.; Froguel, P.;
 Poulain-Godefroy, O. Low-Dose Exposure to Bisphenols A, F and S of Human Primary
 Adipocyte Impacts Coding and Non-Coding RNA Profiles. *PLoS One* **2017**, *12* (6),
 e0179583. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179583>.

7. Gálvez-Ontiveros, Y.; Moscoso-Ruiz, I.; Rodrigo, L.; Aguilera, M.; Rivas, A.; Zafra-Gómez,
 A. Presence of Parabens and Bisphenols in Food Commonly Consumed in Spain. *Foods*
2021, *10* (1), 92. <https://doi.org/10.3390/foods10010092>.

8. Zhang, Y.; Dong, T.; Hu, W.; Wang, X.; Xu, B.; Lin, Z.; Hofer, T.; Stefanoff, P.; Chen, Y.;
 Wang, X.; Xia, Y. Association between Exposure to a Mixture of Phenols, Pesticides, and
 Phthalates and Obesity: Comparison of Three Statistical Models. *Environ Int* **2019**, *123*,
 325–336. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.11.076>.

9. Milošević, N.; Milanović, M.; Sudji, J.; Bosić Živanović, D.; Stojanoski, S.; Vuković, B.;
 Milić, N.; Medić Stojanoska, M. Could Phthalates Exposure Contribute to the Development
 of Metabolic Syndrome and Liver Disease in Humans? *Environ Sci Pollut Res Int* **2020**,
27 (1), 772–784. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06831-2>.

10. Roman, P.; Cardona, D.; Sempere, L.; Carvajal, F. Microbiota and Organophosphates.
Neurotoxicology **2019**, *75*, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.09.013>.

11. Yuan, X.; Pan, Z.; Jin, C.; Ni, Y.; Fu, Z.; Jin, Y. Gut Microbiota: An Underestimated and
 Unintended Recipient for Pesticide-Induced Toxicity. *Chemosphere* **2019**, *227*, 425–434.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.088>.

12. Woldemariam, K.; Wan, Z.; Yu, Q.; Li, H.; Wei, X.; Liu, Y.; Wang, J.; Sun, B. Prebiotic,
 Probiotic, Antimicrobial, and Functional Food Applications of *Bacillus Amyloliquefaciens*.
J Agric Food Chem **2020**, *68* (50), 14709–14727.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06396>.

13. Casado, V.; Martín, D.; Torres, C.; Reglero, G. Phospholipases in Food Industry: A Review. *Methods Mol Biol* **2012**, *861*, 495–523. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_29.
14. Moran, K.; de Lange, C. F. M.; Ferket, P.; Fellner, V.; Wilcock, P.; van Heugten, E. Enzyme
5 Supplementation to Improve the Nutritional Value of Fibrous Feed Ingredients in Swine
Diets Fed in Dry or Liquid Form. *J Anim Sci* **2016**, *94* (3), 1031–1040.
<https://doi.org/10.2527/jas.2015-9855>.
15. Gómez-Gallego, C.; Pohl, S.; Salminen, S.; De Vos, W. M.; Kneifel, W. Akkermansia
Muciniphila: A Novel Functional Microbe with Probiotic Properties. *Benef Microbes* **2016**,
10 7 (4), 571–584. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0009>.
16. Brodmann, T.; Endo, A.; Gueimonde, M.; Vinderola, G.; Kneifel, W.; de Vos, W. M.;
Salminen, S.; Gómez-Gallego, C. Safety of Novel Microbes for Human Consumption:
Practical Examples of Assessment in the European Union. *Front Microbiol* **2017**, *8*, 1725.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01725>.
17. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Koutsoumanis, K.; Allende, A.; Alvarez-
Ordóñez, A.; Bolton, D.; Bover-Cid, S.; Chemaly, M.; Davies, R.; De Cesare, A.; Hilbert,
F.; Lindqvist, R.; Nauta, M.; Peixe, L.; Ru, G.; Simmons, M.; Skandamis, P.; Suffredini, E.;
Cocconcelli, P. S.; Fernández Escámez, P. S.; Maradona, M. P.; Querol, A.; Suarez, J.
E.; Sundh, I.; Vlak, J.; Barizzzone, F.; Correia, S.; Herman, L. Scientific Opinion on the
20 Update of the List of QPS-Recommended Biological Agents Intentionally Added to Food
or Feed as Notified to EFSA (2017-2019). *EFSA J* **2020**, *18* (2), e05966.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5966>.
18. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP);
Bampidis, V.; Azimonti, G.; Bastos, M. de L.; Christensen, H.; Dusemund, B.; Kouba, M.;
25 Fašmon Durjava, M.; López-Alonso, M.; López Puente, S.; Marcon, F.; Mayo, B.; Pechová,
A.; Petkova, M.; Ramos, F.; Sanz, Y.; Villa, R. E.; Woutersen, R.; Cocconcelli, P. S.;
Glandorf, B.; Herman, L.; Prieto Maradona, M.; Saarela, M.; Brozzi, R.; Galobart, J.;
Gregoret, L.; López-Gálvez, G.; Vettori, M. V.; Innocenti, M. L.; Sofianidis, K. Safety and
Efficacy of Bacillus SubtilisPB6 (Bacillus VelezensisATCC PTA-6737) as a Feed Additive
30 for Chickens for Fattening, Chickens Reared for Laying, Minor Poultry Species (except for
Laying Purposes), Ornamental, Sporting and Game Birds. *EFSA J* **2020**, *18* (11), e06280.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6280>.
19. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP);
Rychen, G.; Aquilina, G.; Azimonti, G.; Bampidis, V.; Bastos, M. de L.; Bories, G.;

Chesson, A.; Cocconcelli, P. S.; Flachowsky, G.; Gropp, J.; Kolar, B.; Kouba, M.; López-Alonso, M.; López Puente, S.; Mantovani, A.; Mayo, B.; Ramos, F.; Saarela, M.; Villa, R. E.; Wallace, R. J.; Wester, P.; Glandorf, B.; Herman, L.; Kärenlampi, S.; Aguilera, J.; Anguita, M.; Brozzi, R.; Galobart, J. Guidance on the Characterisation of Microorganisms Used as Feed Additives or as Production Organisms. *EFSA J* **2018**, *16* (3), e05206. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5206>.

20. Fan, B.; Blom, J.; Klenk, H.-P.; Borriss, R. *Bacillus Amyloliquefaciens*, *Bacillus Velezensis*, and *Bacillus Siamensis* Form an “Operational Group *B. Amyloliquefaciens*” within the *B. Subtilis* Species Complex. *Front Microbiol* **2017**, *8*, 22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022>.

21. Yamanaka, H.; Moriyoshi, K.; Ohmoto, T.; Ohe, T.; Sakai, K. Degradation of Bisphenol A by *Bacillus Pumilus* Isolated from Kimchi, a Traditionally Fermented Food. *Appl Biochem Biotechnol* **2007**, *136* (1), 39–51. <https://doi.org/10.1007/BF02685937>.

22. Li, G.; Zu, L.; Wong, P.-K.; Hui, X.; Lu, Y.; Xiong, J.; An, T. Biodegradation and Detoxification of Bisphenol A with One Newly-Isolated Strain *Bacillus* Sp. GZB: Kinetics, Mechanism and Estrogenic Transition. *Bioresour Technol* **2012**, *114*, 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.067>.

23. Das, R.; Liang, Z.; Li, G.; Mai, B.; An, T. Genome Sequence of a Spore-Laccase Forming, BPA-Degrading *Bacillus* Sp. GZB Isolated from an Electronic-Waste Recycling Site Reveals Insights into BPA Degradation Pathways. *Arch Microbiol* **2019**, *201* (5), 623–638. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01622-2>.

24. Jandhyala, S. M.; Talukdar, R.; Subramanyam, C.; Vuyyuru, H.; Sasikala, M.; Nageshwar Reddy, D. Role of the Normal Gut Microbiota. *World J Gastroenterol* **2015**, *21* (29), 8787–8803. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>.

25. Indiani, C.; Rizzardi, K. F.; Castelo, P. M.; Ferraz, L. F. C.; Darrieux, M.; Parisotto, T. M. Childhood Obesity and Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Gut Microbiota: A Systematic Review. *Child Obes* **2018**, *14* (8), 501–509. <https://doi.org/10.1089/chi.2018.0040>.

26. Andra, S. S.; Austin, C.; Yang, J.; Patel, D.; Arora, M. Recent Advances in Simultaneous Analysis of Bisphenol A and Its Conjugates in Human Matrices: Exposure Biomarker Perspectives. *Sci Total Environ* **2016**, *572*, 770–781. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.062>.

27. Cao, G. T.; Dai, B.; Wang, K. L.; Yan, Y.; Xu, Y. L.; Wang, Y. X.; Yang, C. M. *Bacillus Licheniformis*, a Potential Probiotic, Inhibits Obesity by Modulating Colonic Microflora in

C57BL/6J Mice Model. *J Appl Microbiol* **2019**, 127 (3), 880–888.
<https://doi.org/10.1111/jam.14352>.

28. Wang, Y.; Wu, Y.; Wang, B.; Xu, H.; Mei, X.; Xu, X.; Zhang, X.; Ni, J.; Li, W. *Bacillus amyloliquefaciens* SC06 Protects Mice Against High-Fat Diet-Induced Obesity and Liver Injury via Regulating Host Metabolism and Gut Microbiota. *Front. Microbiol.* **2019**, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01161>.
29. López-Moreno, A.; Suárez, A.; Avanzi, C.; Monteoliva-Sánchez, M.; Aguilera, M. Probiotic Strains and Intervention Total Doses for Modulating Obesity-Related Microbiota Dysbiosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* **2020**, 12 (7). <https://doi.org/10.3390/nu12071921>.
30. Pariza, M. W.; Gillies, K. O.; Kraak-Ripple, S. F.; Leyer, G.; Smith, A. B. Determining the Safety of Microbial Cultures for Consumption by Humans and Animals. *Regul Toxicol Pharmacol* **2015**, 73 (1), 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.07.003>.
31. Thomson, N.; Summers, D.; Sivaniah, E. Synthesis, Properties and Uses of Bacterial Storage Lipid Granules as Naturally Occurring Nanoparticles. *Soft Matter* **2010**, 6 (17), 4045–4057. <https://doi.org/10.1039/B927559B>.
32. Zhang, K.; Zhou, C.; Zhou, Z.; Li, X.; Li, Z.; Zhang, M.; Zhang, X.; Zhang, C.; Wei, T.; Zhang, S.; Liu, P. Identification of Lipid Droplets in Gut Microbiota. *bioRxiv* **2020**, 2020.05.06.080317. <https://doi.org/10.1101/2020.05.06.080317>.
33. Bonartsev, A. P.; Voinova, V. V.; Bonartseva, G. A. Poly(3-Hydroxybutyrate) and Human Microbiota (Review). *Appl Biochem Microbiol* **2018**, 54 (6), 547–568. <https://doi.org/10.1134/S0003683818060066>.
34. Deb, P.; Talukdar, S. A.; Mohsina, K.; Sarker, P. K.; Sayem, S. A. Production and Partial Characterization of Extracellular Amylase Enzyme from *Bacillus Amyloliquefaciens* P-001. *Springerplus* **2013**, 2 (1), 154. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-154>.
35. Latorre, J. D.; Hernandez-Velasco, X.; Wolfenden, R. E.; Vicente, J. L.; Wolfenden, A. D.; Menconi, A.; Bielke, L. R.; Hargis, B. M.; Tellez, G. Evaluation and Selection of *Bacillus* Species Based on Enzyme Production, Antimicrobial Activity, and Biofilm Synthesis as Direct-Fed Microbial Candidates for Poultry. *Front Vet Sci* **2016**, 3. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00095>.
36. Ohore, O. E.; Zhang, S. Endocrine Disrupting Effects of Bisphenol A Exposure and Recent Advances on Its Removal by Water Treatment Systems. A Review. *Scientific African* **2019**, 5, e00135. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00135>.

37. Sasaki, M.; Tsuchido, T.; Matsumura, Y. Molecular Cloning and Characterization of Cytochrome P450 and Ferredoxin Genes Involved in Bisphenol A Degradation in *Sphingomonas Bisphenolicum* Strain AO1. *J Appl Microbiol* **2008**, *105* (4), 1158–1169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03843.x>.
- 5 38. Nakamura, S.; Tezuka, Y.; Ushiyama, A.; Kawashima, C.; Kitagawara, Y.; Takahashi, K.; Ohta, S.; Mashino, T. Ipso Substitution of Bisphenol A Catalyzed by Microsomal Cytochrome P450 and Enhancement of Estrogenic Activity. *Toxicol Lett* **2011**, *203* (1), 92–95. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.03.010>.
- 10 39. Lobos, J. H.; Leib, T. K.; Su, T. M. Biodegradation of Bisphenol A and Other Bisphenols by a Gram-Negative Aerobic Bacterium. *Appl Environ Microbiol* **1992**, *58* (6), 1823–1831. <https://doi.org/10.1128/AEM.58.6.1823-1831.1992>.
- 15 40. Sasaki, M.; Akahira, A.; Oshiman, K.; Tsuchido, T.; Matsumura, Y. Purification of Cytochrome P450 and Ferredoxin, Involved in Bisphenol A Degradation, from *Sphingomonas* Sp. Strain AO1. *Appl Environ Microbiol* **2005**, *71* (12), 8024–8030. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8024-8030.2005>.
41. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* **2018**, *35* (6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- 20 42. Menasria, T.; Monteoliva-Sánchez, M.; Benammar, L.; Benhadj, M.; Ayachi, A.; Hacène, H.; Gonzalez-Paredes, A.; Aguilera, M. Culturable Halophilic Bacteria Inhabiting Algerian Saline Ecosystems: A Source of Promising Features and Potentialities. *World J Microbiol Biotechnol* **2019**, *35* (9), 132. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2705-y>.
- 25 43. EFSA Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) 2012; guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance (question no EFSA-Q-2011-01108, adopted: 23 May 2012 by European Food Safety Authority) *EFSA J* **2012**, *10*, 10, 10.2903/j.efsa.2012.2740
- 30 44. Humphries, R. M.; Ambler, J.; Mitchell, S. L.; Castanheira, M.; Dingle, T.; Hindler, J. A.; Koeth, L.; Sei, K. CLSI Methods Development and Standardization Working Group Best Practices for Evaluation of Antimicrobial Susceptibility Tests. *J Clin Microbiol* **2018**, *56* (4). <https://doi.org/10.1128/JCM.01934-17>.
45. García-Córcoles, M. T.; Cipa, M.; Rodríguez-Gómez, R.; Rivas, A.; Olea-Serrano, F.; Vílchez, J. L.; Zafra-Gómez, A. Determination of Bisphenols with Estrogenic Activity in Plastic Packaged Baby Food Samples Using Solid-Liquid Extraction and Clean-up with

Dispersive Sorbents Followed by Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry Analysis. *Talanta* **2018**, 178, 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.067>.

46. Wick, R. R.; Judd, L. M.; Gorrie, C. L.; Holt, K. E. Unicycler: Resolving Bacterial Genome Assemblies from Short and Long Sequencing Reads. *PLoS Comput Biol* **2017**, 13 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>.

47. Jolley, K. A.; Bliss, C. M.; Bennett, J. S.; Bratcher, H. B.; Brehony, C.; Colles, F. M.; Wimalarathna, H.; Harrison, O. B.; Sheppard, S. K.; Cody, A. J.; Maiden, M. C. J. Ribosomal Multilocus Sequence Typing: Universal Characterization of Bacteria from Domain to Strain. *Microbiology (Reading)* **2012**, 158 (Pt 4), 1005–1015. <https://doi.org/10.1099/mic.0.055459-0>.

48. Yoon, S.-H.; Ha, S.-M.; Lim, J.; Kwon, S.; Chun, J. A Large-Scale Evaluation of Algorithms to Calculate Average Nucleotide Identity. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2017**, 110 (10), 1281–1286. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0844-4>.

49. Meier-Kolthoff, J. P.; Auch, A. F.; Klenk, H.-P.; Göker, M. Genome Sequence-Based Species Delimitation with Confidence Intervals and Improved Distance Functions. *BMC Bioinformatics* **2013**, 14, 60. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>.

REIVINDICACIONES

1.- Microorganismo *Bacillus* sp. caracterizado por ser tolerante al bisfenol A y con actividad inulinasa, para su uso en la metabolización de disruptores endocrinos, preferiblemente bisfenoles.

2.- Microorganismo según la reivindicación anterior para su uso en la metabolización de disruptores endocrinos, preferiblemente bisfenoles caracterizado porque el microorganismo se ha aislado de microbiota intestinal humana.

3.- Microorganismo, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, filogenéticamente relacionado con el grupo taxonómico *Bacillus amyloliquefaciens*, para su uso en la metabolización de disruptores endocrinos, preferiblemente bisfenoles.

4.- Microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en la metabolización de disruptores endocrinos, preferiblemente bisfenoles, caracterizado porque el microorganismo pertenece a la cepa *Bacillus* sp. AM1 cuyo genoma completo fue depositado en GenBank el 20 de enero de 2020 por la Universidad de Granada (número de depósito (CP047644.1).

5.- Microorganismo cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en eliminación de bisfenol A.

6.- Composición probiótica que comprende al menos un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en la metabolización de disruptores endocrinos, preferiblemente bisfenoles.

7.- Composición probiótica según la reivindicación anterior, caracterizado porque es para su uso en la biodegradación de bisfenol A.

8.- Composición probiótica según las reivindicaciones 6 o 7, apta para su administración en humanos.

9.- Microorganismo según reivindicaciones 1 a 4 o composición según reivindicación 8, para la prevención y/o el tratamiento paliativo de enfermedades ligadas a disbiosis de la microbiota intestinal y causadas por la exposición a disruptores endocrinos.

5 10.- Composición probiótica según las reivindicaciones 6 o 7, apta para su uso como microorganismos probióticos para plantas.

10 11.- Composición fitosanitaria que comprende al menos un probiótico según reivindicación 1 a 4, para su uso en la eliminación o degradación de disruptores endocrinos, preferiblemente bisfenoles.

12.- Composición fitosanitaria según la reivindicación 11 para su uso en la biodegradación del bisfenol A.

15 13.- Composición fitosanitaria según las reivindicaciones 11 o 12, apta para ser administrada en plantas.

20 14.- Método de eliminación de bisfenol A presente en un medio contaminado que emplea al menos un microorganismo según las reivindicaciones 1-4.

15.- Método de eliminación según reivindicación 14, que comprende poner en contacto uno o más microorganismos con el medio contaminado con bisfenol A.

25 16.- Método de eliminación según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, caracterizado porque la eliminación del bisfenol A es superior al 80% y preferentemente superior al 84%.

17.- Método de eliminación según cualquiera de las reivindicaciones 13-16, que elimina el 84% de bisfenol A presente en el medio en 72h.

30 18.- Método de eliminación según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17 que emplea al menos de 0,8 a 1,8 g de biomasa bacteriana por litro de medio contaminado.

19.- Método para la eliminación de bisfenol A presente en una planta que comprende la adición de un probiótico según las reivindicaciones 6 o 7, en el agua de riego.

Figura 1

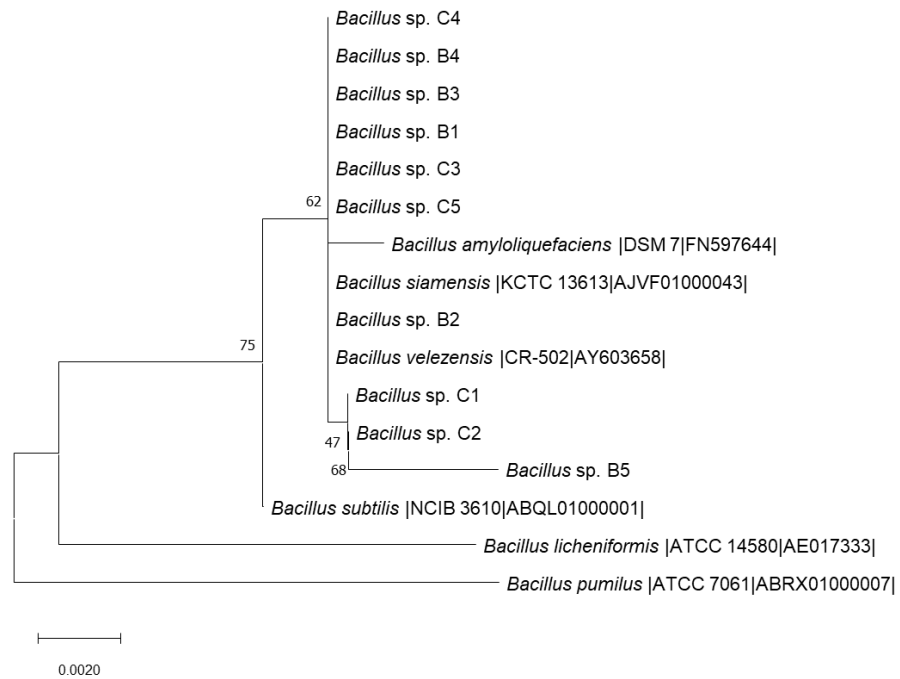


Figura 2

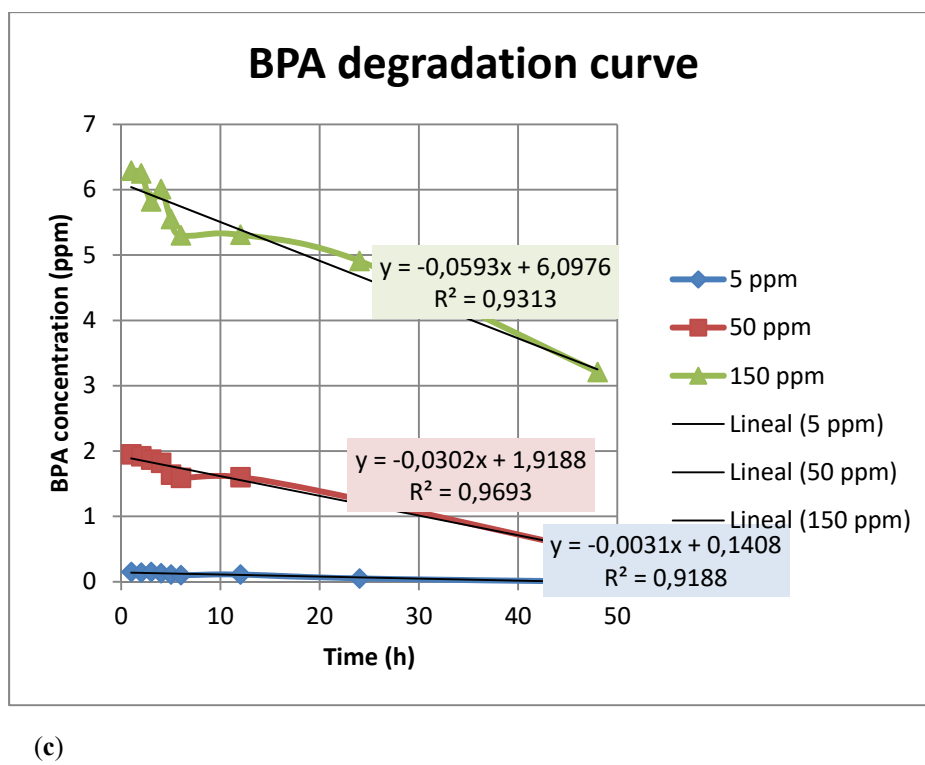
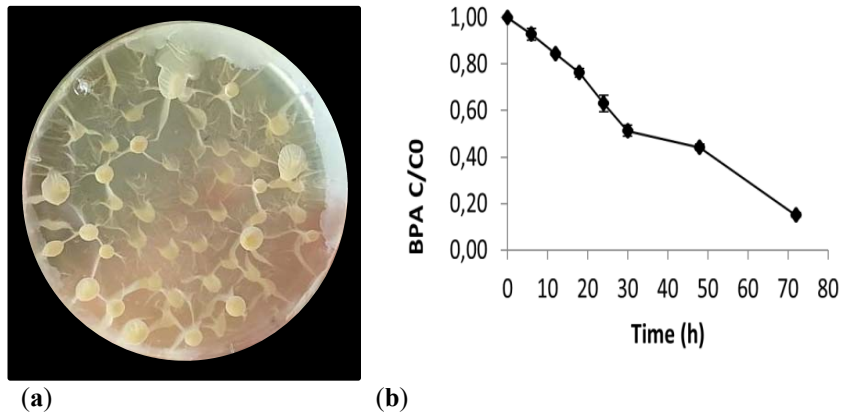
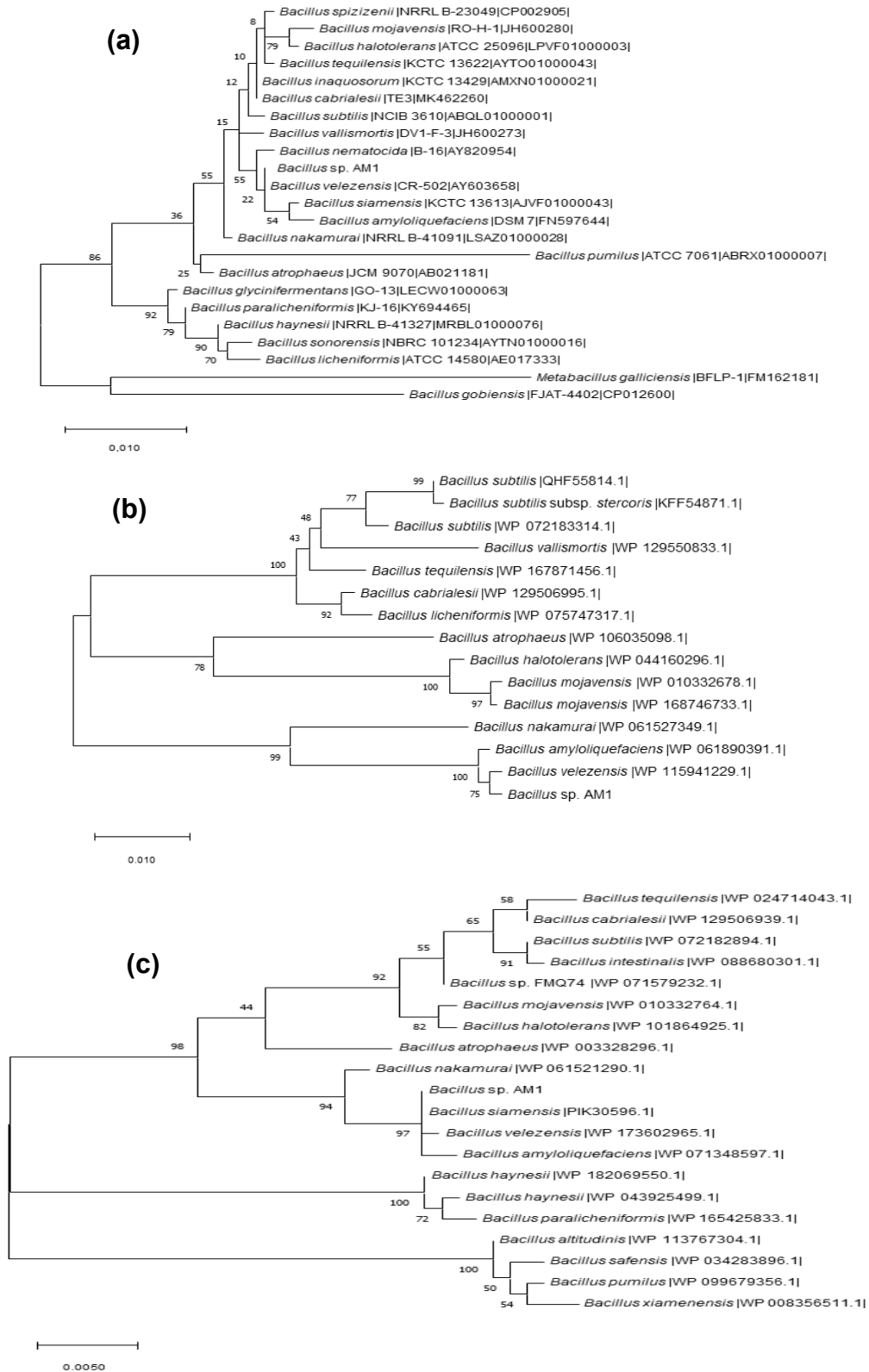


Figura 3







②① N.º solicitud: 202130405

②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.05.2021

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ZÜHLKE MARIE-KATHERIN et al. "A novel mechanism of conjugate formation of bisphenol A and its analogues by <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> : Detoxification and reduction of estrogenicity of bisphenols". International Biodeterioration & Biodegradation, (2016) Elsevier, Amsterdam, NL. Boopathy Raj; Jegatheesan Jega; Shu Li; Bae Jaeho; Jusoh Ahmad, (06/02/2016), Vol. 109, Páginas 165-173 [en línea] [recuperado el 13-07-2021], ISSN 0964-8305, <DOI: doi: 10.1016/j.ibiod.2016.01.019>. todo el documento.	1-5, 14, 15, 18
Y		6-9
Y	KYRILA G. et al. "Bisphenol A removal and degradation pathways in microorganisms with probiotic properties" Journal of Hazardous Materials, (09-02-2021), Vol. 413, Nº 125363 [en línea] [recuperado el 09-02-2022], <DOI: doi:10.1016/j.jhazmat.2021.125363>. todo el documento.	6-9
A	GUIYING LI et al. "Biodegradation and detoxification of bisphenol A with one newly-isolated strainsp. GZB: Kinetics, mechanism and estrogenic transition". Bioresource Technology, (2012) ELSEVIER, AMSTERDAM, NL. (22/03/2012), Vol. 114, Páginas 224-230 [en línea] [recuperado el 12-07-2021], ISSN 0960-8524, <DOI: doi: 10.1016/j.biortech.2012.03.067>. todo el documento.	1-9, 14, 15, 18
A	YAMANAKA H et al. "Degradation of bisphenol a by <i>Bacillus pumilus</i> isolated from kimchi, a traditionally fermented food". Applied Biochemistry and Biotechnology (January 2007) Humana Press Inc. US., (31/12/2006), Vol. 136, Nº 1, Páginas 39-51 [en línea] [recuperado el 19-07-2021], ISSN 0273-2289 (print), <DOI: doi: 10.1007/BF02685937>. todo el documento.	1-9, 14, 15, 18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☐ para todas las reivindicaciones

☒ para las reivindicaciones nº: 1-9, 14, 15, 18

Fecha de realización del informe
10.02.2022

Examinador
M. d. García Coca

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/20 (2006.01)

A61K35/742 (2015.01)

B09C1/10 (2006.01)

C12R1/07 (2006.01)

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

C12N, A61K, B09C, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/Elsevier, XPESP, Compendex/EI,