

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 968 207**

51 Int. Cl.:

C02F 3/34 (2013.01)

C02F 101/32 (2006.01)

C02F 101/34 (2006.01)

C02F 101/38 (2006.01)

C02F 103/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2018 PCT/EP2018/084479**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2019 WO19121201**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2018 E 18815708 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2023 EP 3728139**

54 Título: **Biodegradación de contaminantes orgánicos por una arquea halofílica**

30 Prioridad:

19.12.2017 EP 17208358

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

08.05.2024

73 Titular/es:

COVESTRO DEUTSCHLAND AG (100.0%)

Kaiser-Wilhelm-Allee 60

51373 Leverkusen, DE

72 Inventor/es:

HECKROTH, HEIKE;

HERWIG, CHRISTOPH;

KAMRAVAMANESH, DONYA y

MAHLER, NICOLE

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 968 207 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Biodegradación de contaminantes orgánicos por una arquea halofílica

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para reducir el contenido de al menos un contaminante seleccionado del grupo que consiste en nitrobenzeno, formiato, fenol, 4,4'-metilendianilina (MDA) y anilina en
aguas residuales hipersalinas, en las que dichas aguas residuales se han derivado de la producción de
diarilcarbonato, la producción de policarbonatos o la producción de diaminas y poliamidas de la serie del
difenilmetano y en la que dichas aguas residuales hipersalinas comprenden NaCl en una concentración de al
menos 6 % (p/v) hasta 25 % (p/v) basada en el volumen total de las aguas residuales hipersalinas, comprendiendo
10 dicho procedimiento las etapas de (a) proporcionar una composición A que comprenda aguas residuales
hipersalinas y dicho al menos un contaminante;

(b) poner en contacto la composición A con células de *Haloferax mediterranei*, generando así una composición B
que comprende dicha composición A y células de *Haloferax mediterranei*; e (c) incubar la composición B,
reduciendo así el contenido de dicho al menos un contaminante.

15 La presente invención se refiere además a un procedimiento para la producción de cloro e hidróxido de sodio. La
presente invención abarca además una composición que comprende aguas residuales hipersalinas, dicho al
menos un contaminante y células de *Haloferax mediterranei*.

Los procedimientos industriales generan millones de litros de aguas residuales altamente salinas. Se calcula que
el 5 % del total de los efluentes mundiales son altamente salinos.

20 Por ejemplo, la producción de diaminas y poliaminas de la serie del difenilmetano, que son productos intermedios
importantes para la producción de poliuretano, va acompañada de la generación de grandes cantidades de aguas
residuales hipersalinas (véase el documento US2009240076). Las di- y poliaminas de la serie del difenilmetano
suelen producirse haciendo reaccionar anilina y formaldehído en presencia de catalizadores ácidos como el ácido
clorhídrico. Tras producir las diaminas y poliaminas de la serie del difenilmetano, el catalizador ácido se neutraliza
25 agregando una base, normalmente hidróxido sódico acuoso. En general, la adición del agente neutralizante se
lleva a cabo de forma que la mezcla de neutralización resultante pueda separarse en una fase orgánica que
contenga las poliaminas de la serie del difenilmetano y el exceso de anilina y una fase acuosa que contenga cloruro
de sodio junto con constituyentes orgánicos residuales (es decir, aguas residuales hipersalinas). En el pasado, las
aguas residuales hipersalinas se eliminaban con frecuencia después de eliminar los componentes orgánicos
30 mediante procedimientos físicos y/o químicos, por ejemplo, adsorción, ozonización y tratamiento
electroquímico véase el documento US2009240076.

Sin embargo, los procedimientos físicos y/o químicos que se utilizan para tratar las aguas residuales que contienen
compuestos orgánicos, a menudo no son capaces de reducir el contenido total de carbono orgánico en las
corrientes residuales saladas hasta el nivel máximo requerido. Las aguas residuales (tales como las procedentes
de la producción de di- y poliaminas de la serie del difenilmetano) contienen a menudo contaminantes orgánicos
35 tales como el formiato, el fenol, la anilina, el nitrobenzeno y la 4,4'-metilendianilina (MDA) y se liberan al medio
ambiente tras una dilución considerable con agua dulce o se tratan mediante procedimientos fisicoquímicos. Por
tanto, se necesitan opciones alternativas de tratamiento para las aguas residuales hipersalinas.

40 Los sistemas alternativos para el tratamiento de la materia orgánica mediante tratamientos biológicos aeróbicos y
anaeróbicos constituyen actualmente un importante foco de investigación. Los microorganismos no extremofílicos
convencionales no son capaces de llevar a cabo la eliminación de contaminantes orgánicos a altas concentraciones
de sal. La capacidad de las bacterias halofílicas para degradar o transformar diferentes contaminantes orgánicos
en presencia de altas concentraciones de sal cuando el estrés salino se superpone al estrés por contaminación es
de gran importancia. Por tanto, son muy necesarios microorganismos capaces de crecer a altas concentraciones
de sal y de degradar o transformar distintos contaminantes orgánicos en aguas residuales hipersalinas.

45 Los contaminantes orgánicos típicos de las aguas residuales hipersalinas son el formiato, el fenol, la anilina, el
nitrobenzeno y la 4,4'-metilendianilina (MDA). Estos productos químicos intermedios se utilizan a menudo en la
fabricación de herbicidas, reveladores, perfumes, medicamentos, caucho y tintes.

Debido a su uso extendido en la industria, se están liberando cantidades crecientes de estos compuestos en el
suelo y en las masas de agua, lo que supone una amenaza medioambiental y un riesgo para la salud de los
50 organismos vivos.

Además, las soluciones hipersalinas son un material importante para el procedimiento cloroalcalino, que es un
procedimiento industrial para la electrólisis del cloruro de sodio (NaCl). Es la tecnología utilizada para producir
cloro e hidróxido de sodio. Sin embargo, se necesitan soluciones hipersalinas muy puras. Por lo tanto, es difícil
utilizar aguas residuales hipersalinas recicladas para el procedimiento cloroalcalino. Por ejemplo, las aguas
55 residuales hipersalinas procedentes de la producción de metilendianilina contienen contaminantes orgánicos tales
como formiato, fenol, anilina, nitrobenzeno y 4,4'-metilendianilina (MDA), que deberán eliminarse antes de someter

las aguas residuales al procedimiento cloroalcalino. Por ejemplo, el formiato, que debe eliminarse, ya que de lo contrario el cloro se contaminará con CO₂.

5 Los estudios anteriores sobre biodegradación de compuestos orgánicos tales como el formiato o la anilina se centraban en la degradación o transformación de compuestos individuales en condiciones moderadas. Sin embargo, actualmente se desconocen los microorganismos que son capaces de degradar simultáneamente una variedad de compuestos orgánicos tales como el formiato, el fenol, la anilina, el MDA y el nitrobenzeno en presencia de una elevada concentración de sal, por ejemplo hasta 2000 mg/l de NaCl.

10 Por ejemplo, se ha informado previamente que la biodegradación de anilina y/o formiato es degradada por varias especies bacterianas de *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Frateuria*, *Moraxella*, *Delftia*, *Nocardia* y *Dietzia* en condiciones moderadas. Sin embargo, las corrientes residuales que contienen anilina y/o formiato y, potencialmente, otros contaminantes orgánicos tales como nitrobenzeno, fenol y/o MDA presentan con frecuencia una salinidad elevada y el tratamiento de corrientes residuales hipersalinas representa un reto, ya que la elevada concentración de sal altera el metabolismo de las bacterias presentes en los sistemas de tratamiento biológico normales. También el uso de bacterias normales para corrientes residuales hipersalinas requiere diluciones previas para reducir la salinidad con agua dulce, si es que se dispone de ella.

15 El documento WO 2013/124375 divulga la reducción del carbono orgánico total por determinados microorganismos halófilicos y/o haloalcalifílicos.

20 Woolard and Irvine (1995) divulgan el tratamiento de aguas residuales hipersalinas en el reactor discontinuo de secuenciación (Woolard and Irvine. Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor. Water Research 29.4 (1995): 1159, 1168).

Rodríguez-Valeria et al., 1983 informaron de la identificación de *Halobacterium mediterranei*, una nueva especie de halófilico extremo que utiliza carbohidratos. Se demostró que *Halobacterium mediterranei* es capaz de utilizar muchos compuestos diferentes como únicas fuentes de carbono y energía y no produce H₂S.

25 Campo et al. (2011) se ocupa de un lodo activado procedente de un suelo contaminado con compuestos aromáticos. Se observó biodegradación aeróbica de aminas tales como anilina y MDA hasta 5 mg/l de anilina (Campo, P, et al. Biodegradación aeróbica de aminas en aguas residuales salinas industriales. Chemosphere 85.7 (2011): 1199, 1203).

30 Antón et al. (1988) informaron de la producción de un polisacárido extracelular por *Haloferax mediterranei*. Los autores demostraron que *Haloferax mediterranei* es capaz de producir una sustancia polimérica exocelular, en particular un heteropolisacárido que contiene manosa como componente principal, que confiere a las colonias un carácter mucoso típico. La sustancia se produjo bajo varias condiciones y sustratos ensayados, aunque los mayores rendimientos se obtuvieron con azúcares, en particular glucosa, como fuente de carbono y energía (Antón, J et al. Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. Applied and Environmental Microbiology 54.10 (1988): 2381, 2386).

35 Oren (2000) se ocupa de las bacterias halófilicas. El autor se refirió al uso potencial de las especies de *Haloferax* para la producción de poli-beta hidroxialcanoato o polisacáridos extracelulares. En particular, se informó de que el beta-hidroxialcanoato, como fuente de material plástico biológicamente degradable, puede obtenerse en un alto rendimiento a partir del Archaeon halófilico *Haloferax mediterranei*. Además, *Haloferax mediterranei* puede acumular tanto beta-hidroxialcanoato como *Ralstonia*, y puede utilizar el almidón como fuente barata de carbono y energía (Oren, A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications "Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 28.1 (2002): 56, 63).

40 Oren et al. (2014) informaron además de que *Haloferax mediterranei* es metabólicamente muy versátil y tiene una amplia tolerancia a la sal. Según los autores, *Haloferax mediterranei* es una arquea que crece más rápido que cualquier otra, halófila extrema comparable, tiene una amplia ventana de tolerancia a la sal, puede crecer tanto en sustratos simples como complejos y degradar sustancias poliméricas, tiene diferentes modos de crecimiento anaeróbico, puede acumular polímeros de almacenamiento, produce vesículas de gas y excreta halocinas capaces de matar a otras Archaea (Oren, A et al. Microbial weeds in hypersaline habitats: the enigma of the weed-like *Haloferax mediterranei*. FEMS microbiology letters 359.2 (2014): 134, 142).

50 Rosa María Martínez Espinoza et al. (2007) informaron de la eliminación de nitrógeno inorgánico por células de *Haloferax mediterranei* (véase Rosa María Martínez Espinoza et al., Biocatalysis and Biotransformation, vol. 25, no. 2-4, 1 January 2007, pp. 295-300).

55 A pesar de los numerosos informes relativos a la degradación microbiana de compuestos aromáticos, la degradación de contaminantes orgánicos a altas concentraciones de sal sigue siendo limitada. Por lo tanto, son de gran importancia los microorganismos que degradan o transforman los contaminantes orgánicos en presencia de altas concentraciones de sal cuando el estrés salino se superpone al estrés por contaminación. En particular, son muy necesarios medios y procedimientos para reducir en las aguas residuales hipersalinas el contenido de nitrobenzeno, formiato, fenol, 4,4'-metilendianilina (MDA) y/o anilina.

5 La cepa arquea *Haloferax mediterranei* DSM.1411 es conocida por su versatilidad metabólica, probablemente utilizando una amplia gama de fuentes de carbono. Se ha informado de que *Haloferax mediterranei* DSM.1411 puede utilizar una amplia gama de azúcares, ácidos orgánicos y glicerol, así como algunos aminoácidos como sustratos que facilitan el crecimiento de la biomasa cuando están presentes como única fuente de carbono. La cepa también se ha utilizado para eliminar nitratos y nitritos en procedimientos de biorremediación del agua. Sin embargo, no existe ningún informe sobre la capacidad de esta cepa para crecer en aguas residuales hipersalinas, ni sobre la degradación de los sustratos formiato, fenol, anilina, nitrobenzeno y/o 4,4'-metilendianilina (MDA) en condiciones de alta salinidad.

10 El problema técnico subyacente a la presente invención puede verse como la provisión de procedimientos para cumplir con las necesidades antes mencionadas. El problema técnico se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y a continuación.

15 Ventajosamente, se ha encontrado en los estudios de la presente invención que *Haloferax mediterranei* DSM.1411 degrada eficientemente diferentes contaminantes bajo condiciones de alta salinidad. En particular, se ha demostrado que contaminantes tales como el formiato, el fenol, el nitrobenzeno, la anilina y la 4,4'-metilendianilina (MDA) pueden ser degradados por *Haloferax mediterranei* DSM.1411.

20 Los resultados de las presentes invenciones son sorprendentes. Por ejemplo, hasta la fecha no existen informes sobre la degradación biológica del nitrobenzeno en salinidad. Por lo tanto, es la primera vez que se demuestra que este componente es biológicamente degradable en presencia de sal. Además, se demostró que las células de *Haloferax mediterranei* DSM.1411 pueden degradar simultáneamente todos los compuestos mencionados de su medio hipersalino. Estos resultados de la presente invención pueden aplicarse a corrientes residuales naturales e industriales.

25 De acuerdo con lo anterior, la presente invención se refiere a para reducir el contenido de al menos un contaminante seleccionado del grupo que consiste en nitrobenzeno, formiato, fenol, metilendianilina (MDA), en particular 4,4'-metilendianilina (MDA), y anilina en aguas residuales, por lo que dichas aguas residuales se han derivado de la producción de diarilcarbonato, la producción de policarbonatos o la producción de diaminas y poliamidas de la serie del difenilmetano y en la que dicha agua residual hipersalina comprende NaCl en una concentración de al menos 6 % (p/v) hasta 25 % (p/v) basada en el volumen total del agua residual hipersalina, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 30 (a) proporcionar una composición A que comprenda aguas residuales y dicho al menos un contaminante; (b) poner en contacto la composición A con células de *Haloferax mediterranei*, generando así una composición B que comprenda dicha composición A y células de *Haloferax mediterranei*; e (c) incubar la composición B, reduciendo así el contenido de dicho al menos un contaminante.

35 Según la etapa (a) del procedimiento de la presente invención, se proporcionará una composición A que comprende aguas residuales. Dicha composición A es una solución que comprende dichas aguas residuales y dicho al menos un contaminante seleccionado del grupo formado por nitrobenzeno, formiato, fenol, 4,4'-metilendianilina (MDA) y anilina. Las aguas residuales serán aguas residuales hipersalinas, es decir, aguas residuales con una alta concentración de NaCl, tal como se define a continuación. En particular, las aguas residuales serán aguas residuales industriales que contengan al menos un contaminante, como salmueras industriales.

40 Según la etapa (b) del procedimiento de la presente invención, la composición A se pone en contacto con células de *Haloferax mediterranei*. De este modo, se genera una composición B que comprende la composición A (y por tanto las aguas residuales y dicho al menos un contaminante) y las células de *Haloferax mediterranei* (es decir, células de esta cepa). En una realización del procedimiento de la presente invención, la composición A se pone en contacto con las células mezclando la composición A con las células.

45 La cepa *Haloferax mediterranei* es una cepa halofílica y por tanto requiere una alta concentración de NaCl para crecer. De acuerdo con lo anterior, la composición B comprenderá NaCl en una concentración elevada. Esto permite tratar las aguas residuales hipersalinas (es decir, reducir el contaminante al que se hace referencia en la presente memoria) sin diluir las aguas residuales.

50 De acuerdo con lo anterior, la composición B, y por tanto las aguas residuales hipersalinas, comprenderán NaCl en una concentración elevada. Una concentración elevada de NaCl, tal como se menciona en la presente memoria, es una concentración de al menos el 6 % (p/v), basada en el volumen total de las aguas residuales o de la composición. Las aguas residuales, la composición A o B podrían comprender NaCl en una concentración de hasta la concentración de saturación de NaCl, ya que se ha demostrado en los estudios en los que se basa la presente invención que, por ejemplo, el contenido de anilina se reducía incluso a una concentración de NaCl del 20,0 % (p/v). Por tanto, el límite superior de la concentración es, en principio, la concentración de saturación de NaCl. Por tanto, una concentración elevada de NaCl es una concentración de al menos el 6 % (p/v) hasta el 25 % (p/v) basada en el volumen total de las aguas residuales o de la composición. De acuerdo con lo anterior, el agua residual no es agua salobre ni agua de mar, ya que ambas tienen una menor concentración de NaCl.

Preferentemente, una concentración elevada de NaCl es una concentración de NaCl de al menos 7 % (p/v), más preferentemente de al menos 10 % (p/v), aún más preferentemente de al menos 12 % (p/v), y más preferentemente de al menos 15 % (p/v) basada en el volumen total de la composición o de las aguas residuales (por ejemplo, de la composición B).

5 Aunque el límite superior para una concentración elevada de NaCl es, en principio, la concentración de saturación de NaCl, se prevé que el agua residual, la composición A o B comprenda NaCl en una concentración inferior a la concentración de saturación. Preferentemente, la concentración de NaCl en las aguas residuales, la composición A o la composición B es inferior al 23 % (p/v), más preferentemente inferior al 22 % (p/v), incluso más preferentemente inferior al 20 % (p/v) en base al volumen total de la composición o de las aguas residuales.

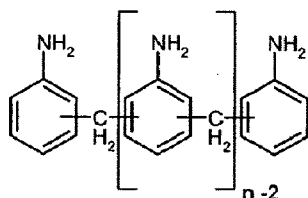
10 En los estudios en los que se basa la presente invención se demostró que el tratamiento óptimo se lograba a una concentración de NaCl de aproximadamente el 17 % (p/v). De acuerdo con lo anterior, las aguas residuales, la composición A, o B, comprenden preferentemente NaCl en una concentración del 12 % al 22 % (p/v), más preferentemente en una concentración del 12 % al 20 % (p/v), aún más preferentemente en una concentración del 15 % al 20 % (p/v), y más preferentemente en una concentración del 16 % al 18 % (p/v), de nuevo basándose en el volumen total de la composición o de las aguas residuales.

15 La concentración óptima de NaCl puede depender del contaminante. Por ejemplo, con respecto a la anilina, el agua residual, la composición A, o B, comprende preferentemente NaCl en una concentración del 12 % hasta el 25 % (p/v) basado en el volumen total de la composición o del agua residual. Además, la concentración óptima de NaCl puede depender de la concentración del contaminante en las aguas residuales/la composición. Por ejemplo, en los estudios en los que se basa la presente invención se observó que concentraciones más elevadas de NaCl permiten una mejor reducción de la anilina, si la concentración de anilina es elevada (por ejemplo, superior a 20 mg/l).

20 Se pueden encontrar altas concentraciones de NaCl en diversas aguas residuales industriales. En una realización preferida, las aguas residuales hipersalinas se han aislado de la producción de metilendiamina (como preproducto de los poliuretanos). De acuerdo con lo anterior, la etapa a) del procedimiento de la presente invención puede comprender el aislamiento de aguas residuales hipersalinas procedentes de la producción de metilendiamina.

25 En particular, el agua residual es derivada, es decir, ha sido aislada de la producción de diaminas y poliaminas de la serie del difenilmetano. El término "diaminas y poliaminas de la serie del difenilmetano, se refiere a las aminas y mezclas de aminas del tipo siguiente:

30



en la que n es un número entero de 2 o mayor que 2.

35 Como se indica en la presente memoria, las diaminas y poliaminas de la serie del difenilmetano son preproductos de los poliuretanos y pueden producirse por procedimientos bien conocidos. Procedimientos preferidos de la producción de dichas diaminas y poliaminas de la serie de difenilmetano son por ejemplo, divulgados en el documento EP 1 813 598 A1.

40 En una realización, la producción de di- y poliaminas de la serie difenilmetano se lleva a cabo haciendo reaccionar anilina y formaldehído en presencia de un catalizador ácido. En una realización, se utiliza ácido clorhídrico como catalizador ácido. Tras producir las diaminas y poliaminas de la serie del difenilmetano, el catalizador ácido se neutraliza agregando hidróxido de sodio. Preferentemente, la adición del agente neutralizante se lleva a cabo de manera que la mezcla de neutralización resultante pueda separarse en una fase orgánica que contiene las diaminas y, en particular, las poliaminas de la serie difenilmetano y el exceso de anilina, y una fase acuosa. La fase acuosa es el agua residual hipersalina que contiene al menos un contaminante tal como se establece en la presente memoria.

45 En otra realización de la presente invención, el agua residual hipersalina ha sido aislada, es decir, se deriva de la producción de carbonato de diarilo. La producción de carbonatos de diarilo, y más concretamente de carbonatos de difenilo, tiene lugar generalmente mediante un procedimiento continuo, por producción o introducción de fosgeno y posterior reacción de monofenoles y fosgeno en un disolvente inerte en presencia de álcali y un catalizador de nitrógeno en la interfase de reacción. La producción de carbonatos de diarilo es bien conocida en la técnica. Los procedimientos de producción preferidos se describen en el documento US200805836.

50

En otra realización de la presente invención, el agua residual hipersalina ha sido aislada, es decir, se deriva de la producción de policarbonatos.

El agua residual hipersalina puede haber sido sometida a una o más etapas de purificación antes de llevar a cabo la etapa a). La una o más etapas de purificación permitirán reducir la cantidad de residuos de disolvente en las aguas residuales. Esto puede conseguirse, por ejemplo, eliminando la solución con vapor y/o tratándola con adsorbentes, en particular con carbón activo. Además, las aguas residuales podrían haberse filtrado. Además, las aguas residuales hipersalinas pueden haber sido depuradas mediante tratamiento de aguas residuales con ozono (ozonización). La ozonización (también denominada ozonización) es una técnica química de tratamiento del agua basada en la infusión de ozono en el agua (véase, por ejemplo, el documento WO2000078682).

5 Además, se prevé que la concentración de NaCl de las aguas residuales se concentre antes de llevar a cabo la etapa a) del procedimiento de la presente invención, por ejemplo, mediante un procedimiento de destilación por membrana, destilación osmótica u ósmosis inversa. Además, los métodos preferidos para concentrar una composición que comprende NaCl se describen en otra parte de la presente memoria.

15 Ventajosamente, se ha demostrado en el contexto de la presente invención que las células de las cepas *Haloferax mediterranei* son capaces de reducir el contenido de al menos un contaminante como se menciona en la presente memoria (de al menos un contaminante seleccionado del grupo que consiste en nitrobenceno, formiato, fenol, metilendianilina, en particular 4,4'-metilendianilina (nombre IUPAC: Bis(4-aminofenil)metano) y anilina) en agua salada hipersalina. Por tanto, se prevé que las aguas residuales hipersalinas, la composición A y la composición B comprendan dicho al menos un contaminante.

20 De acuerdo con la presente invención, se reducirá el contenido de al menos un contaminante seleccionado del grupo formado por nitrobenceno, formiato, fenol, metilendianilina, en particular 4,4'-metilendianilina (MDA) y anilina, es decir, se reducirá el contenido de dicho al menos contaminante en las aguas residuales hipersalinas y, por tanto, en la composición A y B.

25 El término "al menos un contaminante", como se utiliza en la presente memoria, significa uno o más de uno. Por tanto, se puede reducir el contenido de uno, dos, tres, cuatro o cinco contaminantes. En una realización preferida, se reduce el contenido de un contaminante. En una realización preferida, los contenidos de cuatro contaminantes: formiato, fenol, metilendianilina, en particular 4,4'-metilendianilina (MDA), y anilina como se refiere de acuerdo con el procedimiento de la presente invención son reducidos por el procedimiento de la presente invención. En otra realización preferida, el contenido de los cinco contaminantes según lo referido de acuerdo con el procedimiento de la actual invención es reducido por el procedimiento de la actual invención. En particular, dichos contenidos se reducen simultáneamente.

30 Por tanto, las aguas residuales hipersalinas, composición A y B comprenderán dicho al menos un contaminante, preferentemente al menos 0,5 mg/l de formiato, 0,5 mg/l de fenol, 0,5 mg/l de nitrobenceno, 0,5 mg/l de 4,4'-metilendianilina (MDA) y/o 0,5 mg/l de anilina, más preferentemente 3 mg/l de formiato, 3 mg/l de fenol, 3 mg/l de nitrobenceno, 3 mg/l de 4,4'-metilendianilina (MDA) y/o 3 mg/l de anilina.

Para el contaminante anilina se aplica lo siguiente:

35 Preferentemente, el agua residual hipersalina, la composición A y/o la composición B comprenden anilina en una cantidad de al menos 0,5 mg/l, más preferentemente en una cantidad de al menos 2 mg/l, y más preferentemente en una cantidad de al menos 5 mg/l. Además, se prevé que la composición A (o B) comprenda anilina en una cantidad de al menos 10 mg/l, en particular en una cantidad de al menos 20 mg/l.

También preferentemente, las aguas residuales hipersalinas, la composición A y/o la composición B comprenden anilina en una cantidad de 1 a 100 mg/l, más preferentemente, en una cantidad de 2 a 50 mg/l, y más preferentemente en una cantidad de 2 a 20 mg/l. Además, se prevé que comprenda anilina en una cantidad de 2 a 12 mg/l.

40 Para el contaminante formiato se aplica lo siguiente:

Preferentemente, el agua residual hipersalina, la composición A y/o la composición B comprenden formiato en una cantidad de al menos 10 mg/l, más preferentemente en una cantidad de al menos 30 mg/l, y más preferentemente en una cantidad de al menos 100 mg/l.

45 También preferentemente, el agua residual hipersalina, la composición A y/o la composición B comprenden formiato en una cantidad de 10 mg/l a 10 g/l, más preferentemente, en una cantidad de 30 mg/l a 1 g/l, y más preferentemente en una cantidad de 50 a 500 mg/l.

Lo siguiente se aplica al contaminante nitrobenceno:

Preferentemente, el agua residual hipersalina, la composición A y/o la composición B comprenden nitrobenceno en una cantidad de al menos 1 mg/l, más preferentemente en una cantidad de al menos 5 mg/l, y más preferentemente en una cantidad de al menos 10 mg/l.

5 También preferentemente, las aguas residuales hipersalinas, la composición A y/o la composición B comprenden nitrobenceno en una cantidad de 1 a 100 mg/l, más preferentemente, en una cantidad de 2 a 50 mg/l, y más preferentemente en una cantidad de 2 a 20 mg/l.

Lo siguiente se aplica al contaminante 4,4'-metilendianilina:

10 Preferentemente, el agua residual hipersalina, la composición A y/o la composición B comprenden 4,4'-metilendianilina en una cantidad de al menos 0,25 mg/l, más preferentemente en una cantidad de al menos 0,5 mg/l, y más preferentemente en una cantidad de al menos 1 mg/l. Además, se prevé que comprenda 4,4'-metilendianilina en una cantidad de al menos 3 mg/l.

15 También preferentemente, el agua residual hipersalina, la composición A y/o la composición B comprenden 4,4'-metilendianilina en una cantidad de 0,25 a 30 mg/l, más preferentemente, en una cantidad de 1 a 10 mg/l, y más preferentemente en una cantidad de 2 a 7 mg/l. Además, se prevé que comprenda 4,4'-metilendianilina en una cantidad de 0,5 a 20 mg/l.

Lo siguiente se aplica al contaminante fenol:

20 Preferentemente, las aguas residuales hipersalinas, la composición A y/o la composición B comprenden fenol en una cantidad de al menos 1 mg/l, más preferentemente en una cantidad de al menos 5 mg/l, y más preferentemente en una cantidad de al menos 10 mg/l. Además, se prevé que comprenda fenol en una cantidad de al menos 20 mg/l.

También preferentemente, las aguas residuales hipersalinas, la composición A y/o la composición B comprenden fenol en una cantidad de 1 a 500 mg/l, más preferentemente, en una cantidad de 5 a 100 mg/l, y más preferentemente en una cantidad de 5 a 50 mg/l. Además, se prevé que comprenda fenol en una cantidad de 5 a 20 mg/l.

25 Preferentemente, la composición A tiene un contenido de carbono orgánico total ("TOC") de más de 50 mg/l, más preferentemente de más de 60 mg/l, aún más preferentemente de más de 60 mg/l, y lo más preferentemente de más de 65 mg/l. Además, se prevé que la composición A tenga un contenido de TOC (carbono orgánico total) superior a 70 mg/l, en particular superior a 70 mg/l. Preferentemente, la composición A puede tener un contenido de carbono orgánico total ("TOC") de hasta 1000 mg/l y más.

30 De acuerdo con la presente invención, se reducirá el contenido de al menos un contaminante de las aguas residuales hipersalinas y, por tanto, el contenido de dicho al menos un contaminante de la composición A y la composición B, respectivamente (los términos "contenido", "cantidad" y "concentración" se utilizan indistintamente en la presente memoria). Dicho al menos un contaminante se selecciona del grupo formado por nitrobenceno, formiato, fenol, metilendianilina, en particular 4,4'-metilendianilina (MDA), y anilina. El término "reducir", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una reducción significativa del contenido de contaminante (es decir, del al menos un contaminante) de las aguas residuales hipersalinas. Preferentemente, el término indica una reducción de dicho contaminante de al menos el 30%, al menos el 50%, al menos el 70% o en particular de al menos el 90% o de al menos el 95% del contenido total de dicho contaminante presente en el agua residual hipersalina, la composición A y la composición B, respectivamente. De acuerdo con lo anterior, el contenido total de un contaminante, tal como se menciona en la presente memoria, en la composición B (o composición A) se reducirá al menos en un 30 %, al menos en un 50 %, al menos en un 70 % o, en particular, al menos en un 90 % o al menos en un 95 %.

35 La composición C resultante, es decir, el agua residual tratada, comprende preferentemente anilina en una cantidad inferior a 5 mg/l. Más preferentemente, comprende anilina en una cantidad inferior a 1 mg/l y más preferentemente inferior a 0,2 mg/l.

También preferentemente, el agua residual tratada comprende formiato en una cantidad inferior a 15 mg/l, más preferentemente inferior a 10 mg/l y más preferentemente inferior a 5 mg/l después de haber llevado a cabo el procedimiento de la presente invención.

40 También es preferible que las aguas residuales tratadas contengan nitrobenceno en una cantidad inferior a 15 mg/l, más preferentemente inferior a 10 mg/l y más preferentemente inferior a 5 mg/l una vez realizado el procedimiento de la presente invención.

También es preferible que las aguas residuales tratadas contengan 4,4'-metilendianilina en una cantidad inferior a 15 mg/l, más preferentemente inferior a 10 mg/l y más preferentemente inferior a 5 mg/l tras la realización del procedimiento de la presente invención.

También es preferible que las aguas residuales tratadas contengan fenol en una cantidad inferior a 15 mg/l, más preferentemente inferior a 10 mg/l y más preferentemente inferior a 5 mg/l una vez realizado el procedimiento de la presente invención.

Además, se prevé que dicho al menos un contaminante se elimine por completo.

- 5 Al llevar a cabo el procedimiento de la presente invención, se reducirá también el contenido de TOC (es decir, además del contenido del al menos un contaminante). Preferentemente, el agua residual tratada tiene un contenido en TOC inferior a 40 mg/l, más preferentemente inferior a 30 mg/l y más preferentemente inferior a 20 mg/l (en particular, tras la separación de las células de la composición B, tal como se describe en otro lugar de la presente memoria).
- 10 Preferentemente, el contenido de al menos un contaminante, tal como se menciona en la presente memoria, se reduce por la presencia y, por tanto, por la actividad de las células de *Haloferax mediterranei*, tal como se menciona en la presente memoria. Preferentemente, dicho contenido se reduce mediante la degradación del contaminante por dichas células. Una reducción de la concentración del al menos un contaminante por dilución de las aguas residuales, o de la composición A o B no se considera una reducción del contenido de dicho al menos un contaminante.
- 15 De acuerdo con lo anterior, el término "reducir el contenido de al menos un contaminante..." no abarca la reducción de la concentración de dicho al menos un contaminante por efectos de dilución (por ejemplo, diluyendo las aguas residuales hipersalinas o la composición A o B).

La célula que se va a utilizar de acuerdo con la presente invención son células de *Haloferax mediterranei*. Preferentemente, dichas células son células de la cepa *Haloferax mediterranei* que ha sido depositada en el DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Alemania) bajo el número DSM 1411. Por tanto, se contempla que se utilicen células de la cepa *Haloferax mediterranei* DSM 1411 (abreviada en la presente memoria HFX). La cepa ha sido descrita por Rodríguez-Valera, F., Juez, G., Kushner, D. J. (1983). *Halobacterium mediterranei* sp. nov., a new carbohydrate-utilizing extreme halophile. *Syst.Appl.Microbiol.* 4 : 369-381 La forma de cultivar esta cepa es bien conocida en la técnica. Por ejemplo, las condiciones de cultivo adecuadas pueden evaluarse, por ejemplo, a partir de la base de datos DSMZ para esta cepa. En el ejemplo 1 de la sección ejemplos se describe una composición de medios adecuada para esta cepa.

20

25

Las células que se pongan en contacto con la composición A (es decir, que se mezclen con la composición A) en la etapa b) deberán ser viables, es decir, células vivas. Para evaluar si las células son viables o no, se pueden utilizar procedimientos bien conocidos. Por supuesto, un determinado porcentaje de las células que se mezclen con la composición A podría no ser viable. Sin embargo, el experto lo tiene en cuenta.

30

En una realización, una suspensión de células de *Haloferax mediterranei* se mezcla con la composición A. Las células se derivan preferentemente de un precultivo de células de la cepa respectiva. La suspensión comprenderá un sustrato adecuado (es decir, una fuente de carbono) Aunque no es necesario, el precultivo de las células puede llevarse a cabo en presencia del al menos un contaminante al que se hace referencia en la presente memoria.

- 35 El experto puede determinar la cantidad de células de *Haloferax mediterranei* a las que se hace referencia en la presente memoria que deben mezclarse, es decir, ponerse en contacto con la composición A. La cantidad de células que se mezclen deberá permitir una reducción suficiente del al menos un contaminante mencionado en la presente memoria en las aguas residuales hipersalinas y, por tanto, en la composición A y B (que comprende las aguas residuales hipersalinas). La cantidad depende, por ejemplo, del volumen de la composición A que se va a tratar por el procedimiento de la presente invención. En general, cuanto mayor sea el volumen de composición A que se va a tratar, mayor será la cantidad de células a utilizar. El experto lo tendrá en cuenta.
- 40

La mezcla puede realizarse en un recipiente adecuado. En una realización, la mezcla se lleva a cabo en un biorreactor. El término "biorreactor", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un sistema en el que las condiciones están estrechamente controladas para permitir la reducción del contenido de al menos un contaminante, tal como se menciona en la presente memoria. En una realización, dicho biorreactor es un reactor de tanque agitado. Preferentemente, el biorreactor está hecho de un material no corrosivo, como el acero inoxidable. El biorreactor puede ser de cualquier tamaño siempre que sea útil para la incubación de la composición B. Preferentemente, el biorreactor permite una reducción a gran escala del contenido de dicho al menos un contaminante. Por lo tanto, se prevé que el biorreactor tenga un volumen de al menos 1, 10, 100, 500, 1000, 2500 o 5000 litros o cualquier volumen intermedio. Sin embargo, también está previsto llevar a cabo el procedimiento de la presente invención a baja escala, por ejemplo con 5 a 100 ml de composición B.

45

50

La composición B puede comprender además componentes del medio que permitan la reducción del contenido de dicho al menos un contaminante por las células de *Haloferax mediterranei*. Tales componentes del medio son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, NH_4Cl , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , MgCl_2 (por ejemplo, $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), FeCl_3 , MgSO_4 , CaCl_2 (por ejemplo, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), KBr y KCl . En una realización, la composición B comprende una fuente de fósforo, una fuente de nitrógeno, una fuente de azufre, una fuente de potasio y/o una fuente de magnesio (como componentes del medio). La composición B puede contener además oligoelementos tales como hierro, cobre, zinc y cobalto. En una realización, los componentes del medio se añaden a la composición B después

55

de poner en contacto la composición A con las células, es decir, mezclando la composición y las células (como se establece en la etapa (b)).

La selección de los componentes adecuados del medio puede ser llevada a cabo por el experto sin más. Además, el experto puede determinar las concentraciones adecuadas de los componentes de los medios sin más.

- 5 Por ejemplo, se consideran adecuados los siguientes intervalos de concentración y concentraciones para los siguientes componentes del medio. No obstante, la presente invención no se limita a los componentes de los medios mencionados anteriormente ni a los siguientes intervalos de concentración.

Concentración en la composición B:

- NH_4Cl : 0.5 a 3 g/l, por ejemplo 1,5 g/l
- 10 • KH_2PO_4 : 0.05 a 0,5 g/l, por ejemplo 0,15 g/l
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$: 0.5 a 3 g/l, por ejemplo 1,3 g/l
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$: 0.1 a 2 g/l, por ejemplo 0,55 g/l
- KCl : 0.5 a 3 g/l, por ejemplo 1,66 g/l
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.5 a 3 g/l, por ejemplo 1,15 g/l
- 15 • FeCl_3 : 0.001 a 0,1 g/l, por ejemplo 0,005 g/l
- KBr : 0.1 a 2 g/l, por ejemplo 0,5 g/l
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.001 a 0,1 g/l, por ejemplo 0,003 g/l

En la tabla 1 de la sección ejemplos se especifican otras concentraciones preferidas para los componentes de los medios. Además, la composición puede contener oligoelementos.

- 20 En una realización preferida de la presente invención, la composición B comprende además un sustrato. Dicho sustrato deberá permitir el crecimiento de las células de *Haloferax mediterranei*. Si un sustrato permite el crecimiento de la cepa, o no, puede ser evaluado por el experto sin más.

- 25 En una realización, dicho sustrato estará presente además del al menos un contaminante seleccionado del grupo que consiste en nitrobenzeno, formiato, fenol, metilendianilina, en particular 4,4'- Metilendianilina (MDA) y anilina, ya que los contaminantes sólo se degradan y no se utilizan como sustrato. Por tanto, se contempla que el sustrato no sea dicho al menos un contaminante, es decir, que no sea nitrobenzeno, formiato, fenol, metilendianilina, en particular 4,4'-metilendianilina (MDA) y anilina. Por lo tanto, el sustrato también se denomina en la presente memoria cosustrato.

- 30 Preferentemente, la presencia de dicho sustrato permite una reducción mejorada del contenido de, por ejemplo, anilina y formiato (véanse las secciones de ejemplos). Por ejemplo, la adición de glicerol aumenta significativamente las tasas de degradación de todos los contaminantes (formiato, anilina, MDA, nitrobenzeno y fenol), véanse también los ejemplos y la figura 1.

- 35 El sustrato se agrega preferentemente a la composición B. De acuerdo con lo anterior, se prevé que el sustrato no esté presente o no lo esté esencialmente en la composición A. Preferentemente, dicho sustrato es un carbohidrato (que permite el crecimiento de las células de *Haloferax mediterranei*), más preferentemente dicho sustrato es glicerol, un ácido orgánico o un azúcar (que permite el crecimiento de las células de *Haloferax mediterranei*), más preferentemente el sustrato se selecciona entre glicerol, acetato, glucosa, sacarosa, lactato, malato, succinato y citrato. En una realización preferida particular, el sustrato es glicerol.

- 40 Preferentemente, la composición B comprende un sustrato si la incubación se lleva a cabo como procedimiento continuo. El sustrato deberá permitir el crecimiento de la biomasa a un ritmo lento para lograr la estabilidad de la degradación en modo continuo. Ventajosamente, se observó que, por ejemplo, el contenido de anilina podía degradarse continuamente una vez que las células crecían a sus tasas máximas de crecimiento, cuando se añadía continuamente otro sustrato, glicerol, a la composición B, es decir, a un reactor que contenía la composición B.

- 45 El experto puede determinar sin más las concentraciones o los intervalos de concentración adecuados para el sustrato. La reducción del contenido de dicho al menos un contaminante tal como se menciona en la presente memoria en las aguas residuales (composición A) y, por tanto, la incubación tal como se menciona en la presente memoria se realiza preferentemente bajo limitación de carbono. De acuerdo con lo anterior, se prevé que la concentración del sustrato tal como crecimientos permite el crecimiento de la biomasa a un ritmo lento. De este modo se produce biomasa fresca que permite reducir el contenido de dicho al menos un contaminante de forma

continua. Preferentemente, el sustrato se agrega a la composición B en una cantidad que sea completamente absorbida por las células. Por tanto, se prevé que el contenido de TOC no aumente por la adición del sustrato.

Por ejemplo, se prevé que la concentración del sustrato, en particular de los sustratos mencionados anteriormente, en la composición B sea de 0,5 g/l a 10 g/l, en particular de 0,5 g/l a 5 g/l.

5 En una realización de la presente invención, los componentes adicionales del medio y/o el sustrato adecuado se añaden a la composición B, en particular después de mezclar la composición A y las células de *Haloferax mediterranei*. Por ejemplo, los componentes adicionales del medio y/o el sustrato adecuado pueden estar al principio de la incubación de la composición B o durante la incubación de la composición B (por ejemplo, de forma continua o como pulsos).

10 Por supuesto, la concentración del sustrato cambiará durante la incubación, porque el sustrato será metabolizado por las células comprendidas por la composición B a un determinado ritmo. Por tanto, la concentración de sustrato podría no ser constante. No obstante, podría agregarse sustrato adicional durante la incubación para compensar la disminución del contenido de sustrato.

15 De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, se prevé que el contacto de la composición A con las células en la etapa (b) no aumente significativamente el volumen de la composición B resultante (en comparación con el volumen de la composición A). De acuerdo con lo anterior, el componente principal de la composición B será la composición A. Por tanto, la etapa (b) no diluye significativamente la composición A. El factor de dilución es preferentemente inferior a 1,2, más preferentemente inferior a 1,1, y más preferentemente inferior a 1,05. Además, se prevé que el factor de dilución sea inferior a 1,03 o 1,02. El término "factor de dilución", como se utiliza en la
 20 presente memoria, se refiere preferentemente a la relación entre el volumen de la composición B y el volumen de la composición A. En otras palabras, la composición B comprende (en particular consiste en) al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 90 %, y más preferentemente al menos el 95 % en peso de la composición A, sobre la base del peso total de la composición B. Además, se prevé que la composición B comprenda (en particular consiste en) al menos el 97 % o el 98 % en peso de la composición A, sobre la base del peso total de la composición
 25 B. Dado que el factor de dilución es despreciable, se prevé que la composición A comprenda el mismo, o esencialmente el mismo contenido de dicho al menos un contaminante y NaCl que la composición B. Por tanto, las concentraciones de NaCl y del al menos un contaminante previstas para la composición A o las aguas residuales hipersalinas preferentemente son también las concentraciones de NaCl y del al menos un contaminante en la composición B. Por supuesto, la concentración de dicho al menos un contaminante en la composición B disminuirá
 30 con el tiempo debido a la actividad de las células de *Haloferax mediterranei*.

Después de poner en contacto la composición A con las células, la composición B resultante se incuba para permitir la reducción de al menos un contaminante por el *Haloferax mediterranei*. De acuerdo con lo anterior, el procedimiento de la presente invención comprende la etapa adicional (c) de incubar la composición B. En este paso de incubación, se reduce el contenido de dicho al menos un contaminante.

35 De acuerdo con lo anterior, la presente invención prevé en particular un procedimiento para reducir el contenido de al menos un contaminante seleccionado del grupo que consiste en nitrobenzeno, formiato, fenol, metilendianilina, en particular 4,4'-metilendianilina (MDA), y anilina, de aguas residuales hipersalinas (es decir, de una composición que comprende aguas residuales hipersalinas), dicho procedimiento comprende las etapas de:

40 (a) proporcionar una composición A que comprenda aguas residuales hipersalinas y dicho al menos un contaminante,

(b) poner en contacto la composición A con células de *Haloferax mediterranei*, generando así una composición B que comprenda dicha composición A y células de dicha cepa microbiana *Haloferax mediterranei*, y

45 (c) incubar la composición B, reduciendo así el contenido de al menos un contaminante de dicha composición.

La incubación de la composición B se llevará a cabo en condiciones adecuadas, es decir, en condiciones que permitan la reducción del contenido de dicho al menos un contaminante por las células de dicha cepa *Haloferax mediterranei*, tal como se menciona en la presente memoria. Preferentemente, la incubación se lleva a cabo sin disolvente.

50 Preferentemente, la incubación de la composición B (y por tanto la reducción del contenido de dicho al menos un contaminante) se lleva a cabo a un valor de pH de la composición B en el intervalo de 6,0 a 8,2, más preferentemente en el intervalo de 6,2 a 7,6, más preferentemente en el intervalo de 6,8 a 7,4. El valor óptimo de pH es 7,2.

55 Además, se prevé que la incubación se realice preferentemente a una temperatura de 18 °C a 55 °C, más preferentemente a una temperatura de 25 °C a 45 °C, aún más preferentemente a una temperatura de 30 °C a 40 °C, más preferentemente a una temperatura de 35 °C a 40 °C. La temperatura óptima es de 37 °C.

Se prevé que la reducción se lleve a cabo a una temperatura constante. Sin embargo, también se contempla la posibilidad de que la temperatura cambie durante la incubación. En una realización preferida de la presente invención, la temperatura de la composición B se controla durante la incubación.

5 En una realización preferida del procedimiento de la presente invención, la composición B se agita (durante la incubación).

La incubación se lleva a cabo en condiciones aeróbicas. Preferentemente, las condiciones aeróbicas se mantienen agregando aire u oxígeno purificado a la composición B de forma continua.

10 Preferentemente, la composición B tiene un valor de pH en el intervalo de 5,8 a 8,5, más preferentemente de 6,0 a 8,0, y más preferentemente en el intervalo de 6,2 a 7,5. De acuerdo con lo anterior, la incubación se lleva a cabo preferentemente a un valor de pH comprendido entre 5,8 y 8,5, preferentemente entre 6,2 y 7,5. En una realización preferida, el valor de pH de la composición B se controla durante la incubación. Se prevé que el valor del pH se mantenga constante durante el cultivo. Esto puede conseguirse, por ejemplo, agregando HCl.

15 La concentración de la biomasa de las células, en la etapa de incubación puede ser cualquier concentración que permita reducir el contenido de dicho al menos un contaminante. Por ejemplo, la concentración de biomasa puede estar comprendida entre 0,2 y 10 g/l, en particular entre 0,5 y 4,5 g/l. Por ejemplo, la concentración óptima de biomasa para 250 mg/l de anilina es de 1,6 g/l. Por tanto, también se prevé que la concentración de biomasa se sitúe en un intervalo entre 1,3 y 1,9 g/l.

20 Como se ha expuesto anteriormente, el procedimiento de la presente invención se lleva a cabo preferentemente a gran escala. De acuerdo con lo anterior, la composición B tiene preferentemente un volumen de al menos 1, 10, 100, 500, 1000, 2500 o 5000 litros o cualquier volumen intermedio. Sin embargo, la presente invención también contempla volúmenes más pequeños, como volúmenes de al menos 5 ml o 100 ml (por ejemplo, para ensayos).

25 El procedimiento de la presente invención, en particular la incubación a la que se hace referencia en la presente memoria en la etapa (c) del procedimiento de la presente invención, se lleva a cabo preferentemente como un procedimiento por lotes, por lotes alimentados o continuo, en particular como un procedimiento por lotes, por lotes alimentados o continuo con retención celular (preferentemente en un biorreactor). De acuerdo con lo anterior, la composición B se incuba en condiciones discontinuas, discontinuas alimentadas o continuas. El término "procedimiento por lotes" se refiere preferentemente a un procedimiento de incubación de células en el que todos los componentes que se utilizarán finalmente para incubar las células, incluyendo el sustrato y los componentes adicionales del medio, la composición A, así como las propias células, se proporcionan al inicio del procedimiento de incubación. Un procedimiento por lotes se detiene preferentemente en algún momento y se aísla el agua residual hipersalina tratada. El término "procedimiento de alimentación por lotes", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un procedimiento de incubación de células en el que se proporcionan al cultivo componentes adicionales, como los componentes adicionales del medio y/o el sustrato, en algún momento posterior al inicio del procedimiento de cultivo. Preferentemente, el cultivo por lotes alimentados A se detiene en algún momento y se recogen las células y/o los componentes del medio y se aíslan las aguas residuales hipersalinas tratadas.

35 En una realización particularmente preferida, el procedimiento de la presente invención, y por tanto la incubación a la que en la presente memoria se hace referencia, se lleva a cabo en cultivo continuo con un sistema de alimentación mixto utilizando un sustrato como el mencionado anteriormente (tal como glicerol o acetato).

40 En una realización preferida del mencionado procedimiento de la presente invención, el procedimiento comprende además la etapa de separar las células de *Haloferax mediterranei* de la composición B, dando así una composición C. La separación de las células de la composición B se llevará a cabo después de la incubación de la composición B, es decir, después de la reducción del contenido de dicho al menos un contaminante, como etapa (d).

45 La composición C resultante (que en la presente memoria también se denomina "agua residual tratada") estará esencialmente libre de células de *Haloferax mediterranei*. En otras palabras, la composición C no comprenderá las células.

La separación de las células de la composición B puede lograrse por todos los medios de retención celular que se consideren apropiados. Por ejemplo, la separación de las células puede lograrse por centrifugación, filtración o decantación. Preferentemente, las células se separan de la composición B por filtración.

50 Además, las células podrían inmovilizarse en perlas o en un soporte sólido, permitiendo así la separación de las células de la composición B.

Si se lleva a cabo un procedimiento continuo, se contempla que las células separadas se realimenten a las aguas residuales. De acuerdo con lo anterior, las células separadas se ponen en contacto con la composición A o, en particular, con la composición B.

Si el procedimiento se lleva a cabo en un biorreactor, éste comprende preferentemente medios para la retención celular. Preferentemente, el biorreactor comprende una membrana adecuada para separar las células de la composición B por filtración.

5 La composición C tiene preferentemente un contenido en TOC inferior a 40 mg/l, más preferentemente inferior a 30 mg/l y más preferentemente inferior a 20 mg/l.

En una realización preferida de la presente invención, el procedimiento comprende además concentrar la composición C, dando así una composición C*.

10 Esta etapa aumentará la concentración de NaCl de las aguas residuales tratadas, es decir, el NaCl se concentrará en la composición. Preferentemente, la composición concentrada C* comprende NaCl en una concentración superior al 20,0 % (p/v), basada en el volumen total de la composición A, en particular en una concentración superior al 22 % (p/v). Estas concentraciones de NaCl son las ideales cuando se utilizan en la corriente de alimentación del procedimiento cloroalcalino.

15 De acuerdo con la presente invención, la concentración ascendente de la composición C puede realizarse por cualquier procedimiento que se considere apropiado. Los procedimientos preferidos son la ósmosis inversa, la ultrafiltración y la nanofiltración. En estos procedimientos, una presión osmótica positiva a un lado de una membrana de filtración. Además, la concentración puede lograrse por evaporación.

Como se ha expuesto anteriormente, la composición A y B puede comprender NaCl en una concentración superior al 20 % (p/v), basado en el volumen total de dicha composición. Si se utilizan estas concentraciones, la etapa de concentración, en principio, podría omitirse al someter las aguas residuales tratadas al procedimiento cloroalcalino.

20 Sin embargo, las composiciones C y C* pueden someterse a otras etapas de purificación. En una realización del procedimiento de la presente invención, el procedimiento comprende además la eliminación de componentes inorgánicos de dicha composición. Dichos componentes inorgánicos son preferentemente oligoelementos y/o sales de los componentes del medio. La eliminación se realizará antes de someter la composición C o C* a electrólisis de cloruro de sodio.

25 Las definiciones y explicaciones dadas anteriormente se aplican *mutatis mutandis* al siguiente objeto de la presente invención, en particular al siguiente procedimiento de la presente invención para la producción de cloro y/o hidróxido de sodio, a la composición de la presente invención, al biorreactor de la presente invención y al uso de la presente invención.

30 La presente invención también se refiere a un procedimiento para la producción de cloro e hidróxido de sodio, que comprende las etapas de

(i) proporcionar una composición C según el procedimiento de la presente invención o una composición C* según el procedimiento de la presente invención, y

(ii) someter la composición según a) a una electrólisis de cloruro de sodio, produciendo así cloro e hidróxido de sodio.

35 La etapa (i) del procedimiento mencionado, es decir, el suministro de una composición C según el procedimiento de la presente invención o de una composición C* según el procedimiento de la presente invención, comprende preferentemente las etapas del procedimiento para reducir el contenido de al menos un contaminante seleccionado del grupo que consiste en nitrobenzono, formiato, fenol, 4,4'-metilendianilina (MDA) y anilina de una solución hipersalina.

40 En una realización, la composición C se obtiene mediante las siguientes etapas.

(a) proporcionar una composición A que comprenda aguas residuales hipersalinas y dicho al menos un contaminante y,

(b) poner en contacto la composición A con células de *Haloferax mediterranei*, generando así una composición B que comprenda dicha composición A y dichas células ,

45 (c) incubar la composición B, reduciendo así el contenido de dicho al menos un contaminante de la composición, e

(d) separar las células de *Haloferax mediterranei* de la composición B, proporcionando así la composición C.

50 Si se proporciona la composición C*, la etapa ii) comprende preferentemente la etapa adicional de (e) concentrar la composición C, proporcionando así la composición C*.

La electrólisis del cloruro de sodio puede llevarse a cabo por procedimientos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos de electrólisis de membrana suelen utilizarse, por ejemplo, para la electrólisis de soluciones que contienen cloruro de sodio (sobre este tema, véase Peter Schmittinger, CHLORINE, Wiley-VCH Verlag, 2000). Aquí, se utiliza una célula de electrólisis que se divide en dos y comprende un espacio anódico con un ánodo y un espacio catódico con un cátodo, el espacio anódico y el espacio catódico están separados por una membrana de intercambio iónico. Se introduce en el espacio anódico una solución que contiene cloruro de sodio y cuya concentración de cloruro de sodio suele ser superior a 300 g/l. En el ánodo, el ion cloruro se oxida a cloro que se descarga de la célula con la solución de cloruro de sodio agotada (unos 200 g/l). Los iones de sodio migran bajo la acción del campo eléctrico a través de la membrana de intercambio iónico hacia el espacio catódico. Durante esta migración, cada mol de sodio arrastra consigo de 3,5 a 4,5 mol de agua, según la membrana. Esto hace que el anolito se quede sin agua. A diferencia del anolito, el agua se consume en el lado del cátodo mediante la electrólisis del agua para formar iones hidróxido e hidrógeno. El agua transportada con los iones de sodio al catolito es suficiente para mantener la concentración de hidróxido de sodio en la salida en un 31-32 % en peso, con una concentración de entrada del 30% y una densidad de corriente de 4 kA/m². En el espacio catódico, el agua se reduce electroquímicamente para formar iones hidróxido e hidrógeno.

Como alternativa, puede utilizarse como cátodo un electrodo de difusión de gas en el que el oxígeno reacciona con los electrones para formar iones hidróxido y no se forma hidrógeno. Los iones de hidróxido, junto con los iones de sodio que han migrado al espacio catódico a través de la membrana de intercambio iónico, forman hidróxido de sodio. Normalmente se introduce en la cámara catódica una solución de hidróxido de sodio con una concentración del 30 % en peso y se descarga una solución de hidróxido de sodio con una concentración del 31-32 % en peso. El objetivo es alcanzar una concentración muy elevada de hidróxido de sodio, ya que éste suele almacenarse o transportarse como una solución con una concentración del 50 %. Sin embargo, las membranas comerciales no son resistentes en la actualidad a una solución alcalina con una concentración superior al 32 % en peso, por lo que la solución de hidróxido de sodio debe concentrarse mediante evaporación térmica.

En el caso de la electrólisis del cloruro de sodio, se introduce agua adicional en el anolito a través de esta solución que contiene cloruro de sodio, pero el agua sólo se descarga en el catolito a través de la membrana. Si se introduce más agua a través de la solución que contiene cloruro de sodio de la que se puede transportar al catolito, el anolito se agota en cloruro de sodio y la electrólisis no puede funcionar de forma continua. En el caso de concentraciones muy bajas de cloruro de sodio, se produciría la reacción secundaria de formación de oxígeno.

En una realización preferida del procedimiento de la presente invención, la electrólisis es electrólisis de célula de membrana de cloruro de sodio, en particular electrólisis de membrana utilizando electrodos consumidores de oxígeno, electrólisis de célula de diafragma de cloruro de sodio o electrólisis de célula de mercurio de cloruro de sodio.

La presente invención se refiere además a la composición B definida anteriormente en relación con el procedimiento de la presente invención. De acuerdo con lo anterior, la presente invención se refiere a la composición B que comprende aguas residuales hipersalinas, al menos un contaminante seleccionado del grupo formado por nitrobenceno, formiato, fenol, 4,4'-metilendianilina (MDA) y anilina, y células de *Haloferax mediterranei*.

Los contenidos/concentraciones preferidos de dicho al menos un contaminante o concentraciones de NaCl preferidas adicionales se describen en relación con el método de la presente invención para reducir el contenido de anilina y/o formiato. Además, la composición puede comprender componentes (tales como otros componentes del medio y/o un sustrato adecuado, etc.) como se ha descrito anteriormente.

Además, la presente invención se refiere a un biorreactor que comprende al menos 1 l de la composición B de la presente invención.

Además, la presente invención se refiere al uso de células de *Haloferax mediterranei* para reducir el contenido de al menos un contaminante seleccionado del grupo que consiste en nitrobenceno, formiato, fenol, 4,4'-metilendianilina (MDA) y anilina de aguas residuales hipersalinas, en particular, la presente invención se refiere al uso de dichas células para reducir el contenido de dicho al menos un contaminante de una composición B.

Las definiciones y explicaciones dadas anteriormente en relación con el procedimiento de la presente invención para reducir el contenido de al menos un contaminante se aplican en consecuencia a los usos mencionados. Por tanto, de acuerdo con los usos mencionados, el contenido de dicho al menos un contaminante se reduce preferentemente como se ha descrito anteriormente en relación con el procedimiento de la presente invención.

Las figuras muestran:

Figura 1. El gráfico ilustra la degradación de formiato en salmuera real (15 % p/v de NaCl) tras la adición de 1,4 g/L de glicerol como cosustrato utilizando células de la bacteria halófila *Haloferax mediterranei*. El formiato se degrada simultáneamente con el glicerol (indicado con triángulos). En el experimento de control (indicado con asteriscos) no se degradaron ni el glicerol ni el formiato en los matraces agitados sin células.

Figura 2. El gráfico representa la degradación de anilina (5 y 10 mg/l) utilizando células de *Haloferax mediterranei* en un medio modelo que contiene un 15 % p/v de NaCl. Tras 240 horas de incubación y seguimiento no se observa crecimiento de biomasa con anilina como único sustrato. En presencia de un segundo sustrato (50 mg/l de fenol) se observa un aumento de la concentración de biomasa junto con la reducción de anilina y fenol. La velocidad de degradación de la anilina depende de la concentración inicial de anilina. En el experimento de control sin células bacterianas no se detecta ningún cambio significativo en la concentración de anilina o fenol.

Figura 3. El gráfico de coeficientes muestra la importancia de dos factores, la concentración inicial de anilina y el pH, en la degradación de la anilina por la cepa *Haloferax mediterranei*. La concentración de NaCl parece no tener importancia en la eliminación de anilina, la degradación de anilina por HFX se produce en todas las concentraciones de NaCl.

Figura 4. El gráfico del contador de respuesta muestra que la degradación óptima de la anilina puede producirse a concentraciones iniciales de anilina más bajas para la cepa *Haloferax mediterranei*.

Figura 5. El gráfico ilustra la degradación de la anilina a diversas concentraciones de sal (0 a 20 % p/v de NaCl) utilizando células de la bacteria halofílica *Haloferax mediterranei*. La velocidad de degradación de la anilina es mayor a concentraciones de sal más elevadas.

Figura 6. El gráfico ilustra la degradación del nitrobenceno a concentraciones de sal del 15 % p/v utilizando células de la arquea halofílica *Haloferax mediterranei*. el 80 % del contenido total de nitrobenceno se degrada en las primeras 24 horas de incubación. En el experimento de control con 30 ppm de nitrobenceno no se observa una reducción significativa del contenido de nitrobenceno.

Figura 7. Procesamiento continuo de salmuera industrial que contiene 0,3 g/L de formiato utilizando 5 g/L de biomasa de *Haloferax mediterranei*. El formiato se degradó. La cantidad de concentración de formiato residual depende de la tasa de dilución. El cosustrato glicerol es necesario para el crecimiento de la biomasa y se absorbe completamente en estado estacionario.

La invención se ilustrará simplemente mediante los siguientes ejemplos. Dichos ejemplos no deberán, en ningún caso, interpretarse de forma que limiten el alcance de la invención, que viene determinado por las reivindicaciones anexas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Experimentos de degradación en matraces agitados

Cepas y medios

La cepa *Haloferax mediterranei* (DSM 1411) (en este estudio HFX) de tipo salvaje se adquirió en DSMZ - Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares. Los cultivos en matraces agitados para la preparación del inóculo se realizaron a 180 rpm y 37 °C en una incubadora de laboratorio (Infors, Suiza) con ligeras modificaciones en el medio No. 97 propuesto por DSMZ, con las siguientes composiciones (g/l) 97 sugerido por DSMZ con las siguientes composiciones (g/l): NaCl 250, MgSO₄ · 7H₂O 20,0, KCl 2,0, Na-Citrato 3,0, FeSO₄ · 7H₂O 0,05, MnSO₄ · H₂O, extracto de levadura 10,0 y glucosa 5,0; pH 7,0. Los matraces Erlenmeyer de 500 ml y los medios se esterilizaron siempre.

Analítica

La turbidez como indicador del crecimiento celular se midió utilizando el espectrofotómetro UV/Vis Shimadzu a 600 nm en diversos intervalos de tiempo.

La concentración residual de formiato, acetato y glicerol en el sobrenadante del cultivo se midió mediante HPLC. El procedimiento HPLC (Thermo-Fisher) se realizó con una columna Aminex HPX-87H de Bio-Rad a 30 °C, un eluyente isocrático de TFA al 0,1 % en agua MQ con un flujo de 0,5 ml/min seguido de detección UV a 210 nm. El límite de cuantificación con un volumen de inyección de 20 µl fue de 5 mg/l para el formiato y el acetato. Los estándares utilizados para la cuantificación se prepararon en la misma matriz salina que las muestras. La concentración residual de anilina, fenol, nitrobenceno y MDA en el sobrenadante del cultivo se midió mediante HPLC. El procedimiento HPLC (Thermo-Fisher) se realizó con una columna Acclaim PA C-16 de 3 µm (Thermo-Fisher). Como fase móvil se utilizó acetonitrilo, tampón 25 mM KH₂PO₄ pH 3,5 y MQ, y la detección se realizó con UV a 190 nm. Con un volumen de inyección de 5 µl, el límite de cuantificación para la anilina es de 1 ppm, para el fenol de 0,5 mg/l, para el nitrobenceno de 1 ppm y para el 4,4'MDA de 0,1 mg/l. También se detectaron concentraciones inferiores.

Degradación del formiato en experimentos en matraz agitado

Haloferax mediterranei (DSM 1411) es una Archaeon halofílica extrema que requiere al menos un 10 % (p/v) de NaCl para crecer. El crecimiento óptimo se registra para concentraciones de 20 - 25 % de NaCl (p/v).

Para los estudios de formiato, las células se cultivaron en salmuera industrial real que contenía 0,37 g/L de formiato y 15 % (p/v) de NaCl. Los componentes del medio se suplementaron según la tabla 1 tras ajustar el pH de la salmuera a 7,0. El medio no se había esterilizado antes de la fermentación.

El medio D es un medio sintético con la composición indicada en la tabla 2.

5 Tabla 1. Componentes de los medios agregados a la salmuera a pH 7,0 para los medios A, B y C.

Composición	Cantidad g/l
Fuente de carbono:	
A) Glicerol o	A) 1,4 g/L
B) Acetato o	B) 3,5 g/L
C) Formiato	C) 6.0 g/L
NH ₄ Cl	1,50
KH ₂ PO ₄	0,15
FeCl ₃	0,005
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,30
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,10
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,55
KCl	1,66
KBr	0,50
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,003
Oligoelementos (Tab.3)	1 ml

10 Se inocularon matraces agitados con precultivos que no contenían ninguna fuente compleja de carbono o nitrógeno. El inóculo estaba libre de cualquier fuente de carbono residual. Se inocularon matraces agitados para alcanzar una DO inicial de 0,25 en un volumen total de 200 ml. Las células se cultivaron en una incubadora de laboratorio (Infors, Suiza) a 180 rpm y 37 °C utilizando matraces Shake de 500 ml.

Los experimentos se realizaron por duplicado junto con un experimento de control con solo medio y sin células.

Tabla 2. Componentes del medio sintético D (pH 7,0).

Composición	Cantidad g/l
NaCl	150
Formiato	6,0 g/L

(continuación)

Composición	Cantidad g/l
NH ₄ Cl	1,50

Composición	Cantidad g/l
KH_2PO_4	0,15
FeCl_3	0,005
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,30
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,10
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,55
KCl	1,66
KBr	0,50
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,003
Oligoelementos (Tab.3)	1 ml

Tabla 3. Composición de la solución madre de oligoelementos.

Composición	Cantidad mg/100 ml
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	139
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	100
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	78
$\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	62
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	86

5 La capacidad del HFX para degradar el formiato se investigó en experimentos de matraz agitado. Se prepararon tres medios diferentes con adición de A) Glicerol, B) Acetato y C) Formiato. Mientras que A y B deben mostrar si HFX puede absorber formiato en presencia de un cosustrato, el ensayo C debe mostrar si el formiato favorece el crecimiento de HFX. Tanto el crecimiento celular como la degradación del formiato se controlaron mediante numerosos muestreos.

10 Se pudo detectar que el formiato se degradaba rápidamente cuando estaba presente un segundo sustrato (por ejemplo, glicerol o acetato). En esos experimentos, el formiato y el cosustrato se absorbieron simultáneamente.

Al agregar formiato adicional a la salmuera industrial (medio C), se investigó si el formiato podía ser absorbido y convertido en biomasa. Los resultados mostraron que el formiato se degradaba pero no se detectaba crecimiento, lo que indica que el HFX utiliza el formiato como fuente de energía pero no para la producción de biomasa.

15 Experimentos adicionales mostraron que el HFX requiere una segunda fuente de carbono para la degradación del formiato. A diferencia del medio C, que es un flujo de residuos industriales conocido por contener contaminantes orgánicos como anilina, MDA y nitrobenzeno, el medio D sólo contenía formiato como fuente de carbono. En este medio no se pudo detectar ni el crecimiento ni la degradación del formiato.

Ejemplo 2; Estudios de absorción de anilina y fenol en matraz agitador

20 Para los estudios de captación de anilina se prepararon medios sintéticamente definidos. A continuación se indica la composición de los medios:

Tabla 4. Medio sintético definido y composición de oligoelementos para estudiar la absorción de fenol y anilina por *Haloferax mediterranei*

Composición	Cantidad g/l
NaCl	150
NH ₄ Cl	1,50
KH ₂ PO ₄	0,15
FeCl ₃	0,005
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,30
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,10
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,55
KCl	1,66
NaHCO ₃	0,20
KBr	0,50
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,003
Oligoelementos	1 ml
Anilina 99 %	5- 100 mg
Fenol	50 a 100 mg
Composición oligoelementos	de Cantidad mg/100 ml
FeSO ₄ .7H ₂ O	136
CuSO ₄ .5H ₂ O	100
MnCl ₂ .4H ₂ O	50
CoCl ₂ .2H ₂ O	44
ZnSO ₄ .7H ₂ O	86

5 Se estudió la absorción de anilina por la cepa. Las células cultivadas previamente en el medio complejo se cosecharon por centrifugación a 3000 rpm, durante 5 minutos. Las células se lavaron y se disolvieron en matraces agitados que contenían 100 ml de los respectivos medios sintéticos definidos y 15 % p/v de NaCl con anilina como única fuente de carbono y se incubaron a una temperatura de 37 °C y agitación. A la hora cero se midió la OD600 y se guardó un ml de muestra para el análisis por HPLC como referencia. Se controló el crecimiento sobre la anilina y la concentración de anilina residual. Las cepas *Haloferax mediterranei* no utilizan la anilina como fuente de crecimiento, sin embargo, la concentración residual de anilina a lo largo del tiempo muestra que la anilina se eliminó completamente de los medios de cultivo, tanto en medios sintéticos como en salmuera real, dependiendo de la concentración inicial de anilina. En presencia de un segundo sustrato, en este caso fenol, se detectó un aumento de 50 a 100 mg/l en la concentración de biomasa y una mejor degradación de la anilina. También se detectó crecimiento de fenol en ausencia de anilina. La degradación de la anilina y el fenol se investigó con más detalle en

10

más experimentos en matraces agitados, así como en biorreactores, con el fin de poder controlar otros parámetros del procedimiento.

Ejemplo 3: Condiciones óptimas de cultivo para la degradación de la anilina

Estudios sobre la anilina mediante el diseño multivariante de experimentos

5 Para encontrar las condiciones óptimas para la degradación de la anilina por HFX se utilizó un diseño multivariante de experimentos. Se llevó a cabo un diseño factorial fraccionado del experimento para evaluar la influencia de tres factores (pH, concentración de anilina y concentración de NaCl) sobre tres parámetros (biomasa delta, concentración de anilina residual y pH). Los factores estudiados en este experimento junto con sus rangos respectivos se indican en la (Tabla 5).

10 Tabla 5. Los factores y respuestas estudiados para la degradación de la anilina por HFX

Nombre del factor	Intervalos
pH	6,2 a 8,2
concentración de anilina	15 a 50 mg/l
NaCl	12 a 18 % p/v

15 La herramienta estadística Modde propuso once experimentos para este estudio. Los experimentos se realizaron en matraces agitados en medios sintéticos definidos a 37 ° C y 170 rpm golpes. La concentración de biomasa, los cambios de pH y la concentración de anilina residual se determinaron a intervalos de 24 horas. Las mediciones obtenidas al cabo de 144 horas se analizaron mediante Modde.

Se obtuvo un modelo válido para la anilina delta. La anilina se degradó en todos los experimentos. El gráfico de coeficientes mostró la importancia de la concentración inicial de anilina y del pH en la degradación de la anilina. La mejor degradación de la anilina por las células HFX se produjo a pH 6,2, 12 % p/v de NaCl y 15 mg/l de anilina, donde después de 144 horas se degradó el 94 % de la anilina.

20 Degradación de la anilina a diversas concentraciones de sal

Se estudió la degradación de la anilina a diversas concentraciones de sal de 0 a 20 % p/v en medios sintéticos que contenían 30 mg/l de anilina como fuente de carbono en experimentos de matraz agitado. La concentración residual de anilina se determinó mediante HPLC a intervalos de 24 horas. Para la cepa HFX se produjo una mejor degradación de la anilina a una mayor concentración de NaCl por encima del 14 % p/v, donde la mejor degradación se produjo al 20 % p/v de NaCl.

Ejemplo 4: Degradación del nitrobenceno por *Haloferax mediterranei*

Experimentos en matraz agitado primario con nitrobenceno

30 Para los estudios de captación de nitrobenceno se prepararon medios sintéticamente definidos. La composición de los medios utilizados se indica en la (Tabla1), donde en lugar de anilina se utilizaron 30 y 50 ppm de nitrobenceno como único sustrato. Las células cultivadas previamente en el medio complejo se cosecharon por centrifugación a 3000 rpm, durante 5 minutos. Las células se lavaron y se disolvieron en matraces agitados que contenían 100 ml de los respectivos medios sintéticos definidos y 15 % p/v de NaCl con nitrobenceno como única fuente de carbono y se incubaron a una temperatura de 37 ° C y agitación de 170 rpm. A la hora cero se midió la OD600 y se guardó un ml de muestra para el análisis por HPLC como referencia. Se controló el crecimiento en nitrobenceno y la
 35 concentración residual de nitrobenceno. La cepa *Haloferax mediterranei* no utilizó el nitrobenceno como fuente de crecimiento, sin embargo, la concentración residual de nitrobenceno a lo largo del tiempo muestra que se eliminó completamente de los medios de cultivo, tanto en los medios sintéticos como en la salmuera real. La mayor tasa de degradación se observó durante las primeras 24 horas. La degradación del nitrobenceno se investigó con más detalle en más experimentos en matraces agitados así como en biorreactores para poder controlar otros
 40 parámetros del procedimiento.

Estudios sobre el nitrobenceno mediante el diseño multivariante de experimentos

Con el fin de encontrar las condiciones óptimas para la degradación del nitrobenceno por el HFX se estudió utilizando un diseño multivariante de experimentos. Se llevó a cabo un diseño factorial fraccionado del experimento para evaluar la influencia de tres factores (pH, concentración de nitrobenceno y concentración de NaCl) sobre tres

parámetros (biomasa delta, concentración residual de nitrobenzono y pH delta). Los factores estudiados en este experimento junto con sus rangos respectivos se indican en la (Tabla 6).

Tabla 6. Los factores y respuestas estudiados para la degradación del nitrobenzono por HFX

Nombre del factor	Intervalos
pH	6 a 8
concentración de nitrobenzono	5 a 25 mg/l
NaCl	15 a 20 % p/v

- 5 La herramienta estadística Modde propuso once experimentos para este estudio. Los experimentos se realizaron en matraces agitados en medios sintéticos definidos a 37 ° C y 170 rpm golpes. La concentración de biomasa, los cambios de pH y la concentración residual de nitrobenzono se determinaron a intervalos de 24 horas. Las mediciones obtenidas después de 72 horas fueron analizadas por Modde, mostradas en la tabla 7.

Tabla 7. Muestra los resultados obtenidos para la degradación de nitrobenzono por HFX.

Exp	pH	Nitrobenzono	NaCl % p/v	Δ OD600	% de degradación
N1	6	5	15	-0,099	60,1
N2	8	5	15	-0,098	80
N3	6	25	15	-0,093	81
N4	8	25	15	-0,08	64,5
N5	6	5	20	-0,117	80,4
N6	8	5	20	-0,136	80,4
N7	6	25	20	-0,124	89,3
N8	8	25	20	-0,128	87,7
N9	7	15	17,5	-0,106	100
N10	7	15	17,5	-0,094	100
N11	7	15	17,5	-0,108	100
Control	7	15	17,5	0,01	13

10

La tabla 7 muestra la matriz experimental y los resultados obtenidos. El nitrobenzono se degradó en casi todos los experimentos. En todos los experimentos se observó una reducción de la concentración de biomasa. En el experimento de control sin células se produce un 13 % de oxidación de nitrobenzono en comparación con el 100% de eliminación en los experimentos N9 a 11 que muestran un 87% más de degradación en presencia de células HFX. La mejor degradación del nitrobenzono por las células HFX se produce en los experimentos CenterPoint con pH 7,0, 17,5 % p/v de NaCl y 15 mg/l de nitrobenzono, donde después de 72 horas se degradó el 100 % del nitrobenzono.

15

Ejemplo 5: Degradación de anilina, fenol, nitrobenzono y 4, 4 MDA en salmuera real en modo discontinuo

Se estableció el cultivo en biorreactor para comprobar la aplicabilidad de la cepa degradadora en procedimientos reales en un agua residual industrial. Para este experimento se utilizaron células HFX para el procedimiento

20

utilizando una salmuera real que contenía un 15% p/v de NaCl. En este caso se controlaron los parámetros del procedimiento y las condiciones de cultivo, y los experimentos se llevaron a cabo en equipos biorreactores especiales resistentes a la corrosión y adecuados para el cultivo en ambientes hipersalinos.

Se utilizó el reactor especial no corrosivo Labfors PEEK (Infors, AG, Suiza) con las siguientes especificaciones:

- 5 Recipiente de cultivo de vidrio de borosilicato: 1 L de volumen
- Refrigeración de gases de escape por vidrio de borosilicato
- Tapa superior del biorreactor de polímero especial resistente a la corrosión (PEEK)
- Soporte especial para termómetro de polímero (PEEK) resistente a la corrosión
- Tubo de muestreo de vidrio de borosilicato y tubo de entrada de gas

- 10 Agitador especial resistente a la corrosión
- Cubierta de vidrio de borosilicato en el recipiente del reactor

Análisis en línea de:

- Gas de escape CO₂
- 15 Gas de escape O₂
- Sonda de pH de vidrio
- Hastelloy Clark pO₂ y
- Controlador de caudal másico térmico para aire

- 20 Los siguientes componentes del medio se agregaron a la salmuera: KCl 0,66 g/l, NH₄Cl 1,5 g/l, KH₂PO₄ 0,15 g/l, MgCl₂·6H₂O 1,3 g/l, MgSO₄·7H₂O 1,1 g/l, FeCl₃ 0,005 g/l, CaCl₂·2H₂O 0,55 g/l, KBr 0,5 g/l, stock de Mn 3 ml y oligoelementos 1 ml.

Temperatura: 37 °C

pH 7.2 (para controlar el pH se utilizó HCl 0,5 M y NaOH 0,5 M)

- 25 Como los compuestos aromáticos en este estudio son en su mayoría degradados y no se utilizan como sustrato para facilitar el crecimiento de la biomasa, con el fin de aumentar la concentración de biomasa en el biorreactor, se realizó un cultivo por lotes en salmuera con la adición de componentes del medio y glicerol como sustrato para el crecimiento (Tabla 1). Una vez que se obtuvo suficiente biomasa (aproximadamente 3 g/l), se agregó al reactor, en forma de pulso, una mezcla maestra que contenía anilina 5 mg/l, fenol 5 mg/l y 4,4'MDA 3 mg/l. Durante el cultivo por lotes, la degradación completa de los compuestos aromáticos tardó hasta 96 horas.

- 30 **Ejemplo 6: Degradación de formiato, MDA, Nitrobenceno, Anilina y Fenol en agua residual real en bioprocesamiento continuo utilizando sistema de retención celular**

Configuración del biorreactor con retención celular

- 35 La degradación continua de contaminantes en la salmuera real se realizó utilizando un sistema de retención celular. A la salmuera industrial se le añadieron los componentes del medio indicados en la tabla 1 y glicerol como cosustrato. La cantidad de glicerol en el medio se ajustó de forma que se alcanzara una tasa de crecimiento específica de 0,026 h⁻¹. El cultivo se estableció en el biorreactor como se describe para los experimentos en matraz agitado. La fermentación en el biorreactor se realizó a 450 rpm de agitación y 37 °C. El sistema de retención celular se fijó en el biorreactor utilizando un cartucho de membrana de microfiltración de fibra hueca de polisulfona (PSU) con un área de 420 cm² y un tamaño de poro de 0,2 µm. Caudales de alimentación de 130 a 610 g/h condujeron a una tasa de dilución de 0,1 a 0,6 h⁻¹. Ajustando el flujo de alimentación en relación con el flujo de sangrado que contiene células y la cosecha libre de células, se podría conseguir una biomasa constante en el fermentador.
- 40

La turbidez como indicador de la densidad celular y los análisis por HPLC del formiato, acetato y glicerol residuales se midieron durante todo el procedimiento.

MDA residual, Nitrobenceno, Anilina y Fenol también fueron medidos por HPLC.

Fermentaciones

Se cultivó HFX en el biorreactor de 1 L para degradar contaminantes en salmuera con un flujo continuo de aprox. 0,3 g/L de formiato. Para los experimentos se variaron los dos parámetros concentración de biomasa (g/L) y tasa de dilución (h⁻¹) en el intervalo de 2-5 g/L y 0,1 - 0,6 h⁻¹ respectivamente.

5 Se pudo observar una degradación significativa del formiato en todos los cultivos continuos. Los experimentos con una mayor concentración de biomasa dieron lugar a una menor concentración de formiato residual. En los experimentos con mayor caudal se pudo medir una mayor concentración residual de formiato.

10 El análisis del sobrenadante de cultivo muestreado del reactor mostró que la cantidad de MDA y anilina también podía disminuir durante el bioprocesamiento. El fenol y el nitrobenzeno se degradaron hasta una concentración inferior al límite de detección. HFX puede degradar formiato, MDA, anilina, fenol y nitrobenzeno tanto en modo discontinuo como continuo. La tasa de degradación de los contaminantes mencionados depende de la concentración de biomasa, la tasa de dilución y la concentración de los contaminantes en la salmuera.

Resumen - Conclusiones:

15 Las aguas residuales hipersalinas contienen frecuentemente contaminantes orgánicos como anilina formiato, fenol, nitrobenzeno y 4,4'-Metilendianilina. Para tratar las aguas residuales que contienen compuestos orgánicos se utilizan varios procedimientos físicos y químicos, como la sorción, la ozonización y el tratamiento electroquímico. Sin embargo, la mayoría de los tratamientos mencionados no son capaces de reducir el contenido total de carbono orgánico en las corrientes residuales salinas hasta el nivel máximo requerido.

20 En esta invención, se descubrió que *Haloferax mediterranei* DSM.1411 puede degradar activamente contaminantes orgánicos tóxicos de su entorno hipersalino de hasta 200 g/l de salinidad. Además, se descubrió que *Haloferax mediterranei* DSM.1411 puede degradar anilina formiato, fenol, nitrobenzeno y 4,4'-Metilendianilina de ambientes hipersalinos.

25 La presente invención puede dirigirse al tratamiento óptimo y eficaz de cualquier agua hipersalina derivada de la producción de diarilcarbonato, la producción de policarbonatos o la producción de diaminas y poliaminas de la serie del difenilmetano, que contenga cualquiera o la combinación de los siguientes componentes formiato, fenol, nitrobenzeno, 4,4'-metilendianilina (MDA) y anilina con la intención de reducir el contenido total de carbono orgánico.

30 El otro aspecto de la presente invención comprende el concepto de valor residual. Por un lado, los problemas medioambientales causados por las corrientes residuales altamente salinas enriquecidas con una cantidad considerable de contaminantes orgánicos no deseados y, por otro, la necesidad de agua salina de alta calidad como precursora de otros procedimientos industriales, como la electrólisis de membrana, hacen que los pretratamientos de estas corrientes residuales hipersalinas sean absolutamente cruciales. Nuestra invención ayuda a conseguir este pretratamiento barato, rápido y eficaz para cumplir los requisitos de la electrólisis de membrana para producir cloro gaseoso y/o hidróxido sódico a partir de la salmuera tratada.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para reducir el contenido de al menos un contaminante seleccionado del grupo que consiste en nitrobenzeno, formiato, fenol, metilendianilina, en particular 4,4'-metilendianilina (MDA), y anilina, en aguas residuales hipersalinas, en el que dichas aguas residuales hipersalinas proceden de la producción de diarilcarbonato, la producción de policarbonatos o la producción de diaminas y poliaminas de la serie del difenilmetano y en la que dicha agua residual hipersalina comprende NaCl en una concentración de al menos el 6 % (p/v) hasta el 25 % (p/v) basado en el volumen total del agua residual hipersalina, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de
- 5
- (a) proporcionar una composición A que comprenda aguas residuales hipersalinas y dicho al menos un contaminante, y
- 10
- (b) poner en contacto la composición A con células de *Haloferax mediterranei*, generando así una composición B que comprenda dicha composición A y células de *Haloferax mediterranei*, y
- (c) incubar la composición B, reduciendo así el contenido de dicho al menos un contaminante.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha composición B comprende NaCl en una concentración de al menos 6 % (p/v), preferentemente de al menos 7 % (p/v), más preferentemente de al menos 10 % (p/v), aún más preferentemente de al menos 12 % (p/v), y más preferentemente de al menos 15 % (p/v) basado en el volumen total de la composición B.
- 15
3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha composición B comprende al menos 0,5 mg/l de formiato y/o 0,5 mg/l de fenol y/o 0,5 mg/l de nitrobenzeno y/o 0,5 mg/l de 4,4'-metilendianilina (MDA) y/o 0,5 mg/l de anilina.
- 20
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha composición B comprende además un sustrato que permite el crecimiento de las células de *Haloferax mediterranei*, en particular en el que dicho sustrato se ha agregado a la composición B, preferentemente dicho sustrato es un carbohidrato, en particular glicerol, un azúcar tal como glucosa o sacarosa o un ácido orgánico tal como acetato, lactato, malato, succinato o citrato.
- 25
5. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la incubación en la etapa (c) se lleva a cabo a una temperatura de 18 °C a 55 °C y/o en el que la incubación en la etapa (c) se lleva a cabo a un valor de pH en el intervalo de 6,0 a 8,2, preferentemente en el intervalo de 6,2 a 7,6.
6. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha incubación en la etapa (c) se lleva a cabo en condiciones aeróbicas.
- 30
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las células de *Haloferax mediterranei* son células de *Haloferax mediterranei* DSM.1411.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el contenido total de al menos un contaminante se reduce al menos en un 30 %, al menos en un 50 %, al menos en un 70 % o, en particular, al menos en un 90 % o al menos en un 95 %.
- 35
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho procedimiento comprende además la separación de las células de la composición B, obteniéndose así la composición C, y opcionalmente en el que el procedimiento comprende además la concentración de la composición C, obteniéndose así la composición C*.
- 40
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicho procedimiento comprende además la eliminación de componentes inorgánicos de la composición C o C*, en particular de oligoelementos y/o sales de componentes del medio.
11. Un procedimiento para la producción de cloro e hidróxido sódico, que comprende las etapas de
- (i) proporcionar una composición C o C* según el procedimiento de la reivindicación 9 o 10, y
- 45
- (ii) someter la composición según a) a un procedimiento de electrólisis de cloruro de sodio, produciendo así cloro e hidróxido de sodio y, opcionalmente, hidrógeno.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la electrólisis de cloruro de sodio se selecciona entre electrólisis de cloruro de sodio con celda de membrana, en particular electrólisis de membrana utilizando electrodos consumidores de oxígeno y electrólisis de cloruro de sodio con celda de diafragma.
- 50
13. Uso de células de *Haloferax mediterranei* para reducir el contenido de al menos un contaminante seleccionado del grupo que consiste en nitrobenzeno, formiato, fenol, metilendianilina, en particular 4,4'-metilendianilina (MDA),

y anilina en aguas residuales hipersalinas, en las que las aguas residuales hipersalinas proceden de la producción de diarilcarbonato, la producción de policarbonatos o la producción de diaminas y poliaminas de la serie del difenilmetano, y que las aguas residuales hipersalinas comprenden NaCl en una concentración de al menos el 6 % (p/v) hasta el 25 % (p/v) basada en el volumen total de las aguas residuales hipersalinas.

- 5 14. Una composición que comprende aguas residuales hipersalinas con una concentración de NaCl de al menos el 6 % (p/v) hasta el 25 % (p/v) basada en el volumen total de las aguas residuales hipersalinas, al menos un contaminante seleccionado del grupo que consiste en nitrobenzeno, formiato, fenol, metilendianilina, en particular 4,4'-metilendianilina (MDA), y anilina, y células de *Haloferax mediterranei*, mientras que dichas aguas residuales hipersalinas proceden de la producción de diarilcarbonato, de la producción de policarbonatos o de la producción de diaminas y poliaminas de la serie del difenilmetano.
- 10

Fig. 1

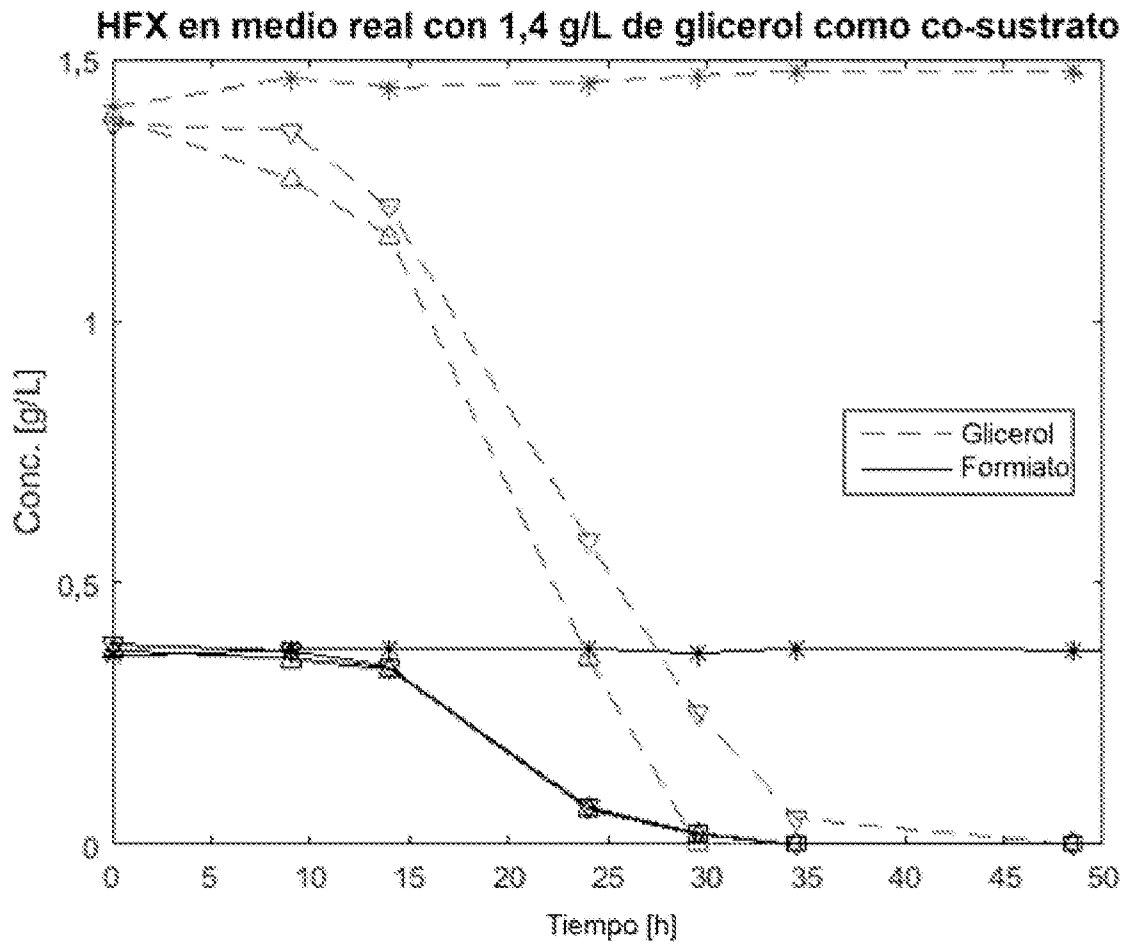
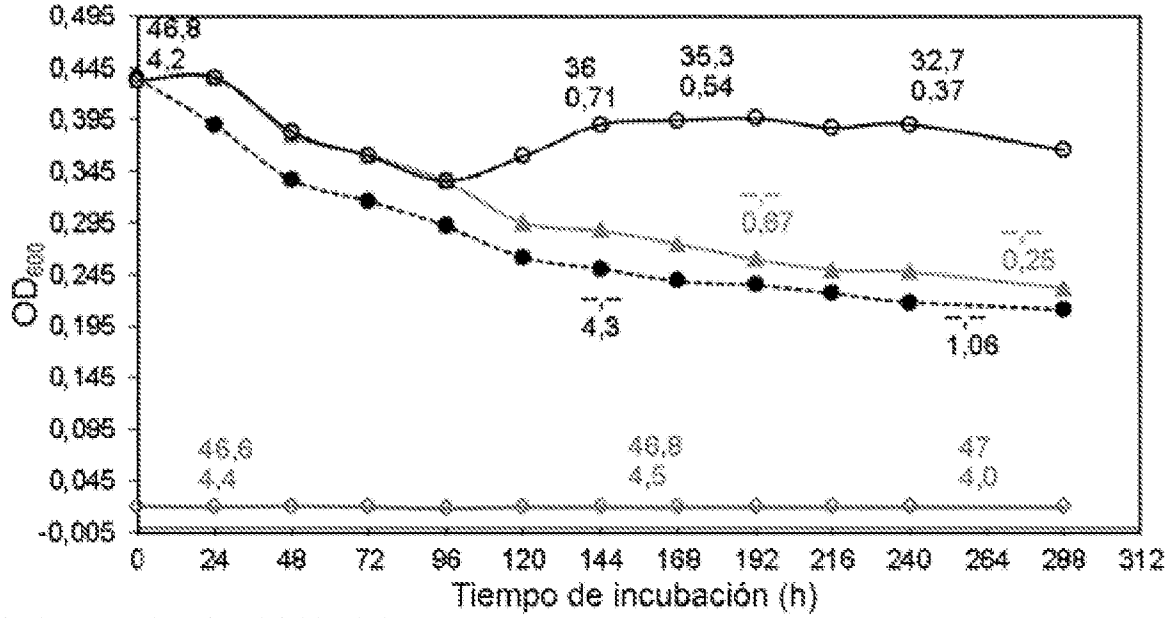


Fig. 2

Haloferax mediterranei en medio sintético, 15 % de NaCl



Valor superior: fenol Valor inferior: anilina

- 10 mg/l de anilina
- ▲--- 5 mg/l de anilina
- 50 mg/l de fenol, 5 mg/l de anilina
- ◇--- control, 50 mg/l de fenol y 5 mg/l de anilina

Fig. 3

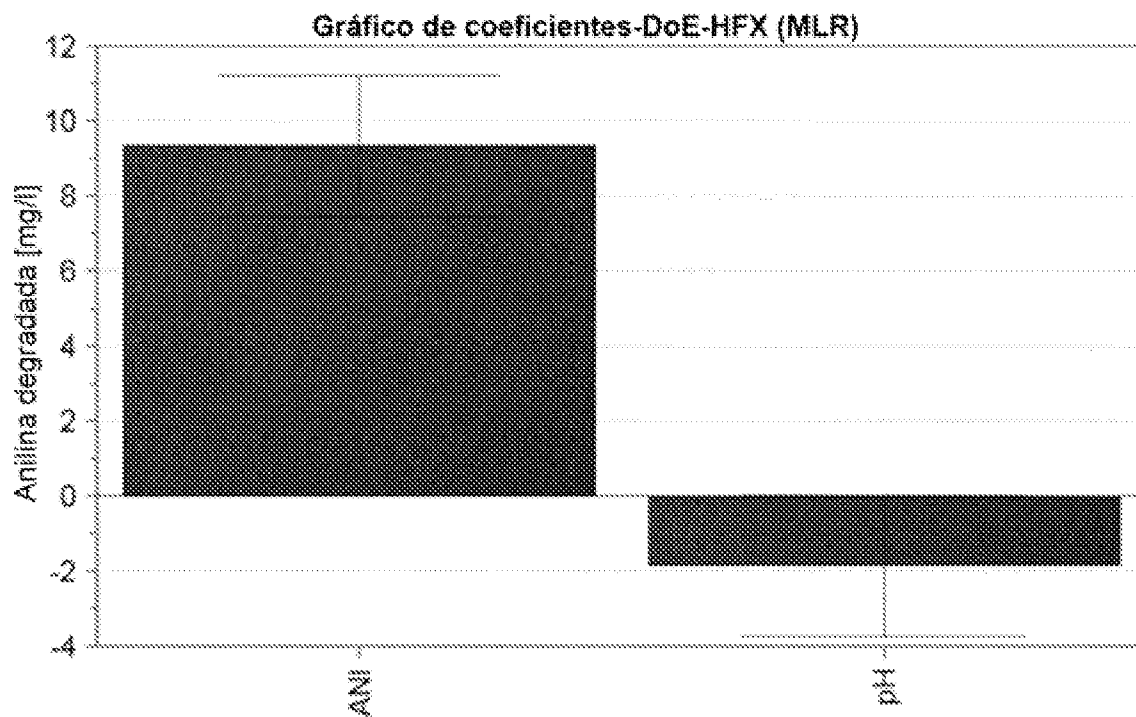


Fig. 4

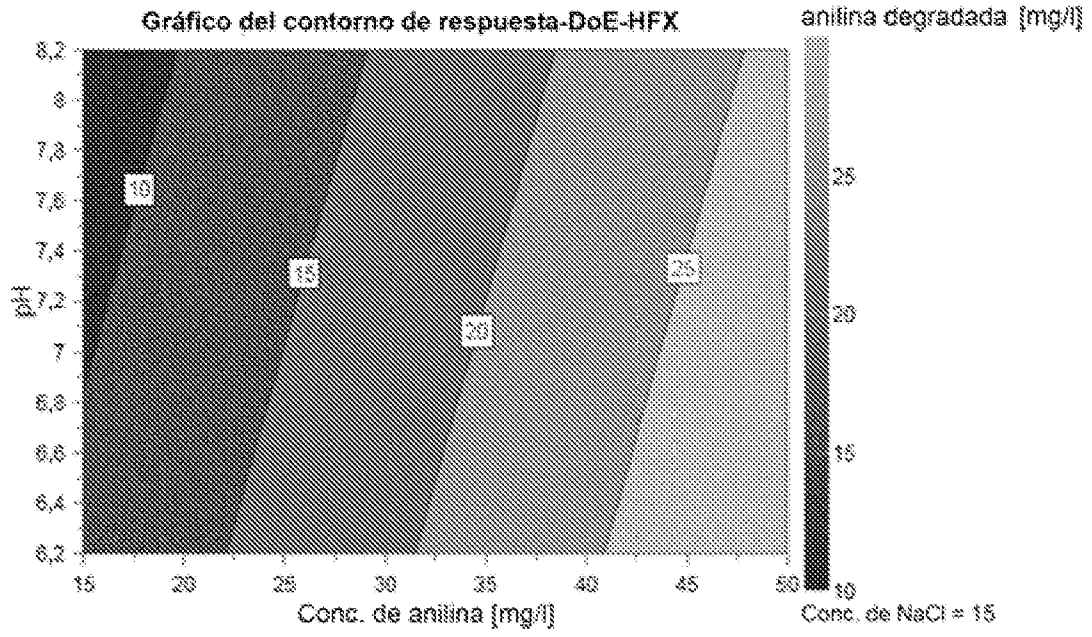


Fig. 5

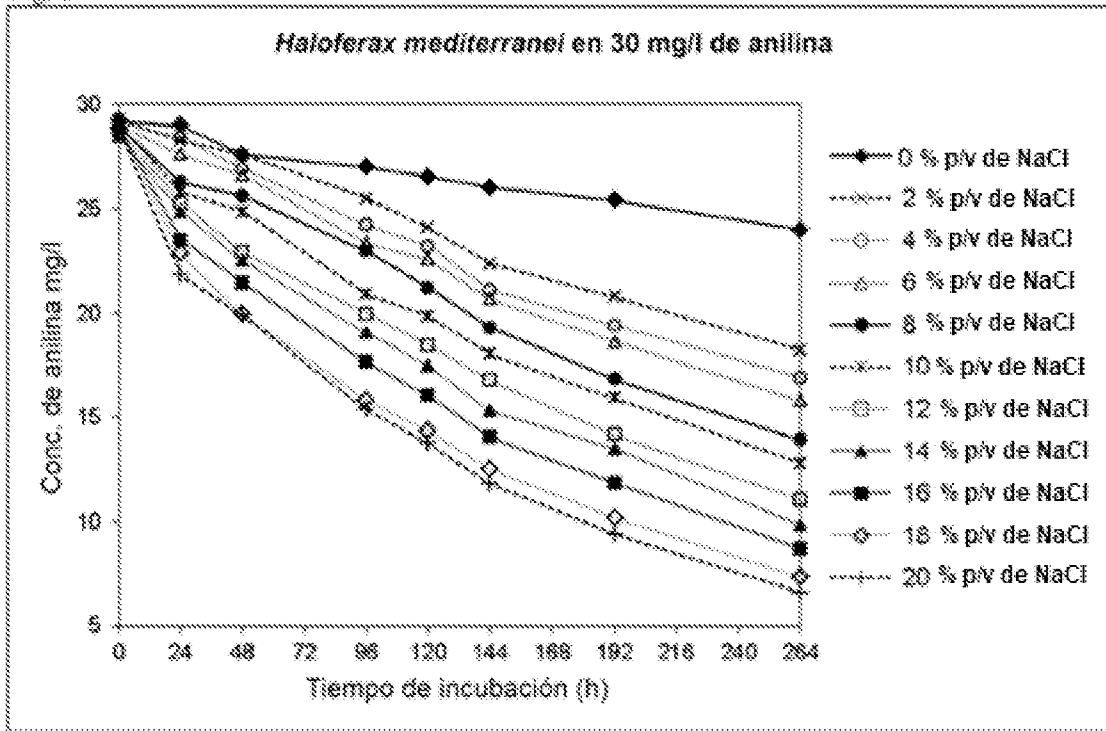


Fig. 6

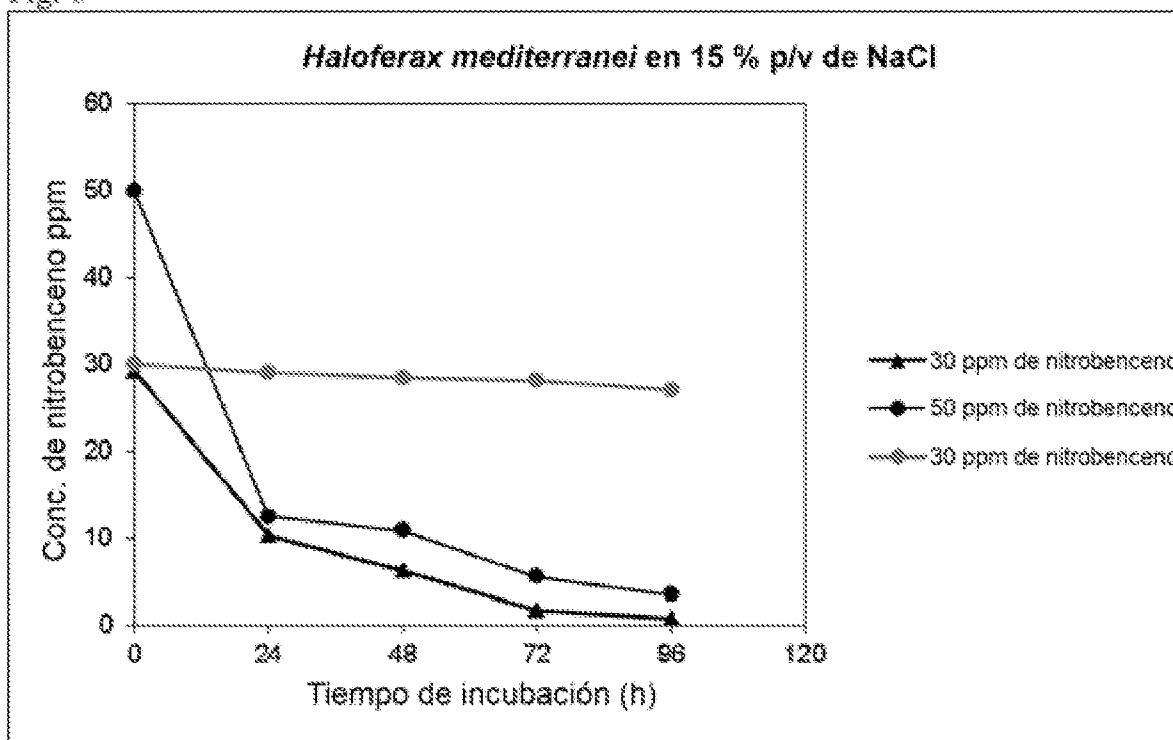


Fig. 7

