

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 995**

21 Número de solicitud: 201331156

51 Int. Cl.:

**B09C 1/02** (2006.01)

**B09C 1/10** (2006.01)

**B01D 11/02** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

**26.07.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**18.10.2013**

Fecha de la concesión:

**06.02.2014**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**13.02.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA (100.0%)  
Centro de Innovación e Transferencia de  
Tecnoloxía - Edf. Emprendia Campus Sur  
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**LEMA RODICIO, Juan Manuel ;  
MOREIRA VILAR, María Teresa ;  
FEIJOO COSTA, Gumersindo;  
ARCA RAMOS, Adriana y  
EIBES GONZÁLEZ, Gemma**

74 Agente/Representante:

**CAROU INSUA, Fernando**

54 Título: **Procedimiento de eliminación de contaminantes orgánicos hidrofóbicos de suelos contaminados usando un aceite vegetal**

57 Resumen:

Procedimiento de eliminación de contaminantes orgánicos hidrofóbicos de suelos contaminados usando un aceite vegetal. El suelo contaminado se excava y somete a un pretratamiento para homogeneizar el tamaño de partícula antes de llevar a cabo la extracción de los contaminantes por un aceite vegetal. Tras la etapa de extracción, el suelo y el aceite vegetal se separan por centrifugación y el aceite, con alta concentración de contaminantes orgánicos hidrofóbicos se introduce en un reactor enzimático bifásico, en el cual se añade una fase acuosa que contiene la enzima, del tipo oxidasa o peroxidasa y los cofactores necesarios para completar el ciclo catalítico de la enzima utilizada. En este reactor bifásico se produce la eliminación de los contaminantes presentes en el aceite mediante oxidación enzimática. Al terminar el tratamiento se lleva a cabo la separación de la fase acuosa y del aceite vegetal. El aceite vegetal libre de los contaminantes orgánicos hidrofóbicos se emplea para llevar a cabo una nueva extracción de suelo contaminado. La fase acuosa se retorna al reactor para ser reutilizada en un proceso de oxidación enzimática para regenerar un nuevo lote de aceite vegetal contaminado. El suelo tratado se devuelve a su emplazamiento original de acuerdo con las mejores técnicas disponibles.

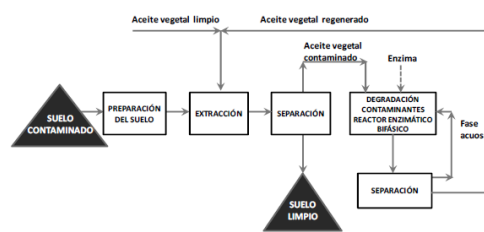


FIGURA 1

ES 2 425 995 B2

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de eliminación de contaminantes orgánicos hidrofóbicos de suelos contaminados usando un aceite vegetal.

### SECTOR DE LA TÉCNICA

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento de eliminación de contaminantes orgánicos hidrofóbicos tales como Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) y pesticidas presentes en suelos contaminados mediante la extracción con un aceite vegetal y la posterior descontaminación del aceite en un reactor enzimático bifásico, de tal forma que pueda ser reutilizado como agente extractante.

### 10 ESTADO DE LA TÉCNICA

- 15 Los compuestos orgánicos hidrofóbicos son aquellos que tienen una baja solubilidad en agua y gran afinidad por la materia orgánica presentando por tanto una elevada tendencia a adsorberse en suelos y sedimentos. Esto hace que no estén biodisponibles para ser biodegradados por microorganismos potencialmente capaces de hacerlo, mostrando una elevada persistencia en el ambiente. Muchos de estos son tóxicos y cancerígenos, y constituyen una amenaza para el medio ambiente y la salud humana. Se pueden destacar contaminantes del tipo de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) (por ejemplo naftaleno, antraceno, pireno, benzopireno, etc) o compuestos orgánicos halogenados, como plaguicidas (por ejemplo lindano, pentaclorofenol, dicloro difenil tricloroetano, etc). En relación con la contaminación de suelos, se han descrito diferentes procedimientos basados en tratamientos físico-químicos, térmicos o biológicos que tienen como objetivo final la recuperación o remediación de dichos suelos.

- 20 La extracción con disolventes orgánicos es una técnica de descontaminación *ex-situ* de tipo físico-químico y se ha propuesto como un método efectivo para la eliminación de compuestos hidrofóbicos en suelos. Sin embargo, el empleo de disolventes convencionales tales como alcanos, alcoholes, cetonas o alquilaminas conlleva riesgos de seguridad importantes así como la necesidad de implementar medidas costosas con la finalidad de reducir los posibles impactos ambientales asociados. El empleo de disoluciones acuosas con tensioactivos y ciclodextrinas también se ha propuesto como método de extracción de suelos contaminados con compuestos orgánicos hidrofóbicos. Sin embargo, estos han demostrado eficiencias de eliminación variables, como consecuencia de la adsorción de estos compuestos a la matriz del suelo lo que promueve su inmovilización en dicha matriz. Además, tras la etapa de extracción, la recuperación de dichas disoluciones es complicada y a menudo se recurre a su gestión como residuo (Yap C.L. et al., 2010; *J Hazard Mater* 177:28-41).

- 35 De forma alternativa, se ha planteado el uso de aceites vegetales para llevar a cabo la extracción de suelos contaminados con HAPs (Pannu J.K. et al., 2004; *Process Biochem* 39:1211-1216; Chi F.-H. et al., 2010; *Sustain Environ Res* 20:275-280; Gong Z. et al., 2005; *Chemosphere* 58:291-298). La eficiencia de extracción es comparable a la de los disolventes convencionales (>90%) y superior a la de las ciclodextrinas. Las principales ventajas que presenta el uso de aceites vegetales radican en su bajo coste, fácil manejabilidad, nula toxicidad y alta biodegradabilidad y capacidad de extracción. Al ser inmiscibles en agua, su separación es más sencilla cuando se aplican en sistemas aceite/agua/suelo. Sin embargo, dado el elevado volumen de aceite utilizado, es necesario plantear un tratamiento posterior del aceite de cara a su regeneración y reutilización.

- 45 Como posibles métodos para descontaminar el aceite tras el proceso de extracción se puede citar el empleo de carbón activo como adsorbente para eliminar los contaminantes (Gong Z. et al., 2007; *J Hazard Mater* 143:372-378). Sin embargo, esta estrategia implica la transferencia de los contaminantes entre fases, pero no su destrucción. Por tanto sería necesario un tratamiento adicional para regenerar el carbón activo. Berg y Mattiason (Berg Schuur J.H. y Mattiasson B., 2003; *Environ Technol* 24 755-765) emplearon con éxito columnas de poliestireno para la separación física de los HAPs presentes en un aceite de colza pero, de nuevo, la posterior regeneración de las columnas y el coste del poliestireno fueron aspectos negativos a tener en cuenta. Los métodos de destrucción de contaminantes hidrofóbicos basados en ozonización u oxidación catalítica sólo resultaron eficaces en el caso de un aceite vegetal con concentración de contaminantes inferiores a 10 mg/L (Gong Z. et al., 2007; *J Hazard Mater* 143:372-378). Considerando el tratamiento biológico como alternativa, en el proceso denominado "Fluid Extraction-Biological Degradation Process (FEBD)" desarrollado por el Institute of Gas Technology se propone un tratamiento biológico en reactor como etapa final para eliminar los contaminantes orgánicos de una mezcla monofásica metanol-agua.

- 60 Por otra parte, para el tratamiento biológico de contaminantes presentes en una fase orgánica inmisible en agua en determinados casos se ha planteado la configuración de un reactor bifásico. Los sistemas bifásicos se basan en el empleo de dos fases inmiscibles: la orgánica, en la que se encuentra el

contaminante en altas concentraciones; y la acuosa, que contiene el biocatalizador de la reacción. El contaminante se transfiere desde el disolvente hasta la fase acuosa en concentraciones determinadas por el coeficiente de reparto. A medida que se va produciendo la degradación del contaminante en la fase acuosa, éste se va transfiriendo desde la fase orgánica para restablecer el equilibrio termodinámico (Daugulis A.J. 1997; *Curr Opin Biotechnol* 8: 169-174) hasta que el disolvente queda libre del compuesto. Además, al final del proceso, este se puede separar de la fase acuosa, reutilizar para disolver una nueva carga de compuesto hidrofóbico y devolver al reactor. Guieysse *et al.* (Guieysse B. *et al.*, 2001; *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 796-802) demostraron el potencial de un reactor bifásico para la degradación de fenantreno y pireno por un cultivo mixto de *Pseudomonas* sp. y *Sphingomonas* sp. usando aceite de silicona como fase orgánica; Pudge *et al.* (Pudge I.B. *et al.*, 2003; *J. Biotechnol* 100:65-75) emplearon un reactor bifásico para degradar el explosivo RDX disuelto en 2-undecanona por *Enterobacter cloacae* ATCC 43560; Janikowski *et al.* (Janikowski T.B. *et al.*, 2002; *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 368-376) consiguieron degradar antraceno y otros HAPs en un reactor bifásico con *Sphingomonas aromaticivorans* y dodecano como fase orgánica.

La selección del biocatalizador en estos sistemas debe tener en cuenta el carácter recalcitrante de los contaminantes a eliminar. Los hongos ligninolíticos han sido ampliamente estudiados para la eliminación de compuestos xenobióticos debido a su alto potencial oxidativo. La capacidad de degradación de un compuesto tan complejo como la lignina ha hecho considerar estos hongos como una posible alternativa para la eliminación de otros muchos compuestos de baja biodegradabilidad (Lema J.M. *et al.*, 2002; *J. Biotechnol* 99(3): 249-257). Esta capacidad está asociada a la producción y secreción de un complejo enzimático extracelular de carácter no específico durante su metabolismo secundario. Las enzimas extracelulares secretadas por los hongos se clasifican fundamentalmente en dos tipos: oxidasas como lacasa (Lac) y peroxidasas como manganeso peroxidasa (MnP), lignino peroxidasa (LiP) y peroxidasa versátil (VP). La operación en sistemas “*in vitro*” frente al cultivo “*in vivo*” de microorganismos presenta numerosas ventajas:

i) se pueden mantener altas concentraciones de contaminantes en reactores enzimáticos con mínimos problemas de inhibición; ii) los periodos de operación son más cortos iii) la composición del medio es más simple que en cultivos microbianos; iv) el control del proceso es más sencillo; v) no se producen lodos; y vi) es posible trabajar en condiciones de no esterilidad.

Las peroxidasas son hemo-proteínas que requieren la presencia de peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones para llevar a cabo la oxidación de los sustratos. Presentan potenciales de oxidación de hasta 1,51 V.

La lignino peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.13) es capaz de oxidar tanto sustratos fenólicos como sustratos aromáticos no fenólicos siendo el alcohol veratrílico uno de los sustratos más comunes de la enzima. La manganeso peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.14) requiere del  $Mn^{2+}$  para cerrar su ciclo catalítico oxidándolo a  $Mn^{3+}$  ( $E_0$  1,54 V) el que actúa como agente difusible oxidando tanto las unidades fenólicas, como las no fenólicas a través de reacciones de peroxidación de lípidos. Con el fin de incrementar la estabilidad de los iones  $Mn^{3+}$  en la fase acuosa se adicionan ácidos orgánicos para formar el complejo  $Mn^{3+}$ -ácido orgánico ( $E_0$  0,9-1,2 V).

La peroxidasa versátil (VP, EC 1.11.1.16) combina las propiedades catalíticas de las dos enzimas anteriores, ya que oxida eficientemente compuestos no fenólicos de alto potencial redox, como el alcohol veratrílico (utilizado por la LiP) o  $Mn^{2+}$  (utilizado por la MnP) (Ruiz-Dueñas F.J. *et al.*, 2009 ; *J Exp Bot* 60(2):441-52). Además, oxida fenoles en ausencia de  $Mn^{2+}$ .

La capacidad de las peroxidasas para degradar compuestos poco solubles ha quedado demostrada en un gran número de trabajos. Como ejemplos se puede señalar que Davila-Vazquez *et al.* (Davila-Vazquez G. *et al.*, 2005; *Enzyme Microb Tech* 36:223-231) utilizaron la enzima VP para degradar los pesticidas halogenados bromoxinil, diclorofeno y pentaclorofenol; Covino *et al.* (Covino S. *et al.*, 2010; *Biores Technol* 101: 3004-3012) demostraron la capacidad de la enzima MnP de *Lentinus tigrinus* para degradar una mezcla de HAPs constituida por antraceno, benzopireno, pireno, fluoranteno y fenantreno; Eibes *et al.* (Eibes G. *et al.*, 2007; *Chemosphere* 66: 1744-1751) usaron la enzima MnP para degradar antraceno en un reactor enzimático bifásico empleando aceite de silicona como disolvente inmiscible.

Las lacasas (EC.1.10.3.2) corresponden a oxidasas multicobre que catalizan la oxidación monoelectrónica de sustratos fenólicos o aminas aromáticas, y los transforman en los correspondientes radicales con la consiguiente reducción del oxígeno molecular a agua. La baja especificidad de sustrato, el empleo de oxígeno como aceptor final de electrones (en lugar del  $H_2O_2$  utilizado por las peroxidasas) y la generación de agua como único subproducto de la reacción (Paice M.G. *et al.*, 1995; *J Pulp Paper Sci* 21: J280-J284), confieren a las lacasas una alta aplicabilidad en diversos procesos biotecnológicos. A pesar de que poseen un  $E_0$  máximo de 0,8 V, inferior al de las peroxidasas ligninolíticas, la presencia de sustratos de bajo peso molecular, denominados mediadores, permite la oxidación de un amplio rango de compuestos

fenólicos y no fenólicos (Morozova O. et al., 2007; *Appl Biochem Microbiol*, 43: 523-535; Cañas A.I. et al., 2009; *Biotechnol Adv*, 28: 694-705).

5 El ciclo catalítico de la lacasa en presencia del mediador es el siguiente: la enzima oxida al mediador y se forma el radical del mediador que es el responsable de llevar a cabo la oxidación del contaminante. La capacidad de la lacasa de *Trametes versicolor* para degradar el plaguicida pentaclorofenol en ausencia de mediadores (Ullah et al., 2000; *Appl Microbiol Biotechnol* 53:230-234) y el HAP antraceno en presencia de ácido 2, 2'-azino-bis(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y 1-hidroxibenzotriazol (HBT) (Johannes C. et al., 1996; *Appl Microbiol Biotechnol* 46:313-317) así como en presencia de mediadores naturales fenólicos (Cañas A.I. et al., 2007; *Environ Sci Technol* 41:2964-2971) ha sido demostrada en experimentos a escala de laboratorio. El sistema lacasa-HBT también ha resultado eficaz en un reactor bifásico para llevar a cabo la degradación de antraceno disuelto en aceite de silicona (Arca-Ramos A. et al., 2012; *Process Biochem* 47:1115-1121).

15 Por tanto, si bien los reactores bifásicos permiten el tratamiento biológico de algunos contaminantes orgánicos presentes en una fase inmisible en agua, su aplicación hasta la fecha se ha limitado a contaminantes concretos disueltos en una fase orgánica sencilla, de forma individual, pero no en fases orgánicas tras la extracción de contaminantes de sistemas complejos como los suelos, que pueden presentar una gran variedad de contaminantes y compuestos que pueden inhibir la acción de las enzimas que actúan posteriormente en el reactor. Tampoco están recogidas en el estado de la técnica fases orgánicas que hayan demostrado reunir los requisitos deseables para su aplicación a escala real: medioambientalmente favorables, alta capacidad de extracción, adecuadas para el sistema bifásico, no agresivas con la enzima y estables a lo largo de varios usos en el reactor.

25 Por otra parte, aunque a escala de laboratorio se ha planteado el uso de aceites vegetales para llevar a cabo la extracción de suelos contaminados con HAPs, hasta la fecha los procedimientos empleados tan sólo son capaces de transferir los contaminantes desde el suelo al aceite, no de degradarlos o eliminarlos, utilizando volúmenes elevados de aceite, por lo que siempre es necesario plantear un tratamiento posterior del mismo para transferir el contaminante a otra fase de cara a su regeneración y reutilización, lo cual genera un residuo adicional y encarece de forma global el proceso, haciendo inviable la aplicación de esta alternativa a escala industrial. Por tanto, existe en el estado de la técnica una necesidad de encontrar sistemas alternativos que permitan la descontaminación de suelos con altas concentraciones de contaminantes hidrofóbicos, que empleen materiales ambientalmente favorables para la extracción de los contaminantes, que eliminen y no simplemente transfieran los contaminantes de un fase a otra, de modo que no necesiten un posterior tratamiento de descontaminación por separado, y que permitan la reutilización de esta fase en ulteriores procesos, de forma que no se generen residuos adicionales y el proceso global sea más sostenible ambientalmente.

#### 40 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención plantea el empleo de un reactor enzimático bifásico para llevar a cabo la regeneración de un aceite vegetal utilizado como agente de extracción de suelos contaminados con contaminantes hidrofóbicos. De este modo, tras el tratamiento en el reactor bifásico se obtiene un aceite vegetal libre de contaminantes cuya reutilización para llevar a cabo un nuevo proceso de extracción resulta sencilla. Además, el tratamiento enzimático es un proceso relativamente rápido y además implica la degradación de los contaminantes presentes en el aceite, en contraposición con los sistemas que consideran una separación física donde el contaminante se transfiere de una fase a otra (por ejemplo carbón activo o poliestireno) que necesita tratamiento posterior.

50 La presente invención describe un procedimiento de eliminación de contaminantes orgánicos hidrofóbicos de suelos contaminados que comprende las etapas (Figura 1):

- I. Excavación y preparación del suelo contaminado
- II. Extracción del suelo usando un aceite vegetal
- 55 III. Separación del suelo y del aceite vegetal
- IV. Regeneración del aceite vegetal contaminado mediante oxidación enzimática de los contaminantes en un reactor enzimático bifásico
- V. Separación del aceite vegetal libre de contaminantes y de la fase acuosa.

60 Los compuestos hidrofóbicos son aquellos que presentan una baja solubilidad en agua y gran afinidad por la materia orgánica presentando una elevada tendencia a adsorberse en suelos y sedimentos. Esto hace que no estén biodisponibles para ser biodegradados por microorganismos potencialmente capaces de hacerlo, por lo que su persistencia en el medio ambiente es elevada. Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) y muchos pesticidas son ejemplos de compuestos hidrofóbicos presentes en suelos contaminados.

El procedimiento propuesto para llevar a cabo la extracción sería *ex situ*, recurriendo a la excavación del suelo y posterior tratamiento fuera de la zona contaminada. En primer lugar el suelo contaminado con compuestos orgánicos hidrofóbicos tales como HAPs o pesticidas, se excava y se somete a un pretratamiento para reducir y uniformizar el tamaño de partícula hasta menos de 2 mm. Para ello puede ser requerido un proceso de molienda y posterior tamizado del suelo.

El suelo pretratado se traslada a un tanque extractor, con agitación, donde se lleva a cabo un proceso de extracción utilizando un aceite vegetal tal como aceite de oliva, de girasol, de orujo de oliva, de colza, etc., en una proporción comprendida entre 0,5:1 y 4:1 (L aceite:kg suelo); preferentemente en una proporción 1:1. Con la finalidad de incrementar la recuperación de los contaminantes del suelo pueden llevarse a cabo extracciones consecutivas con aceite vegetal limpio.

Tras la etapa de extracción, el suelo y el aceite vegetal se separan por centrifugación y el aceite, con alta concentración de contaminantes orgánicos hidrofóbicos se introduce en un reactor enzimático bifásico, en el cual se añade una fase acuosa que contiene la enzima, del tipo oxidasa o peroxidasa (Figura 2). En este reactor bifásico se va a producir la eliminación de los contaminantes presentes en el aceite mediante oxidación enzimática. Las dos fases contenidas en el reactor bifásico son la fase acuosa y el aceite vegetal y se mantienen agitadas a una velocidad comprendida entre 100 y 500 rpm para promover la formación de una emulsión. El volumen de aceite vegetal en el reactor bifásico estará entre el 5-50% del volumen total de la emulsión, preferentemente 10%.

En la presente invención se propone el empleo como biocatalizador de una enzima peroxidasa del tipo peroxidasa versátil, manganeso peroxidasa, lignino peroxidasa; o de una enzima oxidasa, tales como lacasa o tirosinasa, preferentemente una lacasa. Cuando se emplee una enzima lacasa la actividad enzimática en la fase acuosa deberá estar comprendida entre 100-2000 U/L medida de acuerdo al ensayo recogido por Arca-Ramos et al. (Arca-Ramos A. et al., 2012; *Process Biochem* 47:1115-1121); en el caso de utilizar una enzima peroxidasa la actividad enzimática estará comprendida entre 50-1000 U/L. Para determinar la actividad de la LiP se utiliza el ensayo descrito por Tien y Kirk (Tien M. y Kirk T.K., 1984; *Proc Natl Acad Sci USA* 81:2280-2284) y para determinar la actividad MnP o VP se emplea el ensayo utilizado por Taboada-Puig et al. (Taboada-Puig R. et al., 2011; *Biotechnol Prog* 27(3): 668-676). La temperatura de operación del reactor bifásico debe estar en el rango 15-40°C, preferentemente 30°C; y el pH debe estar comprendido entre 3-7; preferentemente pH 5 cuando se emplea la enzima lacasa y pH 4,5 cuando se emplea una enzima peroxidasa. La composición de la fase acuosa donde se añade la enzima es función del tipo de enzima utilizada. Cuando se emplee la enzima lacasa, deberá estar presente un compuesto denominado mediador (por ejemplo HBT, ABTS, ácido p-cumárico, ácido hidroxibenzoico, etc en concentración entre 0,1-5 mM) cuyo objetivo es incrementar el potencial de oxidación de la lacasa. Preferiblemente, el compuesto mediador de la lacasa es HBT. En el caso de utilizar una peroxidasa, deberá adicionarse peróxido de hidrógeno al medio, ácido orgánico dicarboxílico (por ejemplo ácido malónico u oxálico) en concentración 1-100 mM así como los cofactores necesarios para completar el ciclo catalítico de la peroxidasa que se utilice: alcohol veratrílico en concentración 10-10000 µM en el caso de la LiP y Mn<sup>+2</sup> en concentración 10-1000 µM en caso de usar la MnP o VP.

Independientemente del tipo de biocatalizador utilizado se propone la adición en la fase acuosa de un compuesto tensioactivo (por ejemplo Triton X 100, Tween 80, Tween 20, etc) en concentración superior a su concentración micelar crítica, con la finalidad de favorecer la transferencia de los contaminantes orgánicos hidrofóbicos desde el aceite vegetal hasta la fase acuosa e incrementar la solubilidad aparente de los contaminantes hidrofóbicos en la fase acuosa. La concentración micelar crítica es característica de cada surfactante y es la concentración mínima a partir de la cual las moléculas de surfactante que se adicionan a la disolución se unen formando micelas. De forma preferida, se emplea el tensioactivo no iónico Triton X-100 en proporción 1% v:v respecto al volumen de la fase acuosa.

Durante la operación del reactor bifásico deberá procederse a la medida periódica de la actividad enzimática en la fase acuosa y de la concentración de contaminantes presentes en la fase acuosa y en el aceite vegetal. Cuando la actividad enzimática sea inferior a 100 U/L cuando se usa una lacasa o inferior a 50 U/L cuando se usa una peroxidasa deberá procederse a la adición de enzima fresca al reactor mediante pulsos.

En el caso de utilizar la enzima lacasa deberá medirse la concentración de oxígeno en la emulsión mediante un sensor de oxígeno disuelto de tal modo que cuando la concentración del oxígeno disuelto descienda de 1 mg/L se procederá a la aireación u oxigenación mediante pulsos a través de un difusor. Estos pulsos tendrán la duración suficiente para que la concentración de oxígeno disuelto ascienda hasta por lo menos el 90% de la concentración de oxígeno correspondiente a la saturación. Además deberá adicionarse a la fase acuosa el mediador de la lacasa, preferentemente HBT con concentración 1 mM, mediante pulsos periódicos cada 8-12 h.

En el caso de utilizar una enzima peroxidasa deberá adicionarse de modo continuo el peróxido de hidrógeno al reactor bifásico con velocidad comprendida entre 5-100  $\mu\text{mol/L.R.}\text{min}$ .

5 En el momento en que la concentración de contaminante en el aceite vegetal sea inferior al 5% de la concentración inicial en dicho aceite se da por concluido el proceso de oxidación enzimática en el reactor bifásico y se detiene la agitación. Entonces se procede a la separación mediante decantación o centrifugación de las dos fases presentes en el reactor enzimático bifásico.

10 El aceite vegetal libre de los contaminantes orgánicos hidrofóbicos se emplea para llevar a cabo una nueva extracción de suelo contaminado.

La fase acuosa se retorna al reactor para ser reutilizada en un proceso de oxidación enzimática para regenerar un nuevo lote de aceite vegetal contaminado.

## 15 EJEMPLOS

### Ejemplo 1.

Extracción mediante aceite de orujo de oliva de suelo contaminado con antraceno, que es un HAP elegido como compuesto modelo debido a su baja solubilidad en agua (0,07 mg/L a 25°C). Extracción por el mismo aceite de orujo regenerado tras el tratamiento enzimático.

20 Para evaluar la capacidad extractiva del aceite de oliva de orujo se llevó a cabo una extracción de una fracción de suelo contaminado con antraceno y se midió la concentración de antraceno en dicho aceite vegetal al final del proceso de extracción por cromatografía líquida (HPLC). Paralelamente, y para comparar los resultados, se llevó a cabo un experimento de extracción idéntico pero utilizando acetonitrilo, que es un disolvente químico orgánico de alta capacidad extractiva. Por último, se evaluó la capacidad extractiva del aceite de oliva de orujo regenerado (tras haber eliminado el antraceno en el reactor enzimático bifásico), llevando a cabo la extracción de una nueva fracción de suelo contaminado con antraceno.

30 Se empleó un volumen de disolvente tal que la proporción volumen de disolvente: masa de suelo fue 1 L: 1 kg. Las extracciones se llevaron a cabo poniendo en contacto un volumen de disolvente (aceite de orujo o acetonitrilo) de 36 mL con una masa de suelo de 36 g (siendo la concentración inicial de antraceno en el suelo igual a 1004 mg/kg) en frascos de Teflon en un agitador de vaivén a 200 rpm durante 24 h. Al final del proceso de extracción se separaron por centrifugación el disolvente (aceite de orujo o acetonitrilo) y el suelo. La concentración de antraceno en el disolvente se midió por cromatografía líquida (HPLC) y la concentración de antraceno en el suelo tras la extracción se calculó mediante un balance de materia.

35 Utilizando aceite fresco, libre del HAP al inicio, tras la extracción se obtuvo un aceite con una concentración de antraceno de 864 mg/L correspondiente a la reducción del 86% de antraceno adsorbido en el suelo. Con el acetonitrilo esta reducción fue ligeramente superior, del 88,4%.

Cuando se empleó el aceite regenerado la eficiencia del proceso fue análoga a cuando se empleó aceite fresco, obteniéndose una reducción de antraceno adsorbido en el suelo del 85,2% (Figura 3).

40

### Ejemplo 2.

45 Extracción mediante aceite de oliva de orujo de suelo contaminado con antraceno, un HAP elegido como compuesto hidrofóbico modelo, en tres etapas sucesivas. Cada una de las extracciones se llevó a cabo poniendo en contacto un volumen de aceite con una masa de suelo contaminada con antraceno en proporción 1 L: 1 kg (volumen de aceite:masa de suelo) en frascos de Teflon en un agitador de vaivén a 200 rpm durante 24 h. Al final del proceso de extracción se separaron por centrifugación el aceite de orujo y el suelo. Se llevaron a cabo otras dos extracciones sucesivas de la misma fracción de suelo utilizando la misma proporción aceite:suelo (1L:1kg) en cada extracción. Se midió la concentración de antraceno en el aceite tras cada extracción por cromatografía líquida (HPLC). El porcentaje de eliminación de antraceno del suelo contaminado tras la tercera extracción fue superior al 90% con respecto a la concentración inicial (Figura 4).

50

### Ejemplo 3

Regeneración en un reactor enzimático bifásico del aceite de orujo utilizado en la extracción de suelo contaminado con antraceno.

5 El volumen de aceite de orujo a tratar fue de 15 mL, correspondiendo al 10% del volumen total de emulsión (150 mL). La concentración de antraceno en el aceite al inicio del proceso de oxidación en el reactor bifásico fue de 992 mg/L. La fase acuosa tuvo la siguiente composición: 100 mM tampón acetato de sodio (pH 5), 1% v:v de tensioactivo no iónico Triton X-100, actividad inicial lacasa de 1200 U/L, 1 mM de mediador HBT. El sistema se aireó mediante pulsos con un caudal de 0,2 L/min durante 1 min cada 15 min para asegurar una concentración de oxígeno disuelto en la emulsión superior a 1 mg/L. Asimismo, se adicionaron pulsos de mediador a las 8 h y 24 h con una concentración de 1 mM. La temperatura se mantuvo a 30°C y la velocidad de agitación fue de 250 rpm.

10 El grado de degradación se estableció mediante el seguimiento de la concentración de antraceno en las dos fases: orgánica y acuosa por cromatografía líquida (HPLC). Se monitorizó la actividad lacasa para conocer la desactivación enzimática. El reactor enzimático bifásico se operó durante 48 h, con el fin de asegurar la eliminación de antraceno en un porcentaje superior al 95%. A partir de un aceite de orujo con concentración de antraceno de 992 mg/L se obtuvo un aceite de orujo regenerado con 37 mg/L de antraceno, apto para llevar a cabo una nueva extracción de suelo contaminado (Figura 5).

15

#### **Ejemplo 4**

Regeneración en un reactor enzimático bifásico del aceite de orujo de oliva tras su empleo en sucesivas extracciones de suelo contaminado con antraceno reutilizando la fase acuosa.

20 El aceite de orujo con una concentración de antraceno de 947 mg/L tras la extracción de suelo contaminado se sometió al proceso de degradación del HAP en el reactor enzimático bifásico. El volumen de aceite de orujo fue igual al 10% del volumen total de la emulsión (300 mL). La fase acuosa tuvo la siguiente composición: 100 mM tampón acetato de sodio (pH 5), 1% v:v de tensioactivo no iónico Triton X-100, actividad inicial lacasa de 1200 U/L, 1 mM de mediador HBT. El sistema se aireó mediante pulsos con un caudal de 0,2 L/min durante 1 min cada 12 min para asegurar una concentración de oxígeno disuelto en la emulsión superior a 1 mg/L. Además, se adicionaron pulsos de mediador a las 8 h y 24 h con una concentración de 1 mM. La temperatura se mantuvo a 30°C y la velocidad de agitación fue de 300 rpm. Al final del proceso, de 48 h de duración, se separó el aceite vegetal de la fase acuosa y ésta se retornó al reactor enzimático bifásico para utilizarla en el siguiente proceso de oxidación enzimática. El aceite regenerado, con una concentración residual de antraceno igual a 32 mg/L, se contaminó de nuevo con antraceno y se retornó al reactor enzimático bifásico para llevar a cabo de nuevo el proceso de oxidación enzimática del contaminante, suplementando el medio de reacción con lacasa (1200 U/L) y mediador HBT (1 mM). Este procedimiento se realizó durante tres ciclos consecutivos. Se midió la actividad lacasa en la fase acuosa y la concentración de antraceno por HPLC en ambas fases en el reactor para calcular la concentración global en el reactor bifásico (Figura 6).

35 Las concentraciones de antraceno en el aceite de orujo al inicio y final de cada ciclo se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

| Ciclo | Antraceno en el aceite de orujo (mg/L) |      |
|-------|--|------|
|       | 0 h                                    | 48 h |
| 1º    | 947±39                                 | 32±4 |
| 2º    | 1080±58                                | ND*  |
| 3º    | 834±3                                  | ND*  |

\*ND: por debajo del límite de cuantificación

40

Los resultados mostraron la factibilidad de reutilizar el aceite en sucesivos procesos de extracción de suelos contaminados al ser posible eliminar el antraceno de forma efectiva en sucesivos ciclos en el reactor enzimático bifásico; así como la de reutilizar la fase acuosa en este reactor enzimático bifásico en sucesivos ciclos.

45

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

- 5 **Figura 1.** Diagrama esquemático del proceso global resultado de combinar la extracción de suelo con aceite vegetal y la regeneración del aceite en el reactor enzimático bifásico. El suelo contaminado se excava y puede ser requerido un pretratamiento para homogeneizar el tamaño de partícula. A continuación se pone en contacto con el aceite vegetal para llevar a cabo la extracción de los contaminantes orgánicos hidrofóbicos, tales como HAPs, presentes en el suelo.
- 10 El aceite vegetal y el suelo se separan y el aceite se conduce a un reactor enzimático bifásico para su regeneración mediante oxidación enzimática de los contaminantes que presenta en disolución. Al terminar el tratamiento se lleva a cabo la separación de la fase acuosa y del aceite vegetal. La primera se retorna al reactor enzimático bifásico mientras que el aceite se reutiliza en una nueva extracción de suelo contaminado. El suelo tratado se devuelve a su emplazamiento original de acuerdo con las Mejores Técnicas Disponibles.
- 15 **Figura 2.** Esquema del reactor enzimático bifásico para la degradación de contaminantes orgánicos hidrofóbicos. La fase orgánica (aceite vegetal), que presenta una elevada concentración de compuestos hidrofóbicos, está en contacto con la fase acuosa, donde la enzima (E) cataliza la conversión de los compuestos hidrofóbicos (S) que se van transfiriendo desde la fase orgánica en función del coeficiente de reparto originando productos (P).
- 20 **Figura 3.** Resultados de la extracción mediante aceite de orujo de oliva de suelo contaminado con el HAP antraceno. Se muestra la concentración de antraceno en el suelo antes y después de una etapa de extracción con aceite de orujo fresco, aceite de orujo regenerado en un reactor enzimático bifásico y acetonitrilo (disolvente químico de alta capacidad de extracción utilizado como referencia) con una proporción disolvente: suelo igual a 1 L: 1 kg
- 25 **Figura 4.** Concentración residual de antraceno en el suelo en tres etapas de extracción con aceite de orujo utilizando una proporción aceite vegetal: suelo igual a 1 L:1 kg.
- 30 **Figura 5.** Perfiles de concentración de antraceno en el aceite de orujo (●); concentración de antraceno en la fase acuosa (○) y perfil de actividad lacasa (▲) durante la regeneración en el reactor enzimático bifásico del aceite tras la extracción de suelo contaminado con antraceno.
- 35 **Figura 6.** Perfiles de concentración de antraceno (●) referido al volumen total de la emulsión y de actividad lacasa (▲) en los experimentos de reutilización de aceite y fase acuosa en ciclos sucesivos de degradación de antraceno en el reactor enzimático bifásico.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un procedimiento de eliminación de contaminantes orgánicos hidrofóbicos de suelos contaminados que comprende las etapas:
- 5 I. excavación y preparación del suelo contaminado;  
 II. extracción del suelo usando un aceite vegetal;  
 III. separación del suelo y del aceite vegetal;  
 IV. regeneración del aceite vegetal contaminado mediante oxidación enzimática de los  
 10 V. separación del aceite vegetal libre de contaminantes y de la fase acuosa.
- 2.- El procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa I el suelo contaminado con contaminantes orgánicos hidrofóbicos, se excava y se prepara sometiéndolo a un pretratamiento basado en molienda y tamizado para uniformizar el tamaño de partícula.
- 15 3.- El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque el suelo preparado se traslada a un tanque con agitación donde se lleva a cabo un proceso de extracción utilizando un aceite vegetal en una proporción comprendida entre 0,5:1 y 4:1 (L aceite:kg suelo).
- 20 4.- El procedimiento según la reivindicación 3, donde la proporción entre el aceite vegetal y el suelo es de 1:1.
- 5.- El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque, en la etapa III el suelo y el aceite vegetal se separan por centrifugación.
- 25 6.- El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque en la etapa IV el aceite vegetal separado del suelo y con alta concentración de contaminantes hidrofóbicos se introduce en un reactor enzimático bifásico, en el cual se añade una fase acuosa que contiene una enzima del tipo oxidasa o peroxidasa.
- 30 7.- El procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque la enzima de tipo oxidasa es una lacasa.
- 8.- El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, caracterizado porque las dos fases de fase acuosa y aceite vegetal se mantienen agitadas a una velocidad comprendida entre 100 y 500 rpm para formar una emulsión.
- 35 9.- El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado porque el volumen de aceite vegetal en el reactor enzimático bifásico constituye entre un 5%-50% del volumen total de la emulsión.
- 40 10.- El procedimiento según la reivindicación 9, donde el volumen de aceite vegetal en el reactor enzimático bifásico constituye un 10% del volumen total de la emulsión.
- 45 11.- El procedimiento, según la cualquiera de las reivindicaciones 6, 8, 9 ó 10, caracterizado por la utilización de una enzima peroxidasa con actividad comprendida entre 50-1000 U/L en la fase acuosa.
- 12.- El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, caracterizado por la utilización de lacasa, con actividad comprendida entre 100-2000 U/L en la fase acuosa.
- 50 13.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, caracterizado por la operación del reactor bifásico a temperatura en el rango 15-40°C, y pH comprendido entre 3-7.
- 55 14. El procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por la operación del reactor bifásico a temperatura de 30°C.
- 15.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, caracterizado por la operación del reactor bifásico a pH 5 cuando se emplea una oxidasa de tipo lacasa y a pH 4,5 cuando se emplea una peroxidasa.
- 60 16.- El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 15, caracterizado por la medida periódica de la actividad enzimática en la fase acuosa y de la concentración de contaminantes presentes en la fase acuosa y en el aceite vegetal.

- 17.- El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 16, caracterizado por la adición en la fase acuosa de un compuesto tensioactivo en concentración superior a su concentración micelar crítica.
- 5 18.- El procedimiento, según la reivindicación 17, caracterizado porque el compuesto tensioactivo que se añade en la fase acuosa es Triton X-100, en proporción 1% v:v respecto al volumen de la fase acuosa.
- 10 19.- El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 18, caracterizado por la adición de enzima fresca al reactor mediante pulsos cuando la actividad enzimática sea inferior a 100 U/L cuando se usa una oxidasa de tipo lacasa; o cuando sea inferior a 50 U/L cuando se usa una peroxidasa.
- 15 20.- El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 19, caracterizado por la medición del oxígeno en la emulsión mediante un sensor de oxígeno disuelto y por la aireación u oxigenación mediante pulsos a través de un difusor cuando la concentración del oxígeno disuelto descienda de 1 mg/L, cuando se emplee la enzima lacasa.
- 20 21.- El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 20, caracterizado por la adición en la fase acuosa de un compuesto mediador de la lacasa seleccionado del grupo que comprende: 1-hidroxibenzotriazol (HBT), ácido 2, 2'-azino-bis(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfónico) (ABTS), ácido p-cumárico y ácido hidroxibenzoico, con concentración entre 0.1-5 mM.
- 25 22.- El procedimiento según la reivindicación 21, donde el compuesto mediador de la lacasa es 1-hidroxibenzotriazol (HBT) con concentración 1 mM, y éste es añadido mediante pulsos periódicos cada 8-12 h.
- 30 23.- El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 19, caracterizado por la adición en continuo de peróxido de hidrógeno al reactor bifásico con velocidad comprendida entre 5-100  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$  cuando se usa una enzima peroxidasa.
- 35 24.-El procedimiento, según la reivindicación 23, caracterizado por la adición al reactor bifásico de:
  - un ácido orgánico dicarboxílico en concentración 1-100 mM, y
  - uno o varios cofactores necesarios para completar el ciclo de la peroxidasa, seleccionados de entre: alcohol veratrílico en concentración 10-10.000  $\mu\text{M}$  cuando la peroxidasa es una lignino peroxidasa y, y  $\text{Mn}^{+2}$  en concentración 10-1.000  $\mu\text{M}$  cuando la peroxidasa es una manganeso peroxidasa o una peroxidasa versátil.
- 40 25.- El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, caracterizado porque en la etapa V se realiza la separación mediante decantación o centrifugación de las dos fases presentes en el reactor enzimático bifásico, fase acuosa y aceite vegetal, cuando la concentración medida de contaminantes en el aceite vegetal es inferior al 5% de la concentración inicial en dicho aceite.
- 45 26.- Procedimiento según la reivindicación 25, caracterizado porque tras la separación del aceite vegetal de la fase acuosa, el aceite vegetal es reutilizado para llevar a cabo un nuevo procedimiento de eliminación de contaminantes orgánicos hidrofóbicos de suelos contaminados según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, y la fase acuosa es devuelta al reactor enzimático bifásico para ser reutilizada en un nuevo procedimiento de oxidación enzimática según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 25.
- 50 27.-El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, caracterizado porque el contaminante orgánico hidrofóbico presente en el suelo es uno o varios Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs).

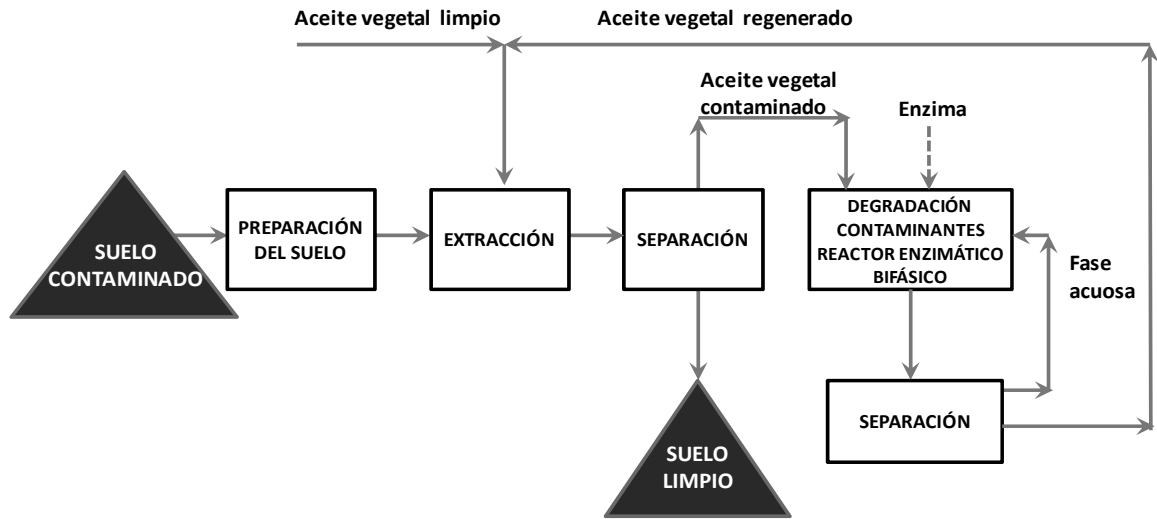


FIGURA 1

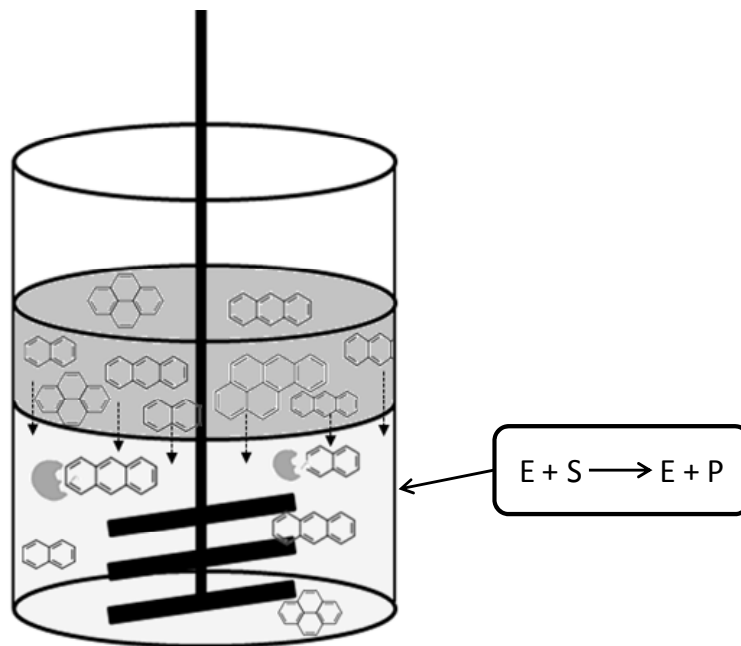


FIGURA 2

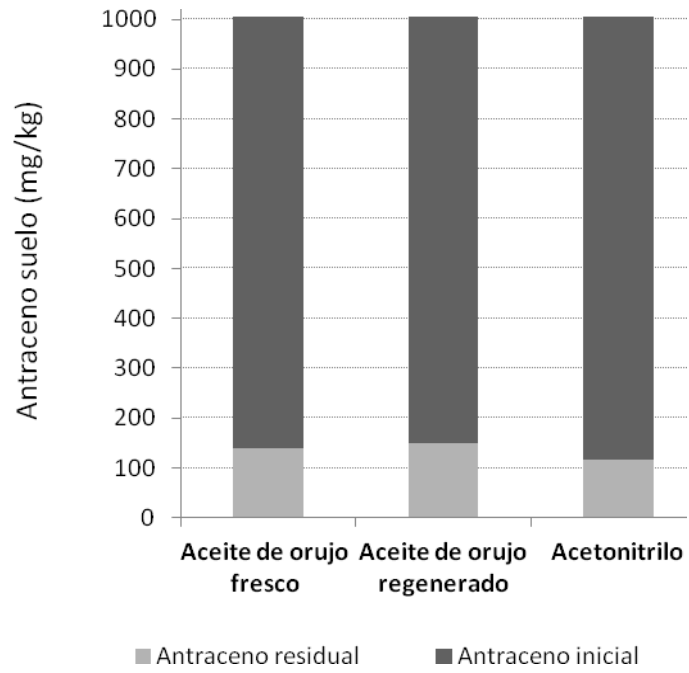


FIGURA 3

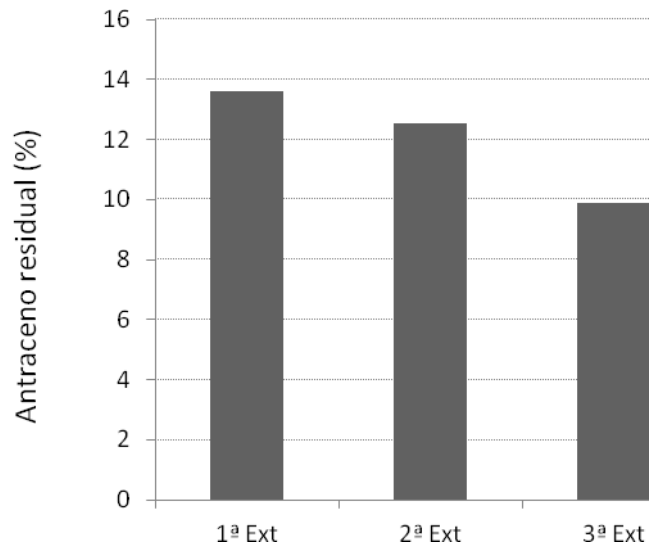


FIGURA 4

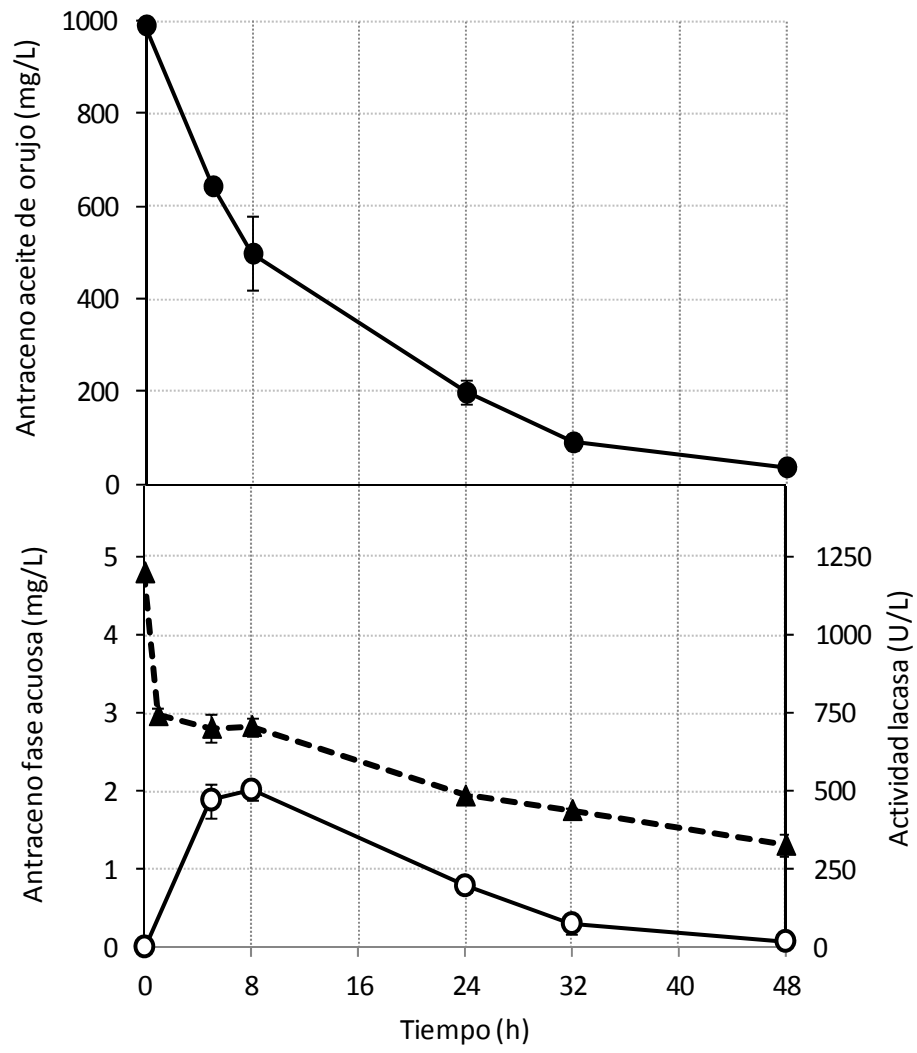


FIGURA 5

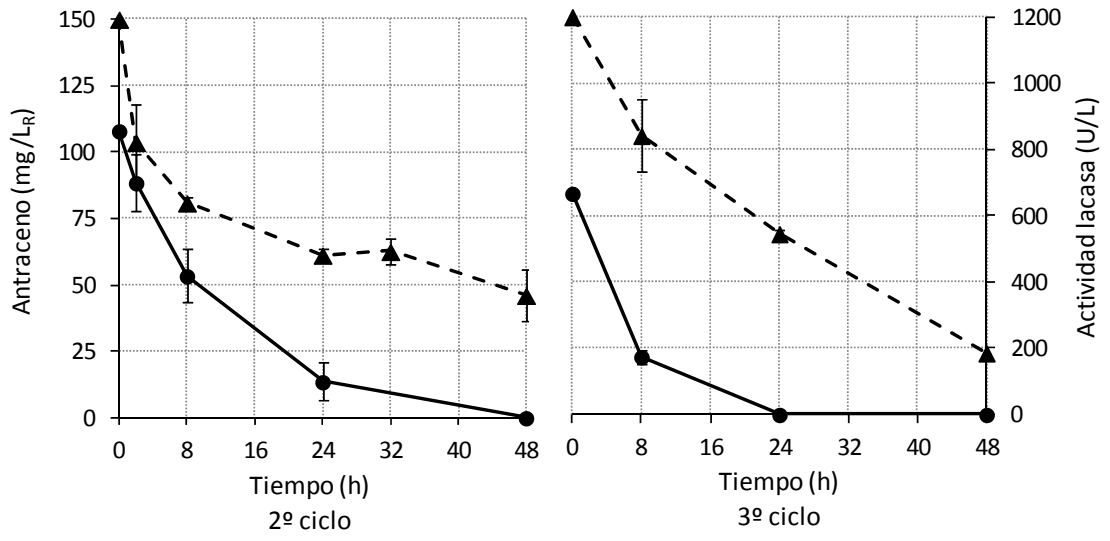


FIGURA 6



- ②① N.º solicitud: 201331156  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 26.07.2013  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados  | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| A         | EIBES, G. et al. Operation of a two-phase partitioning bioreactor for the oxidation of anthracene by the enzyme manganese peroxidase. <i>Chemosphere</i> . 08.12.2006. VOL: 66 No: 9 Págs: 1744-1751. ISSN 0045-6535. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.07.009.                    | 1-27                       |
| A         | ARCA-RAMOS, A. et al. Surfactant-assisted two phase partitioning bioreactors for laccase-catalyzed degradation of anthracene. <i>Process Biochemistry</i> . 01.04.2012. VOL: 47 No: 7 Págs: 1115-1121. ISSN 1359-5113. Doi: 10.1016/j.procbio.2012.04.002.                       | 1-27                       |
| A         | EIBES, G. et al. Study of mass transfer and biocatalyst stability for the enzymatic degradation of anthracene in a two-phase partitioning bioreactor. <i>Biochemical Engineering Journal</i> . 15.08.2010. VOL: 51. No: 1-2. Págs: 79-85 ISSN 1369-703X.                         | 1-27                       |
| A         | WANG, C. et al. PAHs biodegradation potential of indigenous consortia from agricultural soil and contaminated soil in two-liquid-phase bioreactor (TLPB). <i>Journal of Hazardous Materials</i> . 15.04.2010. VOL: 176. No: 1-3. Págs: 41-47. ISSN 0304-3894.                    | 1-27                       |
| A         | US 5833756 A (HAEGEL FRANZ-HUBERT et al.) 10.11.1998, todo el documento.   | 1-27                       |
| A         | US 5265674 A (FREDRICKSON JAMES K et al.) 30.11.1993, todo el documento.   | 1-27                       |
| A         | YAP, C.L. et al. Application of vegetable oils in the treatment of polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated soils. <i>Journal of Hazardous Materials</i> . 15.05.2010. VOL: 177. No: 1-3. Págs: 28-41. ISSN 0304-3894. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.11.078.                  | 1-27                       |
| A         | WANG, C. et al. Enzyme activities during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by white rot fungus <i>Phanerochaete chrysosporium</i> in soils. <i>Chemosphere</i> . 01.10.2009. VOL: 77. No: 6. Págs: 733-738. ISSN 0045-6535 Doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.08.028. | 1-27                       |
| A         | JP 2001047031 A (KUBOTA KK) 20.02.2001, resumen de la base de datos WPI. Recuperado de EPOQUE. Número de acceso: 2001-252111.  | 1-27                       |

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  
04.10.2013

Examinador  
E. M. Ulloa Calvo

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**B09C1/02** (2006.01)

**B09C1/10** (2006.01)

**B01D11/02** (2006.01)

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

B09C, B01D, 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,NPL, BIOSIS, INSPEC, COMPDX, XPESP, XPESP2, XPOAC, XPTK

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.10.2013

**Declaración**

|   |                       |           |
|---|-----------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 1-27 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones      | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones 1-27 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones      | <b>NO</b> |

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       | EIBES, G. et al.                          | 08.12.2006        |
| D02       | ARCA-RAMOS, A. et al.                     | 01.04.2012        |
| D03       | EIBES, G. et al.                          | 15.08.2010        |
| D04       | WANG, C. et al.                           | 15.04.2010        |
| D05       | US 5833756 A (HAEGEL FRANZ-HUBERT et al.) | 10.11.1998        |
| D06       | US 5265674 A (FREDRICKSON JAMES K et al.) | 30.11.1993        |
| D07       | YAP, C.L. et al.                          | 15.05.2010        |
| D08       | WANG, C. et al.                           | 01.10.2009        |
| D09       | JP 2001047031 A (KUBOTA KK)               | 20.02.2001        |

**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**

**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y 8.1 L.P.)**

La solicitud describe un procedimiento de eliminación de contaminantes orgánicos hidrofóbicos de suelos contaminados. La clave de la invención reside en emplear de forma conjunta una primera extracción de los contaminantes (ej. HAPs) ex-situ con aceite vegetal, y posteriormente una regeneración de ese aceite en un reactor enzimático bifásico con enzimas de tipo oxidasa o peroxidasa.

Los documentos más cercanos a la solicitud son aquellos que emplean la extracción previa con un aceite y posterior regeneración del mismo en un reactor enzimático bifásico. Este es el caso de los documentos D01, D02 y D03. Los tres documentos emplean aceite de silicona, y lo regeneran posteriormente con enzimas oxidasas o peroxidadas (MnP, LiP, lacasa o VP) en un reactor enzimático bifásico. No obstante, el aceite empleado no es un aceite vegetal, y las pruebas no se realizan sobre sistemas complejos (suelo contaminado) sino referidos a un PAH en concreto (antraceno).

Se han encontrado documentos de regeneración de suelos que engloban el uso de aceite en la extracción y posterior regeneración del mismo con microorganismos. Ejemplos de ello son los documentos D04 y D05.

Se han encontrado también documentos que emplean in-situ aceite vegetal y microorganismos, como por ejemplo el documento D06.

Ninguno de los documentos que emplean aceite vegetal ex-situ, tal como D07, lo regeneran posteriormente según el método de la invención.

El documento D08 corrobora que la acción remediadora de *Phanerochaete chrysosporium* para la degradación de PAHs en suelos se debe a las enzimas LiP y MnP secretadas por éste.

También está anticipado por el documento D09 el uso de una composición a base de enzimas de tipo oxidasa o peroxidasa (LiP, MnP, lacasa) para el tratamiento de suelos contaminados, sin tratar previamente con aceite.

La reivindicación independiente 1 no se ve anticipada por ninguno de estos documentos citados del estado de la técnica. Por tanto, y a la vista del estado de la técnica, la reivindicación 1 y sus dependientes 2-27 cumplen con el requisito de novedad y actividad inventiva.