



31 NUMERO 2962/83-6		DATOS DE PRIORIDAD 32 FECHA 31-5-1983		33 PAIS Suiza	A1 12 PATENTE DE INVENCIÓN
21 NUMERO DE SOLICITUD 532.914					
22 FECHA DE PRESENTACION 29-5-1984					

71 SOLICITANTE(S) CIBA-GEIGY AG. DOMICILIO Klybeckstrasse 141, 4002 Basilea, Suiza.	NACIONALIDAD Suiza
--	-----------------------

72 INVENTOR(ES)
 Dr. Oreste Ghisalpa, Dr. Martin Küenzi.

73 TITULAR(ES)

11 N.º DE PUBLICACION 8600171	45 FECHA DE PUBLICACION	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA	GRAFICO (SOLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)
----------------------------------	-------------------------	--------------------------------------	---

51 Int. Cl.
 Int. Cl.³ C 02 F 3/34, 3/02 // C 12 R 1/38

54 TITULO
 PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION MICROBIOLÓGICA DE SOLUCIONES ACUOSAS.

57 RESUMEN (APORTACION VOLUNTARIA, SIN VALOR JURIDICO)

La presente invención se refiere a nuevos microorganismos metilotróficos facultativos del genero Pseudomonas ó de un genero similar al de las Pseudomonas, a cultivos mixtos, a un procedimiento para la purificación microbiológica de soluciones acuosas mediante la degradación de compuestos que contienen grupos metilo en presencia de estos microorganismos, la masa celular con sus componentes que se obtienen de estos microorganismos, así como al empleo de la masa celular obtenible según el presente procedimiento.

Bajo la expresión "microorganismos metilotróficos" se entienden aquellos microorganismos que crecen sobre medios nutrientes que como fuente de carbono contienen compuestos con solamente un átomo de carbono, por ejemplo, metanol, ó con varios átomos de carbono sin enlace C-C directo, por ejemplo, dimetilamina [Patt, Cole und Hansen, International J. Systematic Bacteriology 26 (2), 226-229 (1979)]7.

Bajo la expresión "microorganismos metilotróficos facultativos" se entienden aquellos microorganismos que crecen sobre medios nutrientes que como fuente de carbono contienen compuestos con solamente un átomo de carbono, por ejemplo, metanol, y/o los compuestos con varios átomos de carbono con ó sin enlace C-C, por ejemplo, glucosa ó dimetilamina.

En la literatura se describen microorganismos metilotróficos facultativos que en solución acuosa degradan uno ó varios compuestos del siguiente grupo de compuestos orgánicos ó bién se pueden aprovechar como fuente de carbono ó de carbono y nitrógeno: metano, metanol, etanol, acetatos, por ejemplo, acetato sódico, glucosa, determinados compuestos de metilamonium, por ejemplo, cloruro de metil-, etil- ó trimetilamonium, ó las aminos libres de estas sales.

Tales microorganismos han sido depositados en distintas colecciones de cepas, por ejemplo, en la American Type Culture Collection (ATCC), en la Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) ó en la National Collection of Industrial Bacteria (NCIB), y se mencionan en los catalogos publicados por estos lugares de depósito.

En el Environmental Protection Agency (EPA) Report 2-79-163 de Dojlido J.R. del Dez. 1979, así como en la publicación breve en Chem. Ind. 34 (1982), 750 (Biologische Entfernung von Stickstoffverbindungen aus Abwässern) se menciona la posibilidad de una eliminación de dimetilformamida en soluciones acuosas con lodos de clarificación. En ambas publicaciones falta, sin embargo, una caracterización general de los microorganismos que están contenidos en estos lodos de clarificación así como una caracterización de los microorganismos que pueden degradar la dimetilformamida.

En la literatura no hay indicaciones sobre el lugar de hallazgo, el aislamiento, la identificación ó el lugar de depósito de un microorganismo degradador de la dimetilformamida, ó de un cultivo mixto. Tampoco la literatura mencionada contiene indicación alguna sobre el empleo de un microorganismo aislado ó de un cultivo mixto aislado en un procedimiento microbiológico para la purificación de aguas residuales que contengan dimetilformamida como impureza.

En la producción técnica en gran escala en la industria química se obtienen soluciones acuosas, por ejemplo, aguas residuales que como impurezas contienen, por ejemplo, dimetilformamida y/o formamida, metil- ó etilformamida, acetamida, sales de formiato ó de acetato, glucosa, metanol, etanol, cloruro de metil-, etil-, dimetil- ó trimetilamonium, dimetilfos-

fito, trimetilfosfito, acetonitrilo ó isobutironitrilo. La purificación de estas aguas residuales resulta problemática debido a los procedimientos de combustión hasta ahora usuales, ya que la combustión de sustancias residuales orgánicas vale como método de eliminación extraordinariamente desventajoso que va ligado a elevados costes y asimismo a altas combinaciones para el medio ambiente.

La presente invención tiene el cometido de hallar y aislar nuevos microorganismos ó cultivos mixtos que en soluciones acuosas, bajo un consumo lo más total posible de los compuestos mencionados, presenten un crecimiento especialmente bueno.

Este cometido se soluciona mediante la presente invención que tiene por objeto nuevos microorganismos metilotróficos facultativos del genero *Pseudomonas* ó de un genero similar al de las *Pseudomonas* y a cultivos mixtos. La presente invención tiene igualmente por objeto un procedimiento para la purificación microbiológica de soluciones acuosas mediante la degradación de dimetilformamida, formamida, metil- ó etilformamida, acetamida, metanol, etanol, sacáridos, alcanosatos inferiores, haluros de metil-, etil-, dimetil- ó trimetilamonium, dimetilfosfito, trimetilfosfito, hidantoina, creatina, creatinina, ácido barbitúrico, colina, betaina, sarcosina, dimetilglicina, glicina, ácido glioxílico, ácidos N-formilamínicos, ácidos N-acetilamínicos, acetonitrilo ó isobutironitrilo, ó las mezclas de estos compuestos, en presencia de nuevos microorganismos ó cultivos mixtos, la masa celular con sus componentes, que se obtiene de estos nuevos microorganismos ó cultivos mixtos, así como el empleo de la masa celular obtenible según el presente procedimiento.

Las expresiones generales empleadas anteriormente y a continuación tienen en la descripción de la presente invención preferentemente los siguientes significados:

5 Los sacáridos son, por ejemplo, mono- ó disacáridos, por ejemplo, hexosas, por ejemplo, glucosa ó fructosa.

10 Los alcanosatos inferiores son, por ejemplo, metil- ó etilformiato ó -acetato, ó las sales, por ejemplo, las sales de metal alcalino del ácido fórmico, por ejemplo, formiato sódico ó potásico, ó las sales, por ejemplo, las sales de metal alcalino del ácido acético, por ejemplo, el acetato sódico ó potásico.

Los haluros de metil-, etil-, dimetil- ó trimetilamoni- um son el cloruro de metil-, etil-, dimetil- ó trimetilamoni- um, además también los bromuros.

15 Los aminoácidos N-formílicos son, por ejemplo, N-formilglicina, -alanina, -valina, -serina ó -treonina.

Aminoácidos N-acetíflicos son, por ejemplo, N-acetilglicina, -alanina, -valina, -serina ó -treonina.

20 Masas celulares son, por ejemplo, todos los sistemas celulares que se encuentran en estado viviente, por ejemplo, en estado de división ó en estado de reposo, en muerte celular parcial ó total, ó ya en la descomposición enzimática ó en la descomposición por cultivos extraños, que se constituyen por los microorganismos de la presente solicitud.

25 Componentes de estas masas celulares son, por ejemplo, los enzimas ya contenidos, por ejemplo, los extractos de enzimas obtenibles de la masa celular, que igualmente pueden degradar en solución acuosa los compuestos ó bien las impurezas anteriormente mencionadas, por ejemplo, la dimetilformamida.

30 La presente invención se refiere especialmente a mi-

croorganismos metilotróficos facultativos del genero Pseudomonas ó de un genero similar a las Pseudomonas, a cultivos mixtos y a un procedimiento para la purificación microbiológica de soluciones acuosas por degradación de dimetilformamida, metilformamida, etilformamida, formamida, metanol, etanol, formiato ó acetato sódicos ó potásicos, cloruro de metil-, etil-, dimetil- ó trimetilamonium, trimetilfosfito, dimetilfosfito, acetonitrilo, isobutironitrilo ó las mezclas de estos compuestos.

La presente invención se refiere, en primer lugar, a los microorganismos del grupo de las siguientes cepas: DMF 3/3 (NRRL-B-15358), DMF 3/4 (NRRL-B-15359), DMF 3/5 (NRRL-B-15360), DMF 3/6 (NRRL-B-15361), DMF 3/11 (NRRL-B-15362), DMF 3/12 (NRRL-B-15363), DMF 4/4 (NRRL-B-15364), DMF 5/3 (NRRL-B-15365), DMF 5/5 (NRRL-B-15366), DMF 5/7 (NRRL-B-15367), DMF 5/8 (NRRL-B-15368), DMF 5/9 (NRRL-B-15369), DMF 5/10 (NRRL-B-15370), los cultivos mixtos de estas cepas, el cultivo mixto DMF/HW 1-5 (NRRL-B-15371) y a los procedimientos para la purificación microbiológica de soluciones acuosas por degradación de dimetilformamida.

Los nuevos microorganismos provienen del lodo de clarificación de una instalación de purificación de aguas residuales de Ciba-Geigy Ag Suiza (ARA Ciba-Geigy) y del lodo clarificador de un estanque de lodos (lecho seco) en Kairouan, Tunez. El cultivo mixto DMF/HW 1-5 se aisló del sedimento del Lago Hallwiler en Suiza. Todos los microorganismos así como el cultivo mixto han sido depositados en Agricultural Research Culture Collection in Peoria, Illinois 61 604, USA en fecha 13.4.83.

En la tabla 1 a continuación se indican los números

de depósito y el lugar de hallazgo para cada una de las cepas individuales ó bien para el cultivo mixto.

Tabla 1:

	Denominación interna	Número de depósito	Lugar de hallazgo
5	DMF 3/3	NRRL B-15358	ARA Ciba-Geigy
	DMF 3/4	NRRL B-15359	ARA Ciba-Geigy
	DMF 3/5	NRRL B-15360	ARA Ciba-Geigy
	DMF 3/6	NRRL B-15361	ARA Ciba-Geigy
	DMF 3/11	NRRL B-15362	ARA Ciba-Geigy
10	DMF 3/12	NRRL B-15363	ARA Ciba-Geigy
	DMF 4/4	NRRL B-15364	Kairouan
	DMF 5/3	NRRL B-15365	Kairouan
	DMF 5/5	NRRL B-15366	Kairouan
	DMF 5/7	NRRL B-15367	Kairouan
15	DMF 5/8	NRRL B-15368	Kairouan
	DMF 5/9	NRRL B-15369	Kairouan
	DMF 5/10	NRRL B-15370	Kairouan
	DMF/HW 1-5 (cultivo mixto)	NRRL B-15371	Hallvilersee

Caracterización de los nuevos microorganismos:

20 1. Método de aislamiento:

Una muestra de agua residual ó suspensión de lodo clarificador (1 g por 10 cc de agua de esteril) se introduce en un matraz de agitación donde se encuentran 20 cc de la solución nutriente esteril MV 7. Se agregan aproximadamente 0,1 g de dimetilformamida filtrada en forma esteril, para la tampónación de la solución nutriente se mezcla con 1 cc de tampón de fosfato 1-M y se incuba a 28°C el cultivo de agitación a 25 250 rpm durante 7-14 días. 1 cc de este primer cultivo de enri-

quecimiento se vierte en 20 cc de solución nutriente MV 7 fresca con 0,1 g de dimetilformamida y nuevamente se incuba a 28° y un pH de 7 (cultivo de agitación 250 rpm, 7-14 días). 1 cc del segundo cultivo de enriquecimiento se vierte de nuevo en 20 cc de solución nutriente MV 7 fresca con 0,1 g de dimetilformamida y se incuba bajo las condiciones mencionadas. De 1 cc del tercer cultivo de enriquecimiento se prepara entonces nuevamente con 20 cc de solución nutriente MV 7 y 0,1 g de dimetilformamida bajo las condiciones mencionadas un cuarto cultivo de enriquecimiento. Los cultivos de enriquecimiento así obtenidos se aplicaron en cada caso sobre fondos nutrientes sólidos esteriles de MV 7-agar [solución nutriente MV 7 con adición de 20 g/l de agar (Difco)] y se incuba a 28°C. Las colonias individuales se levantan cuidadosamente y se aplican de nuevo sobre el mismo medio. Estos procedimientos se repitieron varias veces hasta obtener productos aislados puros.

La solución nutriente MV 7 empleada contiene en un litro de agua los siguientes componentes: 2 g de NH_4NO_3 (fuente de nitrógeno), 1,4 g de Na_2HPO_4 , 0,6 g de KH_2PO_4 (tampón y fuente de fósforo), 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,01 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 1 cc de solución de elementos en huellas (compuesto en cada caso de 20 mg/l de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$. Para la obtención de esta solución nutriente se disuelven las sales en agua destilada, la solución se ajusta con solución acuosa diluida de hidróxido sódico bajo control del pH a un pH de 7 y ésta se completa con agua destilada a 1 litro. Para la obtención del fondo nutriente sólido MV 7-agar se le agregan a la solución nutriente MV 7 además 20 g/l de agar (Difco). Se esteriliza en el autoclave (2 atmósferas, 120°C).

2. Hallazgos generales y microscopia

Todas las cepas así como el cultivo mixto mencionados en la tabla 1 crecen bajo condiciones aeróbicas a temperaturas hasta aproximadamente 37°C, óptimamente a 28° hasta 30°. Los microorganismos son gram-negativos (muestras para el ensayo de color según Gram tomadas de un cultivo de MV 7-dimetilformamida) y oxidasa-positivos (muestras para el ensayo tomadas de nutriente-agar, MV 7-DMF-agar y cultivo líquido MV 7-DMF). En los cultivos líquidos que contienen dimetilformamida se observa la tendencia de todas las cepas hacia un crecimiento en forma de coposo.

En la imagen microscópica (microscopio de luz) tienen las cepas DMF 3/3, 3/4, 3/5, 3/6, 3/11, 3/12 la forma de varillas alargadas las cepas DMF 4/4, 5/3, 5/5, 5/7, 5/8, 5/9 y 5/10 la forma de varillas cortas ó de bolas esféricas. La imagen en el microscopio electrónico se encuentra en buena concordancia con las observaciones efectuadas con el microscopio de luz. Se aprecian, ante todo, dos tipos de células:

a) varillas alargadas, en parte polarmente flageladas del tamaño 0,8 x 2,µ (cepas DMF 3/3, 3/4, 3/5, 3/6, 3/11, 3/12),

b) varillas cortas, en parte polarmente flageladas del tamaño 0,7 x 1,1µ (cepas DMF 4/4, 5/3, 5/5, 5/7, 5/8, 5/9 y 5/10). En las cepas DMF 4/4 y 5/3 se aprecian "pelos" finos y cortos en la pared de la célula.

3. Caracterización bioquímica y clasificación de los nuevos microorganismos

Para la caracterización bioquímica general y clasificación de las cepas mencionadas en la tabla 1 se emplean dos

sistemas de ensayo comerciales.

a) Ensayo "Oxi/Ferm Tube" (Roche)

Este sistema de ensayo se emplea en las varillas gram-
negativas con reacción de oxidasa positiva. El ensayo en cada
caso se realiza en paralelo dos veces cada vez con material
de inyección de la cepa correspondiente de dimetilformamida-
agar y nutriente-agar. Para la destrucción del ensayo bioquí-
mico normalizado y la realización experimental véanse las ins-
trucciones del fabricante. Los resultados de los ensayos están
resumidos en la tabla 2.

Tabla 2:

Cepas DMF ensayadas y con "Oxi/Ferm Tube" (48/28°C)

Denominación interna	Ensayo bioquímico								
	Disociación anaeróbica de dextrosa	Arginindihidrolasa	Producción de N ₂	Formación de H ₂ S	Formación de indol	Disociación de xilosa	Disociación anaeróbica de dextrosa	Ureasa	Aprocheamiento de citrato
DMF 3/3	-	-	+	-	-	+	+	-	++
DMF 3/4	-	-	+	-	-	+	+	++	++
DMF 3/5	-	-	+	-	-	+	+	++	++
DMF 3/6	-	-	+	-	-	+	++	++	++
DMF 3/11	-	-	++	-	-	+	++	++	++
DMF 3/12	-	-	+	-	-	+	++	-	++
DMF 4/4	-	-	+	+	-	++	++	-	++
DMF 5/3	++	-	+	+	-	++	+	+	++
DMF 5/5	-	-	+	+	-	++	-	-	++
DMF 5/7	-	-	+	+	-	++	-	-	++
DMF 5/8	-	-	+	+	-	++	++	++	++
DMF 5/9	-	-	+	+	-	++	++	++	++
DMF 5/10	-	-	+	+	-	+	++	-	++

(+ ambos ensayos paralelos positivos, - ambos ensayos paralelos negativos, \pm un ensayo paralelo positivo, un ensayo paralelo negativo, * en el ensayo API 20 E (tabla 4) positivo).

5

De los hallazgos se desprende que el grupo de las cepas DMF 3/3, 3/4, 3/5, 3/6, 3/11 y 3/12 (formación de H₂S claramente negativo y disociación de xilosa claramente positivo) se diferencia claramente del grupo de las cepas DMF 4/4, 5/3, 5/5, 5/7, 5/8, 5/9 y 5/10 (formación de H₂S claramente positiva y disociación de xilosa solo en un caso claramente negativa). Las diferencias bioquímicas dentro de ambos grupos son reducidas. Después de la evaluación numérica de los resultados del ensayo de la tabla 2 a base de las instrucciones dadas por el fabricante se pueden resumir las distintas cepas conforme a su correspondiente grado de correspondencia y clasificar taxonómicamente aproximadamente como sigue:

10

15

Tabla 3:

Adjudicación taxonómica según la evaluación numérica del ensayo "Oxi-Ferm Tube"

Denominación interna	Adjudicación taxonómica
DMF 3/3	Pseudomonas stutzeri
DMF 3/4 DMF 3/5 DMF 3/6 DMF 3/11 DMF 3/12 DMF 4/4	similar a Pseudomonas, Achromobacter, sp.
DMF 5/7	Pseudomonas vesicularis
DMF 5/3 DMF 5/5 DMF 5/8 DMF 5/9 DMF 5/10	ninguna adjudicación

b) Ensayo "API 20 E"

Este sistema de ensayo se emplea especialmente para la apreciación de enterobacteriaceas y en general para la determinación de bacterias gram-negativas. El ensayo bioquímico normalizado y su realización se describen en las instrucciones del fabricante. Los ensayos se realizaron igualmente en forma paralela dos veces con material de inyección de la cepa correspondiente tomada de dimetilformamida-agar y nutriente-agar.

La evaluación numérica de los resultados del ensayo API 20 E según las instrucciones dadas por el fabricante no permite adjudicaciones taxonómicas indudables, por lo que los resultados según la tabla 4 solamente se pueden utilizar para la caracterización bioquímica de las cepas correspondientes.

Las cepas DMF 3/3, 3/4, 3/5, 3/6, 3/11 y 3/12 se pueden clasificar a base de características morfológicas (varitas polarmente flageladas) y propiedades bioquímicas en el ensayo Oxi-Ferm y en el ensayo API como Pseudomonadas. Las cepas DMD 4/4, 5/3, 5/5, 5/7, 5/8, 5/9 y 5/10 tienen una forma de célula ovalada (forma de varilla muy corta hasta esférica flagelada). Debido a algunas similitudes en el comportamiento bioquímico (excepción: formación de H_2S en el ensayo Oxi-Ferm) se denominan también estas cepas en la descripción de la presente invención como Pseudomonadas, maxime cuando formas de célula ovalada también se observan en otras cepas de Pseudomonas, por ejemplo, Pseudomonas putida ó Pseudomonas ovalis.

4. Conservación de las cepas

Para la conservación de las cepas según la tabla 1 son adecuados los siguientes métodos:

- a) adsorción del material celular de la cepa correspondiente en esferas de vidrio en solución glicerina y almacenamiento a continuación a $-20^{\circ}C$,
- b) almacenamiento del material celular de la cepa correspondiente mediante agar y
- c) Lyo-ampollas. El cultivo correspondiente se separa por centrifugación de la solución nutriente y la masa celular se suspende en 1/4 hasta 1/3 partes en volumen de Skim-Milk al 15% y se liofiliza.

Tabla 6: (continuación)

Fuentes de C	Denominación interna													
	DMF 3/3	DMF 3/4	DMF 3/5	DMF 3/6	DMF 3/11	DMF 3/12	DMF 4/4	DMF 5/3	DMF 5/5	DMF 5/7	DMF 5/8	DMF 5/9	DMF 5/10	DMF/HW 1-5
Hidantoina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Creatina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Creatinina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acido barbitúrico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Colina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Betaina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dimetil-glicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sarcosina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acido glioxílico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetonitrilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Isobutiro-nitrilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+: crecimiento bueno, $\frac{1}{2}$ crecimiento moderado, - ningún crecimiento ó solo reducido)

En caso de que la solución acuosa a purificar contenga uno de los compuestos conteniendo nitrógeno mencionados en la tabla 6, por ejemplo, dimetilformamida, metilformamida, etilformamida, hidantoina, creatinina, creatina ó ácido barbitúrico, no se necesitará agregar en la mayoría de los casos ninguna fuente de nitrógeno.

Los hallazgos experimentales según la tabla 6 se determinan, después de la preparación de un cultivo por agitación, mediante inyección del correspondiente precultivo que contiene DMF en solución nutriente MV 7 conteniendo las correspondientes fuentes de C ó bien de C y N (composición como anteriormente descrita), tamponado a un pH de 7, incubación en el transcurso de 5-8 días a 28°C y 250 rpm y medición de la densidad óptica OD₆₅₀ (crecimiento moderado OD₆₅₀ < 0,15, buen crecimiento OD₆₅₀ > 0,15) y, en caso dado adición de cloruro amónico.

De las cepas mencionadas en la tabla 1 se pueden formar espontáneamente mutantes (mutantes naturales) ó se pueden preparar mutantes artificiales que, al igual que las cepas naturales, pueden degradar en solución acuosa los compuestos y sales anteriormente mencionadas, especialmente dimetilformamida, y producir masa celular. Tales mutantes se pueden producir únicamente, por ejemplo, por tratamiento con determinados derivados de guanidina, por ejemplo, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina ó con nitrito alcalino, por ejemplo, nitrito sódico, ó físicamente, por ejemplo, por radiación ultravioleta, con rayos X ó radioactividad.

Los microorganismos según la presente invención se emplean en un procedimiento para la purificación microbiológica de soluciones acuosas conteniendo dimetilformamida, formamida, metil-, etilformamida, acetamida, metanol, etanol, sacáridos,

alcanoatos inferiores, haluros de metil-, etil-, dimetil- ó trimetilamonium, fosfito dimetílico, fosfito trimetílico, hidantoína, creatina, creatinina, ácido barbitúrico, colina, betaina, sarcosina, dimetilglicina, glicina, ácido glioxílico, aminoácidos N-formílicos, aminoácidos N-acetílicos, acetonitrilo ó isobutironitrilo, ó mezclas de estos compuestos, que se caracteriza porque en una solución acuosa de éstas se cultiva bajo condiciones aeróbicas un microorganismo del genero Pseudomonas ó un genero similar a las Pseudomonas que produzca masa celular en esta solución, ó una mutante derivada de este microorganismo, que igualmente sea capaz de producir masa celular, en presencia de sales inorgánicas esenciales y, en caso dado, una fuente de nitrógeno a unos 20°C hasta unos 40°C y un valor pH de aproximadamente 4 hasta aproximadamente 7,5, y, si se desea, una masa celular obtenible se aisla.

En el cultivo ó en la fermentación degradan las cepas mencionadas en la tabla 1 las impurezas que se encuentran en la solución acuosa, por ejemplo, en un agua residual, por ejemplo, dimetilformamida, formamida, metil-, etilformamida, metano, etanol, acetato sódico, glucosa, cloruro de metil-, etil-, dimetil- ó trimetilamonium, fosfito dimetílico, fosfito trimetílico, acetonitrilo, isobutironitrilo ó las mezclas de estos compuestos ó bién las sales, y consumen oxígeno. En el procedimiento de degradación producen los microorganismos masa celular que se caracteriza, por ejemplo, por un multiplo de la fórmula de sumas aproximada $C_5H_9NO_x$ ($x = 4-5$) y un contenido de aproximadamente un 37,0 % de C, un 6,2 % de H y un 9,6 % de N (liofilizado). Como ulteriores productos de fermentación se forman dióxido de carbono así como, bajo condiciones neutras y ácidas, iones amonium. Durante la fermentación se ajustará el

valor pH de la solución a purificar, mediante adición de solución tampón, por ejemplo, solución tampón de fosfato, ó de bases acuosas, por ejemplo, solución acuosa diluida de hidróxido sódico ó potásico, a valores entre 4,0 y 7,5, preferentemente aproximadamente 6 hasta 7.

Para la purificación de soluciones acuosas que contienen dimetilformamida se emplean preferentemente las cepas DMF 3/3, 3/4, 3/5, 3/6, 3/11, 3/12, 4/4, 5/3, 5/5, 5/7, 5/8, 5/9, 5/10 y el cultivo mixto DMF/HW 1-5. Para la purificación de soluciones acuosas que contienen formamida se emplean preferentemente las cepas DMF 4/4 5/3, 5/5, 5/7, 5/8, 5/9, 5/10 y el cultivo mixto DMF/HW 1-5.

Para la degradación de sales de formiato, por ejemplo, formiato sódico, son solamente adecuadas las cepas DMF 4/4, 5/3, 5/5, 5/7, 5/8, 5/9 y 5/10, de metanol solamente las cepas 3/3, 3/4, 3/5, 3/6, 3/11, 3/12 y el cultivo mixto DMF/HW 1-5, de fosfito dimetílico y fosfito trimetílico solamente las cepas DMF 3/3, 3/4, 3/6, 3/11, 3/12 y el cultivo mixto DMF/HW 1-5.

El cultivo se realiza en presencia de sales inorgánicas esenciales. Tales sales son, por ejemplo, los haluros solubles en agua, por ejemplo, los cloruros, carbonatos, sulfatos ó fosfatos de metales alcalinos, por ejemplo, de sodio ó potasio, metales alcalino térreos, por ejemplo, calcio ó magnesio, ó metales de transición, por ejemplo, hierro, manganeso, molibdeno, cobre ó zinc.

Sales inorgánicas esenciales preferentes son, por ejemplo, las sales contenidas en la solución nutriente MV 7, por ejemplo, hidrogenofosfato disódico ó dipotásico, dihidrogenofosfato sódico ó potásico, sulfato de magnesio y de hierro y

cloruro de potasio y de calcio. En reducidas cantidades se pueden agregar además sulfato de zinc, de manganeso y de cobre, molibdato de sodio y borax.

5 Para la purificación de soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, metanol, etanol, acetato ó glucosa y por lo demás ningún compuesto que contenga nitrógeno, se agrega como fuente de nitrógeno, por ejemplo, aminoácidos, péptidos ó proteínas, ó bién sus productos de degradación, tales como peptona ó triptona, extractos de carne, harinas, por ejemplo, 10 de maiz, del trigo ó de judias, por ejemplo de la judia de soja, residuos de destilación de la obtención de alcoholes, extractos de levadura, sales amónicas, por ejemplo, cloruro amónico ó nitrato, por ejemplo, nitrato potásico ó amónico.

15 Algunas de las cepas mencionadas en la tabla 1 pueden crecer al comienzo de la fermentación solo después de agregar una fuente de nitrógeno, también cuando en la solución acuosa ya esté presente un compuesto que contenga nitrógeno a degradar. Así se agrega una fuente de nitrógeno cuando en 20 soluciones acuosas se quiere degradar dimetilformamida en presencia de las cepas DMF 5/5, 5/7, 5/8, 5/9 y 5/10 ó formamida en presencia de las cepas DMF 3/3, 3/4, 3/5, 3/6, 3/11 y 3/12.

25 El cultivo se realiza bajo condiciones aeróbicas, por ejemplo, bajo alimentación de oxígeno ó de aire, y ésto sacudiendo ó agitando en matraces agitadores ó fermentadores. Al emplear los microorganismos de la presente invención en 30 instalaciones de clarificación se puede realizar el cultivo en cámaras de clarificación abiertas ó cerradas también en presencia de otros microorganismos. El cultivo se puede efectuar en un margen de temperaturas desde unos 25° hasta unos 35°C, preferentemente a unos 27° hasta unos 28°C.

El cultivo se puede realizar por tandas, por ejemplo, mediante una ó varias adiciones de solución nutriente, ó en forma continúa, mediante adición continuada de solución nutriente.

5 Preferentemente se cultiva en varias etapas preparan-
do primeramente uno ó varios cultivos previos, por ejemplo,
en un medio nutriente líquido, por ejemplo, MV 7, que, a con-
tinuación, se inyecta en el cultivo principal propiamente di-
cho. Un cultivo previo se puede preparar, por ejemplo, trans-
10 ladando una muestra con material celular del correspondiente
microorganismo, que se guarda, por ejemplo, sobre agar de cul-
tivo inclinado, en una solución nutriente esteril, por ejemplo,
MV 7, con una fuente de carbono adecuada, por ejemplo, dimetil-
formamida, e incubando durante varios días a 28°C. Con este
15 primer cultivo previo se inyectan soluciones nutrientes fres-
cas, por ejemplo, MV 7, con la misma fuente de carbono y se
incuba de nuevo durante varios días a 28°C.

El desarrollo de la fermentación se puede seguir
analíticamente durante la fermentación mediante tomas de mues-
20 tras, por ejemplo, mediante medición del valor pH del cultivo
ó de la densidad óptica, que es una medida para el crecimiento
de la cepa en cuestión, así como gravimétricamente a base del
peso en seco de la masa celular formada.

La masa celular es igualmente objeto de la presente
25 invención. Esta se puede elaborar, por ejemplo, según uno de
los numerosos procedimientos descritos en la patente europea
O 010 243 y, por ejemplo, transformar en abonos.

La masa celular es una valiosa materia prima que
tiene una composición definida y reproducible. Fórmula de su-
30 mas aproximada: $C_5H_9NO_x$ (x = 4-5); Contenido (liofilizado):

37,0 % C, 6,2 % H y 9,6 % N.

Igualmente son objeto de la presente invención las enzimas contenidas en la masa celular ó bién el extracto de enzimas obtenible de la masa celular. Las enzimas se pueden extraer de la masa celular en forma en sí conocida, por ejemplo, como descrito en la solicitud de patente británica 2.019.390.

La masa celular obtenible según el presente procedimiento se puede emplear como proteína monocelular, por ejemplo, como aditivo a los piensos para los animales. La masa celular se puede emplear también, por ejemplo, como abono en forma de suspensión ó elaborada, por ejemplo, después de deshidratar ó pasteurizar. Igualmente se puede emplear la masa celular como producto de partida para la obtención de biogas con alto valor calorífico (composición aproximadamente un 70% de metano, un 29% de dióxido de carbono y un 1% de hidrógeno, valor calorífico aproximadamente 5500-6500 kcal/m³), por ejemplo, por fermentación anaeróbica en torres de pudrición. El residuo (fango sapropélico) del procedimiento de obtención de biogas es igualmente un abono de alta calidad que, en comparación con la masa celular original, está fuertemente enriquecido con nitrógeno.

Los ejemplos a continuación ilustran la presente invención. Las indicaciones de temperatura se realizan en grados centígrados.

Ejemplo 1 (Preparación del cultivo previo):

Una muestra del microorganismo DMF 3/6 guardado en agar de cultivo inclinado se agregan en un matraz de agitación a 20 cc de solución nutriente MV 7 de la composición indicada

más adelante conteniendo dimetilformamida en una concentración de 5 g/l, y se incuba durante 72 horas a 28° y 250 rpm. 5-7 cc de este primer cultivo previo se vierten en un segundo matraz agitador conteniendo 100 cc de solución nutriente MV 7 (sin nitrato amónico) y dimetilformamida en una concentración de 5 g/l y 5 mmoles de tampón de fosfato (pH 7) y se incuba durante 72 horas a 28° y 250 rpm.

Ejemplo 2:

Análogo al ejemplo 1 se pueden preparar cultivos previos de las cepas DMF 3/3, 3/4, 3/5, 3/6, 3/11, 3/12, 4/4, 5/3, 5/5, 5/7, 5/8, 5/9, 5/10 y del cultivo mixto DMF/HW 1-5. Para la obtención de cultivos previos de las cepas DMF 5/5, 5/7, 5/8, 5/9 y 5/10 se agregan nitrato amónico (2 g/l) como fuente de nitrógeno.

Ejemplo 3:

En un fermentador de laboratorio se reúnen solución nutriente MV 7 (sin nitrato amónico) en caso dado estabilizada por calor (esterilización 20 minutos a 120°) con una solución de dimetilformamida acuosa, en caso dado filtrada en forma estéril, de manera que resulte un volumen de trabajo aproximado de 10 litros con una concentración de aproximadamente 5 g/l de dimetilformamida.

Se agrega una muestra con aproximadamente 500 cc del segundo cultivo previo de la cepa DMF 3/6 y en el fermentador se mantienen las siguientes condiciones: valor pH de 7,0 que se mantiene constante mediante adición, en cada caso, de solución acuosa 0,1-n de NaOH ó bien 0,1-n de HCl, temperatura: 28°C, alimentación de aire 0,25 l/l min. y velocidad de agita-

ción de 400-700 rpm.

La cepa crece en esta solución que contiene dimetilformamida como única fuente de carbono y de nitrógeno. Después de unas 55 horas se ha degradado la dimetilformamida empleada.

5 La masa celular formada se presenta como mezcla de células individuales ó aglomerados de distinto tamaño que se pueden separar por segmentación ó centrifugación.

Ejemplo 4:

10 Análogo al ejemplo 3 se puede degradar dimetilformamida en solución acuosa cultivando en un fermentador de laboratorio cultivos previos ó cultivos mixtos de las cepas DMF 3/3, 3/4, 3/5, 3/6, 3/11, 3/12, 4/4, 5/3, 5/5, 5/7, 5/8, 5/8 y 5/10 ó el cultivo mixto DMF/HW 1-5. Al emplear cultivos previos de 15 las cepas DMF 5/5, 5/7, 5/8, 5/9 y 5/10 se agrega nitrato amónico (2 g/l) como fuente de nitrógeno.

Ejemplo 5:

20 En un fermentador de laboratorio se reúne solución nutriente MV 7 (sin nitrato amónico) en caso dado esterilizada térmicamente (esterilización 20 minutos a 120°) con una solución de aguas residuales conteniendo dimetilformamida, en caso 25 dado filtrada en forma esteril (composición: aproximadamente 6,0 % de dimetilformamida, 7 % de metanol, 1,0 % de sulfato sódico, 5,4 % de dimetilfosfato sódico así como 3,6 % de componentes orgánicos y un 77 % de agua) de manera que resulte un volumen de trabajo aproximado de 8 litros con una concentración de aproximadamente 5 g/l de dimetilformamida. Se agrega una muestra con aproximadamente 500 cc del segundo cultivo previo de la cepa DMF 3/6 y en el fermentador se mantienen las condi-

ciones indicadas en el ejemplo 3. La degradación de la dimetilformamida y del metanol se realiza en el transcurso de aproximadamente 100 horas.

Ejemplo 6:

5 Análogo al ejemplo 5 se puede degradar dimetilformamida en soluciones de aguas residuales, en caso dado filtradas en forma esteril, cultivando en un fermentador de laboratorio cultivos previos ó cultivos mixtos de las cepas DMF 3/3, 3/4, 3/5, 3/6, 3/11, 3/12, 4/4, 5/3, 5/5, 5/7, 5/8, 5/9 y 5/10 ó el 10 cultivo mixto DMF/HW 1-5. Al emplear cultivos previos de las cepas DMF 5/5, 5/7, 5/8, 5/9 y 5/10 se agregan nitrato amónico (2 g/l) como fuente de nitrógeno.

15 Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle, en cuanto no alteren su principio fundamental.

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para la purificación microbiológica de soluciones acuosas que contienen dimetilformamida, formamida, metil- ó etilformamida, acetamida, metanol, etanol, 5
sacáridos, alcanosatos inferiores, haluros de metil-, etil-, dimetil- ó trimetilamonium, dimetilfosfito, trimetilfosfito, hidantoína, creatina, creatinina, ácido barbitúrico, colina, betaina, sarcosina, dimetilglicina, glicina, ácido glioxílico, 10
ácidos N-formilamínicos, ácidos N-acetilamínicos, acetonitrilo ó isobutironitrilo ó las mezclas de estos compuestos, caracterizado porque en una solución acuosa de éstas se cultiva un microorganismo del genero Pseudomonas ó de un genero similar a las Pseudomonas que produzca masa celular en esta solución, ó una mutante derivada de este microorganismo, que asimismo, 15
sea capaz de producir masa celular, en presencia de sales inorgánicas esenciales y, en caso dado, de una fuente de nitrógeno, a unos 20°C hasta unos 40°C y un valor pH de aproximadamente 4 hasta aproximadamente 7,5, bajo condiciones aeróbicas y, si se desea, la masa de células obtenibles se aísla.

20 2.- Procedimiento según la reivindicación 1 para la purificación microbiológica de soluciones acuosas que contienen dimetilformamida, formamida, metanol, etanol, formiato ó acetato de sodio ó de potasio, cloruro de metil-, etil-, dimetil- ó trimetil-amonium, dimetilfosfito, trimetilfosfito, acetonitrilo, isobutironitrilo ó mezclas de estos compuestos, 25
caracterizado porque en una solución acuosa de éstas se cultiva un microorganismo del genero Pseudomonas ó de un genero similar a las Pseudomonas.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1 para la purificación microbiológica de soluciones acuosas conteniendo dimetilformamida, caracterizado porque en una solución acuosa se cultiva un microorganismo del genero Pseudomonas ó un genero similar a Pseudomonas del grupo de las siguientes cepas:
5 DMF 3/3 (NRRL-B-15358), DMF 3/4 (NRRL-B-15359), DMF 3/5 (NRRL-B-15360) DMF 3/6 (NRRL-B-15361), DMF 3/11 (NRRL-B-15362), DMF 3/12 (NRRL-B-15363), DMF 4/4 (NRRL-B-15364), DMF 5/3 (NRRL-B-15365), DMF 5/5 (NRRL-B-15366), DMF 5/7 (NRRL-B-15367),
10 DMF 5/8 (NRRL-B-15368), DMF 5/9 (NRRL-B-15369), y 5/10 (NRRL-B-15370), ó el cultivo mixto DMF/HW1-5(NRRL-B-15371).

4.- Procedimiento según la reivindicaciones 1-3, caracterizado porque el cultivo se realiza a 28°C.

5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque el cultivo se realiza en forma continua.
15

6.- Procedimiento para la purificación microbiológica de soluciones acuosas, tal y como queda sustancialmente descrito, en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 26 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

27 FEB. 1985

CIBA-GEIGY/AG.

J. M. GÓMEZ-ACEDO Y POMBO
P. P. Firmado: PILAR DOMÍNGUEZ M.