

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 843**

21 Número de solicitud: 201050002

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)

C02F 3/32 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

17.06.2008

30 Prioridad:

26.06.2007 IT MI2007A001278

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.01.2012

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

05.10.2012

Fecha de la concesión:

29.04.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

13.05.2013

73 Titular/es:

**ENI S.P.A.
PIAZZALE E. MATTEI 1
I-00144 ROMA IT**

72 Inventor/es:

**RISPOLI, Giacomo;
FIORAVANTI, Emiliano;
CAPUANO, Federico y
D'ADDARIO, Ezio**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, Marcelino

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS.**

57 Resumen:

Procedimiento para el cultivo de microalgas que comprende la plantación de una cepa de algas en un entorno acuoso y el procedimiento de crecimiento, bajo irradiación solar, mediante la alimentación continua de una corriente gaseosa constituida esencialmente por dióxido de carbono y una corriente de nutrientes a base de nitrógeno, constituida por agua residual de plantas industriales, procedente de procedimientos de tratamiento secundarios.

ES 2 371 843 B2

PROCEDIMIENTO PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS

DESCRIPCION

5

La presente invención se refiere a un procedimiento para el cultivo de microalgas.

Más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento para el cultivo de microalgas apropiado para su utilización en la producción de biomásas.

10

Todavía más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento para el cultivo de microalgas alimentado con agua industrial procedente de plantas petrolíferas, por ejemplo refinerías.

15

Son conocidos los estudios para el cultivo de algas y microalgas, ver, por ejemplo, W.J. Oswald, "Journal of Applied Phycology", 15, 99-106, 2003. Los cultivos de microalgas utilizan generalmente agua dulce o salada con la adición de nutrientes y sales minerales y, cuando resulta necesario, vitaminas, y son realizados en estanques abiertos que presentan unas amplias dimensiones, por ejemplo de 10 a 100 m de longitud y de 3 a 30 m de anchura, con una profundidad de 0,2 a 0,5 m, bajo irradiación solar. Además del agua, los estanques son alimentados con dióxido de carbono, almacenado, en forma gaseosa o líquida, en tanques específicos, u obtenido a partir de gases de escape del tratamiento industrial, por ejemplo, a partir de centrales eléctricas, posiblemente diluido con aire. La fase gaseosa se hace burbujear a través de la masa líquida, a través de conductos perforados sumergidos en el estanque de crecimiento, con el fin de presentar la máxima disponibilidad de CO₂ para las microalgas.

20

25

El cultivo de microalgas requiere pocos componentes esenciales que consisten en sales y sustancias a base de nitrógeno y fósforo, además de luz y CO₂ como se ha mencionado anteriormente. Las exigencias de nutrición mínimas pueden ser establecidas sobre la base de la fórmula empírica siguiente de la biomasa de las algas:

30



Los cultivos de algas requieren por lo tanto P y N en cantidades óptimas para crecer al ritmo necesario con el fin de mantener unas concentraciones de biomasa elevadas. Este principio puede ser aprovechado para la extracción de los compuestos fosforados o nitrogenados del agua residual industrial, siempre que los otros compuestos presentes en el agua no originen niveles de toxicidad que dificulten el crecimiento o la funcionalidad de la célula de algas.

El solicitante ha descubierto, como se describe con mayor detalle en las reivindicaciones adjuntas, que la utilización del agua industrial de las plantas petrolíferas, en particular refinerías, representa una fuente válida por lo menos de estos nutrientes nitrogenados. Se ha descubierto de hecho que el cultivo de microalgas en los sistemas de laboratorio se realiza con una productividad sustancialmente inalterada con respecto a las producciones tradicionales que adoptan las soluciones acuosas específicas de los nutrientes nitrogenados, utilizando, con este fin, el agua residual de las refinerías, por ejemplo.

Como es conocido, el agua residual civil e industrial experimenta un primer procedimiento de cribado que permite la separación del material contaminante de grandes dimensiones, tal como madera, plástico, papel, seguido por un tratamiento (primario) que comprende la sedimentación de los sólidos suspendidos gruesos y otros sólidos, seguido por un procedimiento de tratamiento (secundario) en el que se produce la oxidación biológica de los compuestos orgánicos que puede ser cuantificada generalmente mediante DBO (Demanda Biológica de Oxígeno) y DQO (Demanda Química de Oxígeno). En el flujo de estos dos tipos de tratamiento, el agua pasa a la fase de eliminación de nutrientes (compuestos fosforados y nitrogenados tratamiento terciario). Finalmente, antes de la ejecución, el procedimiento puede comprender un tratamiento de acabado (desinfección, etc.), en relación a la utilización final del agua.

Se ha descubierto que algo de agua industrial parcialmente purificada procedente del procedimiento de tratamiento secundario contiene una cantidad determinada de derivados de nitrógeno, generalmente a concentraciones comprendidas entre 0,1 y 0,5 mg/l, óptimas para utilizar este agua como fuente de nutriente nitrogenado para el cultivo de microalgas y para permitir su proliferación en este tipo de agua. Este resultado puede ser considerado sorprendente, puesto que este agua residual contiene, además de los nutrientes nitrogenados, otros

contaminantes, tales como cloruros, sulfatos, metales pesados, hidrocarburos, fenoles, etc., no siempre apropiados, e incluso tóxicos con respecto a muchas especies vivas.

Los nutrientes nitrogenados están generalmente presentes como NH_3 y derivados de amoníaco, por ejemplo como sales de amonio inorgánicas u orgánicas.

5 En la mayoría de casos, para el crecimiento del alga, resulta necesaria la integración del agua residual industrial con nutriente fosforoso, si no está presente en el agua residual industrial. En general, son introducidas soluciones de sales fosforosas solubles en agua, tales como fosfatos de metal alcalinotérreo o alcalino, por ejemplo fosfatos de magnesio, sodio, potasio, calcio o fosfatos de amonio.

10 Al término del crecimiento, con la asimilación y extracción consecuentes de los nutrientes (nitrógeno y fósforo), el agua residual es separada y puede ser vertida en los estanques de agua superficiales o sometida a acabado, permitiendo su reutilización de reciclado.

15 Se proporcionan a continuación dos ejemplos ilustrativos y no limitativos de la presente invención, demostrando el crecimiento de las dos especies de algas, una de agua dulce (*Scenedesmus sp.*) y una de agua salada (*Tetraselmis sk.*) sobre un efluente industrial.

20 Los experimentos siguientes se refieren a la caracterización de las cepas de microalgas en medios de cultivo no convencionales. Más específicamente, el medio de cultivo utilizado fue agua residual de una planta de tratamiento de residuos industriales.

El agua procedente de la unidad de tratamiento de residuos presenta las características siguientes:

Tabla 1- Características del agua residual industrial

	Método de análisis	Características
DCO (mg/l)	IRSA 5110	304,8
Nitrógeno total (mg/l)	Kjeldhal	30,47
Nitrógeno de amoníaco (mg/l)	IRSA CNR	29,3
Nitrógeno nítrico (mg/l)	Hach	Ausente
Conductividad (mS/cm)	IRSA 2030	9,79
pH ($-\log_{10}[\text{H}^+]$)	IRSA 2080	7,06
Sólidos suspendidos (mg/l)	IRSA 2050	99
Cloruros (Cl^-) (mg/l)	IRSA 4070 Método A	4.928
Sulfatos (SO_4^{2-}) (mg/l)	IRSA 4120 Método B	1.617

5 Las pruebas se realizaron en el laboratorio para comprobar la proliferación de
 algas en este medio de cultivo, utilizando los sistemas apropiados para el crecimiento
 (botellas de Roux) que consisten en recipientes de vidrio de tres litros cada uno. La
 10 agitación del cultivo fue garantizada mediante el gas (mezcla de CO_2 en aire al 2%)
 que fluye en el interior de las botellas. Estaban asimismo provistos de un sistema de
 refrigeración para impedir que la temperatura del cultivo excediera los 30°C . Cada
 unidad presentaba sensores para la medición de la temperatura y del pH.

La fuente de carbono para el crecimiento de las algas fue proporcionada
 directamente por el CO_2 que se introdujo en el medio de cultivo bajo el control del pH.

15 La energía radiante para permitir la fijación del carbono al cultivo mediante la
 reacción fotosintética fue proporcionada por un sistema de luz artificial (lámpara de
 halógeno con marca registrada JB, 100 vatios, dispuesto 50 cm con respecto a la
 botella de Roux), encendido durante 24 horas un día, con una intensidad lumínica de
 17.000 lux.

EJEMPLO 1- Cepa de agua dulce (*Scenedesmus sp.*)

Se utilizó la cepa de colección *Scenedesmus sp.* El inóculo que se debe introducir en los sistemas de cultivo se preparó como se expone a continuación:

5 - se descongeló una muestra de cultivo monoalgal, mantenida previamente a -85°C en una solución de glicerina al 10%, dejándola a temperatura ambiente, y se sometió a continuación a centrifugación para eliminar el sobrenadante.

 - la pasta celular así obtenida se inoculó en tres matraces de 250 ml que contenían 50 ml de la solución que contiene los nutrientes.

10 - el cultivo se desarrolló en una cámara climática iluminada a una temperatura constante de 30°C, en la presencia de 0,5% de CO₂ en el aire.

 - tras aproximadamente una semana, el matraz alcanzó una concentración de 0,3 g/l, este cultivo se utilizó como inóculo para los tres matraces de 1 litro, que contenían 500 ml de la solución que contiene los nutrientes y se dispuso en una
15 cámara climática.

 - tras 2 días el cultivo presentó una concentración de 0,5 g/l, formando este cultivo el inóculo de las tres botellas de Roux de litro utilizadas en la experimentación

El inóculo, preparado como se ha descrito anteriormente, se utiliza normalmente en las condiciones de la literatura (1) mencionadas a continuación:

20

Condiciones de crecimiento de la literatura

Inóculo: 10% por volumen en el medio M4N descrito a continuación:

Medio de cultivo tipo M4N:

25

KNO₃, 5,0 g/l;

KH₂PO₄, 1,25 g/l;

CaCl₂, 0,01 g/l;

FeSO₄·7H₂O 0,003 g/l;

MgSO₄·7H₂O 2,5 g/l;

30

Microelementos: 1 ml/l de la solución siguiente: 2,86 g de H₃BO₃, 1,81 g de MnCl₂·4H₂O, 80 mg de CuSO₄·5H₂O, 220 mg de ZnSO₄·7H₂O, 210 mg de Na₂MoO₄, 25 g de FeSO₄·7H₂O, 33,5 g de EDTA y 1 gota de H₂SO₄ concentrado por litro.

Agua: potable

pH de funcionamiento: 7,8

Se descubrió que estas condiciones pueden ser mejoradas en cuanto a pH de funcionamiento y medio de cultivo como se representa en los ejemplos siguientes. Las variaciones para las condiciones de crecimiento optimizadas son las siguientes:

- 5 Reducción en el contenido de KNO_3 de 5,0 a 1,5 g/l;
 adición de 0,1 g/l de K_2HPO_4 ;
 reducción en el contenido de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de 2,5 a 1,5 g/l;
 reducción en el pH de funcionamiento: de 7,8 a 7,0.

- 10 **Flujo de mezcla gaseoso:** 16 litros/hora.

Se prepararon los tres sistemas de cultivo para la presente experimentación con las condiciones de crecimiento siguiente:

Prueba 1 (condición estándar, control)

- 15 **Inóculo:** 10% por volumen preparado según se ha descrito anteriormente.

Medio de cultivo optimizado M4N:

- KNO_3 , 1,5 g/l;
 KH_2PO_4 , 1,25 g/l;
 20 K_2HPO_4 , 0,1 g/l;
 CaCl_2 , 0,01 g/l;
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,003 g/l;
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g/l;
 Microelementos: 1 ml/l de la solución siguiente: 2,86 g de H_3BO_3 , 1,81 g de
 25 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 80 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 220 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 210 mg de Na_2MoO_4 ,
 25 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 33,5 de EDTA y 1 gota de H_2SO_4 concentrado por litro.

Agua para la preparación del medio de cultivo: potable

pH de funcionamiento: 7,0

Flujo de mezcla gaseoso: 16 litros/hora.

Prueba 2 (prueba con agua residual + nutrientes)

Inóculo: 10% por volumen preparado como se ha descrito anteriormente.

Medio de cultivo: el agua procedente de la planta de tratamiento de agua industrial, aguas abajo del tratamiento secundario, con la composición indicada en la Tabla 1;

pH de funcionamiento: 7,0

Medio de cultivo optimizado M4N:

KNO₃, 1,5 g/l;
KH₂PO₄, 1,25 g/l;
K₂HPO₄, 0,1 g/l;
CaCl₂, 0,01 g/l;
FeSO₄·7H₂O, 0,003 g/l;
MgSO₄·7H₂O, 1,5 g/l;

Microelementos: 1 ml/l de la solución siguiente: 2,86 g de H₃BO₃, 1,81 g de MnCl₂·4H₂O, 80 mg de CuSO₄·5H₂O, 220 mg de ZnSO₄·7H₂O, 210 mg de Na₂MoO₄, 25 g de FeSO₄·7H₂O, 33,5 de EDTA y 1 gota de H₂SO₄ concentrado por litro.

Agua para la preparación del medio de cultivo: industrial (ver Tabla 1).

pH de funcionamiento: 7,0

Flujo de mezcla gaseoso: 16 litros/hora.

Prueba 3 (prueba con agua residual, sin nutrientes)

Inóculo: 10% en volumen preparado como se ha descrito anteriormente.

Medio de cultivo: no obtenido del exterior

pH de funcionamiento: 7,0.

Agua para la preparación del medio de cultivo: industrial (ver Tabla 1).

Flujo de mezcla gaseoso: 16 litros/hora.

Resultados de la experimentación

Las muestras de cultivo de las tres pruebas se recogieron y se sometieron a mediciones de densidad óptica mediante un espectrofotómetro Varian C 900 con el fin

de poder seguir la tendencia del crecimiento de las algas.

Además de estas mediciones, se realizaron asimismo mediciones de peso seco para determinar la concentración efectiva alcanzada por los cultivos. La tabla 2 resume los resultados obtenidos.

5

Tabla 2- Resumen de los resultados experimentales con *Scenedesmus*

Tiempo (horas)	0	5	20	50	Peso en seco tras 50 horas (g/l)
Densidad óptica a 750 nm Prueba 1 (medio estándar M4N)	0,415	0,570	1,55	3,35	0,835
Densidad óptica a 750 nm Prueba 2 (agua Gela + M4N)	0,670	0,830	1,5	2,54	0,925
Densidad óptica a 750 nm Prueba 3 (agua Gela)	0,510	0,620	1,33	2,16	0,58

10 A partir de estas mediciones, puede apreciarse claramente que la tasa de crecimiento y la concentración final del cultivo en el medio constituido por agua residual industrial son comparables con el crecimiento y la concentración final del cultivo de control. Esto demuestra por lo tanto que la cepa utilizada según la presente invención, en las condiciones de procedimiento mencionadas, puede asimismo ser cultivada en agua residual industrial con rendimientos en cuanto a la productividad comparables con los obtenidos utilizando las condiciones de cultivo de laboratorio típicas.

15

Debería destacarse que cuando se utiliza el agua residual sin nutrientes (Roux 3), la cinética de crecimiento es inferior con respecto a los otros dos casos examinados (Roux 1 y 2).

20

EJEMPLO 2: cepa de agua marina (*Tetraselmis su.*)

Se utilizó la cepa de colección *Tetraselmis su.* Se preparó el inóculo que se debía introducir en los sistemas de cultivo como se expone a continuación:

- una muestra de cultivo monoalgal, mantenido previamente a -85°C en una solución al 10% de glicerina, se descongeló dejándola a temperatura ambiente y a continuación se sometió a centrifugación para extraer el sobrenadante.

5 - la pasta celular así obtenida se inoculó en los tres matraces de 250 ml que contenían 50 ml de la solución que contiene los nutrientes.

- el cultivo se desarrolló en una cámara climática iluminada a una temperatura constante de 30°C , en presencia de 0,5% de CO_2 en el aire.

10 - tras aproximadamente una semana, el matraz alcanzó una concentración de 0,3 g/l, este cultivo se utilizó como inóculo para tres matraces de 1 litro, que contenían 500 ml de la solución que contenía los nutrientes y se dispuso en una cámara climática.

- tras 2 días el cultivo presentó una concentración de 0,5 g/l, formando este cultivo el inóculo de los sistemas de crecimiento de 3 litros utilizados en la experimentación.

15 El inóculo, preparado como se ha descrito anteriormente, se utiliza normalmente en las condiciones de la literatura (2) mencionadas a continuación:

Condiciones de crecimiento de la literatura

Inóculo: 10% por volumen en el medio F/2 descrito a continuación:

20 **Medio de cultivo F/2:**

NaNO_3 , 600 mg/l;

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 26,5 mg/l;

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 6,3 mg/l (Fe de 1,3 mg);

Na_2EDTA , 8,72 mg/l;

25 Vitaminas 0,5 ml de la solución siguiente:

Tiamina-HCl 0,2 g/l;

Biotina 1,0 mg/l;

B12 1,0 mg/l;

Microelementos: 0,5 ml/l de la solución siguiente:

30 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 19,6 mg/l (0,005 mg/l Cu);

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 44 mg/l (0,01 mg/l Zn);

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/l (0,005 mg/l Co);

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 360 mg/l (0,1 mg/l Mn);

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 12,6 mg/l (0,005 mg/l Mo);
Sales marinas para agua de mar (sintéticas) 33 g/l;
pH de funcionamiento: 7,8

Agua para la preparación del medio de cultivo: potable

5 Los tres sistemas de cultivo se prepararon para la presente experimentación, con las condiciones de crecimiento siguientes:

Prueba 1 (condición estándar, control)

10 **Inóculo:** 10% por volumen en el medio F/2 descrito anteriormente.
Medio de cultivo F/2.
pH de funcionamiento: 7,8.
Flujo de mezcla gaseoso: 16 litros/hora.
Agua para la preparación del medio de cultivo: potable.

15

Prueba 2 (prueba con agua residual + nutrientes, Roux 2)

Inóculo: 10% por volumen en el medio F/2 descrito anteriormente.
Medio de cultivo F/2.
20 **pH de funcionamiento:** 7,8
Flujo de mezcla gaseoso 16 litros/hora.
Agua para la preparación del medio de cultivo: industrial (ver tabla 1).

Prueba 3 (prueba con agua residual, sin nutrientes)

25

Inóculo: 10% por volumen en el medio F/2 descrito anteriormente.
Medio de cultivo: no obtenido del exterior
pH de funcionamiento: 7,8;
Flujo de mezcla gaseoso: 16 litros/hora.

30

Agua para la preparación del medio de cultivo: industrial (ver tabla 1).

Resultados de la experimentación

Las muestras de cultivo de las tres pruebas se recogieron y sometieron a las mediciones de densidad óptica mediante un espectrofotómetro Varian C 900 con el fin

de poder seguir la tendencia del crecimiento de las algas.

Además de estas mediciones, se realizaron asimismo mediciones de peso seco para determinar la concentración efectiva alcanzada por los cultivos. La tabla 3 resume los resultados obtenidos.

5

Tabla 3- Resumen de los resultados experimentales con *Tetraselmis*

Tiempo (horas)	0	5	20	50	Peso en seco tras 50 horas (g/l)
Densidad óptica a 750 nm Prueba 1 (medio estándar F/2)	0,310	0,460	1,32	2,85	0,761
Densidad óptica a 750 nm Prueba 2 (agua Gela + F/2)	0,530	0,720	1,5	2,64	0,821
Densidad óptica a 750 nm Prueba 3 (agua Gela)	0,470	0,580	1,31	2,06	0,58

10

Se pueden asimismo extraer las mismas conclusiones para la cepa marina que para la cepa de agua dulce. La cepa presenta la misma cinética de proliferación en el agua de mar y en el medio constituido por el agua residual industrial que contiene el medio de crecimiento F/2. Debería apreciarse que, en el caso del medio que está constituido por agua residual sola (prueba 3), la cinética de crecimiento es inferior con respecto a los otros dos casos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para el cultivo de microalgas que comprende la plantación de una cepa de algas en un entorno acuoso y el procedimiento de crecimiento, bajo irradiación solar, mediante la alimentación continua de una corriente gaseosa, constituida esencialmente por dióxido de carbono y una corriente acuosa de nutrientes a base de derivados de nitrógeno, constituida por agua residual de plantas industriales, que contienen dichos nutrientes, procedente de procedimientos de
- 10 tratamiento secundarios, en el que dichas plantas industriales son plantas petrolíferas o refinerías.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que las algas son seleccionadas de entre las algas clorófitas.
- 15 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las algas son clorófitas de las cepas de colección seleccionadas de entre *Tetraselmis suecica*, *Scenedesmus sp*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chlorella vulgaris*, o de las cepas autóctonas identificadas en la proximidad de la planta industrial.
- 20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el entorno acuoso está constituido por agua residual industrial con una salinidad de 1 g/l a 28 g/l.
- 25 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende alimentar además una segunda corriente acuosa de nutrientes que contiene sales de fósforo en solución en una concentración comprendida entre 0,01 y 0,05 g/l.
- 30 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el flujo gaseoso contiene de 6 a 100% por volumen de CO₂.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el

que el agua residual es agua de refinería.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201050002

②② Fecha de presentación de la solicitud: 17.06.2008

③② Fecha de prioridad: **26-06-2007**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N1/12** (2006.01)
C02F3/32 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SALAZAR, M. G. Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. ContactoS, 2006, vol. 59, páginas 64-70. Recuperado de Internet [en línea] [recuperado el 02.12.2011] <url: http://www.izt.uam.mx/contactos/n59ne/algas.pdf	1-8
X	MUÑOZ, R y GUIEYSSE, B. Algal-bacterial process for the treatment of hazardous contaminants: a review. Water research, 2006, vol. 40, páginas 2799-2815.	1-8
X	BENEMANN, J.R. Biofixation of CO ₂ and greenhouse gas abatement with microalgae-technology roadmap. Final report. Prepared for the U.S. Department of Energy National Energy Technology Laboratory. N° 7010000926. 2003. Recuperado de Internet [en línea] [recuperado el 02.12.2011] <url: http://moritz.botany.ut.ee/~olli/b/RepBenemann03.pdf	1-8
X	GONZÁLEZ, L.E. et al. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae <i>Chlorella vulgaris</i> and <i>Scenedesmus dimorphus</i> Bioresource Technology, 1997, vol. 60, páginas 259-262.	1-8
X	TERMINI, I. et al. Comparison of nutrients removal by free and immobilized cells of microalga <i>Scenedesmus quadricauda</i> T. Proceedings of First Mediterranean Congress Chemical Engineering for Environment. Vol. I pp. 444-449. 4-6 Octubre 2006. San Servolo Venice.	1-8
X	TAM N.F. y WONG, Y.S. Wastewater nutrient removal by <i>Chlorella pyrenoidosa</i> and <i>Scenedesmus</i> sp. Environmental pollution, 1989, vol. 58, páginas 19-34	1-8
X	FERRATO- CERRATO, R. et al. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. Revista Latinoamericana de Microbiología, 2006, vol. 48 (2), páginas 179-187.	1-8
A	GAMILA H.A. y IBRAHIM M.B.M Algal bioassay for evaluating the role of algae in bioremediation of crude oil: I-isolated strains. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 2004, vol. 73, página 883-889.	2-4,8
A	FÁBREGAS, J. et al. Effect of oil dispersant on growth and chlorophyll a content of the marine microalga <i>Tetraselmis suecica</i> . Applied and environmental microbiology, 1984, vol. 47 (2) páginas 445-447.	2-4,8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
02.12.2011

Examinador
A. I. Polo Díez

Página
1/5

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

C12N, C02F

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

INVENES, EPODOC, WPI, INTERNET, HCAPLUS, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.12.2011

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 2, 5-8

SI

Reivindicaciones 1, 3, 4

NO**Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones

SI

Reivindicaciones 1-8

NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SALAZAR, M. G.	2006
D02	MUÑOZ, R y GUIEYSSE, B.	2006
D03	FERRERA-CERRATO et al.	2006
D04	GAMILA E IBRAHIM	2004
D05	FÁBREGAS et al.	1984

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a un procedimiento de cultivo de microalgas que se realiza en un entorno acuoso, bajo irradiación solar, con alimentación continua de corriente gaseosa esencialmente de CO₂ y una corriente de nutrientes nitrogenados proveniente de tratamientos secundarios de aguas residuales obtenidas de plantas industriales.

Las reivindicaciones dependientes aportan detalles sobre el procedimiento como el tipo de aguas residuales utilizables, las algas idóneas, así como el rango más adecuado de determinados parámetros de cultivo.

Novedad (art. 6. 1)

En el estado de la técnica se han encontrado muchos documentos que divulgan la utilización de aguas residuales como fuente de nutrientes para el cultivo de microalgas. Entre ellos, se citan los documentos D1 y D2 por ser los más cercanos.

El documento D1 propone el cultivo de microalgas utilizando aguas residuales de cualquier tipo (doméstico, agrícola o industrial) como un sistema de tratamiento terciario de las mismas con el objetivo de eliminar nutrientes, metales pesados, así como capturar CO₂. Las microalgas que se citan como adecuadas se caracterizan por soportar elevadas concentraciones de nutrientes y ser capaces, en muchos casos, de eliminar los compuestos altamente tóxicos presentes en algunas aguas residuales industriales como, por ejemplo, metales pesados. Entre las microalgas seleccionadas se encuentran algunas del género *Chlorella* y *Scenedesmus*.

Este documento afecta a la novedad de las reivindicaciones 1, 3 y 4.

El documento D2 describe la utilización de cultivos de microalgas en fotobioreactores para tratar aguas residuales industriales que contienen contaminantes. En los fotobioreactores se introduce una corriente de aire enriquecida con CO₂. (ver figura 4) Las algas utilizadas pertenecen a los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*, entre otras.

Las reivindicaciones 1, 3 y 4 carecen de novedad a la luz de lo divulgado en D2.

Las reivindicaciones dependientes 2, 5 a 8 cumplen el requisito de novedad ya que sus características técnicas no han sido divulgadas en ningún documento del estado de la técnica.

Actividad inventiva (art. 8.1)

Sin embargo, se considera que las reivindicaciones 2, 5 a 7 no aportan características que en combinación con la reivindicación de la que dependen le otorguen actividad inventiva a la invención.

Las reivindicaciones dependientes 2 y 8 se refieren a que el agua residual para el cultivo proceda de una refinería o planta petrolífera.

En principio, y salvo indicación en contra, en los documentos citados D1 y D2 se mencionan las aguas industriales en general, incluyendo, por tanto, la posibilidad de utilizar cualquier agua residual industrial. Una vez que la idea de cultivar microalgas en aguas residuales ha sido divulgada en el estado de la técnica, la utilización del agua procedente de una u otra industria se hará en función de la problemática específica de esa agua, que dependerá tanto de su origen como del tratamiento concreto (tanto primario como secundario) al que ha sido sometida. En función de lo anterior, el agua a tratar tendrá una composición concreta (con unos contaminantes característicos, en unas concentraciones específicas) y los problemas que habrá que resolver serán encontrar el alga adecuada (capaz de sobrevivir y crecer en presencia de esos contaminantes) así como fijar los parámetros de cultivo pertinentes. En ese sentido, se hayan descrito varias microalgas capaces de crecer y eliminar productos tóxicos presentes en las manchas de petróleo (BTEx, hidrocarburos aromáticos policíclicos, fenoles) como son algunas especies de *Scenedesmus*, *Chlorella* y *Tetraselmis suecica* (ver documentos D2-D5) lo que induciría al experto a probar el cultivo de dichas algas con aguas relacionadas con la industria del petróleo, con una razonable expectativa de éxito.

De todas formas, y dado que en la descripción no se incluye ninguna forma de realización o ejemplo de cultivo de algas con aguas residuales de refinería ni se especifica ninguna característica que diferencie esta agua del resto de las aguas residuales industriales, se considera que el método utilizado en la reivindicación 1, utilizable con el agua residual de cualquier industria, también lo sería con las aguas residuales de refinería y, por tanto, cualquier experto en la materia podría llevarlo a cabo sin ejercer actividad inventiva.

En cuanto a las reivindicaciones 5 a 7, éstas se refieren a rangos de concentraciones de parámetros utilizados habitualmente en el cultivo de microalgas. En ausencia de un efecto técnico asociado a la utilización de dichos rangos, se considera que dicha utilización constituye una selección arbitraria que un experto en la materia realizaría sin ejercer esfuerzo inventivo y, por tanto, las reivindicaciones 5 a 7 carecen de actividad inventiva.