(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 278 026**

(51) Int. Cl.:
C12N 1/20 (2006.01)
A23K 1/18 (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C12R 1/11 (2006.01)
C02F 3/34 (2006.01)
C12N 1/32 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **02731558 .9**
(86) Fecha de presentación : **26.04.2002**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1392218**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **03.03.2004**

(54) Título: **Degradador de ácidos grasos Gram-positivo.**

(30) Prioridad: **18.05.2001 US 861142**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2007

(73) Titular/es: **Novozymes A/S**
Krogshoejvej 36
2880 Bagsvaerd, DK

(72) Inventor/es: **Tisinger, Jessi, Lind;**
Paone, Domenic, A.;
Leder, Jonathan y
Drahos, David, J.

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Degradador de ácidos grasos Gram-positivo.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a identificar un organismo Gram-positivo que degrada grasas, aceites y mugre. Más particularmente, la presente invención se refiere a proporcionar una cepa bacteriana lipófila no patógena, Gram-positiva y formadora de esporas que produce lipasa extracelular y oxida o degrada también eficientemente los ácidos grasos y la mugre. La invención se refiere adicionalmente a formulaciones líquidas y secas que comprenden dicho organismo Gram-positivo y un método para mejorar la degradación de los ácidos grasos que emplea glicerol.

Antecedentes

La mayoría de los establecimientos de servicios alimentarios están obligados a contar con un dispositivo que evite que la mugre fluya directamente desde la cocina o área de preparación de alimentos al alcantarillado o a un sistema de evacuación de residuos *in situ*. Denominados comúnmente trampas de mugre, estos dispositivos funcionan para impedir físicamente que los aceites y la mugre fluyan directamente al alcantarillado sanitario y almacenar los sólidos de mugre separados para la evacuación final de los residuos sólidos.

Muchas autoridades municipales establecen restricciones y recargos basados en la demanda biológica de oxígeno (BOD) y los niveles de aceite y mugre (O&G) en los efluentes procedentes de las trampas de mugre. Además de costes y recargos por el tratamiento de las aguas residuales, los sólidos de mugre procedentes de las trampas deben retirarse y desecharse también periódicamente. El establecimiento de servicios alimentarios se enfrenta por tanto a dos cargas recurrentes para el tratamiento de las aguas residuales, por una parte un coste de tratamiento municipal y en segundo lugar un coste de evacuación de mugre.

Sin embargo, la frecuencia de bombeo de los sólidos de mugre acumulados puede ser muy variable, oscilando entre varias semanas y varios meses. Si las trampas no se limpian sobre una base regular, pueden producirse atascos de mugre haciendo que el agua residual retroceda al área de preparación de alimentos causando olores desagradables y obligando al cierre del establecimiento hasta que se corrige el problema. Además de proporcionar medios físicos para retener O&G, las trampas de mugre pueden funcionar para mediar biológicamente una reducción de la BOD y O&G en el líquido a granel, dando como resultado un agua residual efluente más limpia. Esta reducción de BOD y O&G depende del tiempo de retención hidráulico, que depende a su vez del tamaño de la trampa de mugre y el flujo de agua residual. Otros factores que afectan a la actividad biológica en una trampa de mugre incluyen pH, temperatura y que la instalación practique bioaumentación o no lo haga.

La bioaumentación, es decir la adición de productos bacterianos comerciales que aumentan la actividad biológica en el sistema, ha sido utilizada para reducir la BOD y O&G en los efluentes procedentes de trampas de mugre. Esto ha contribuido a reducir los recargos que deben pagar los establecimientos alimentarios a las autoridades municipales por los servicios de aguas residuales. Adicionalmente, la bioaumentación se ha utilizado para reducir la frecuencia de bombeo de las trampas de mugre, mantener las tuberías de desagüe abiertas y reducir los olores desagradables.

Además de trampas de mugre, se ha utilizado también la bioaumentación para ayudar a eliminar la mugre de los puntos de las estaciones elevadoras, tuberías de desagüe, fosas sépticas, instalaciones de tratamiento de residuos y otras situaciones en las cuales la acumulación de mugre puede causar problemas de flujo y olores desagradables.

Los productos de bioaumentación pueden ser líquidos o secos. Debido a la facilidad de manipulación, se prefieren generalmente productos líquidos, y los mismos pueden añadirse por medio de una bomba dosificadora de líquidos que aspira de un recipiente que se rellena sobre una base periódica. En cambio, se prefieren las formulaciones secas para otras aplicaciones tales como instalaciones de tratamiento de residuos.

Las cepas utilizadas en la bioaumentación de aplicaciones de mugre producen una enzima extracelular importante, lipasa. Esta enzima hidroliza y rompe el enlace éster entre la cadena principal del glicerol y los restos de ácidos grasos que constituyen la mugre. El glicerol se desecha rápidamente por biodegradación. En cambio, los ácidos grasos son difíciles de degradar y pueden persistir causando disminuciones de pH, atascos y olores desagradables.

Cuando se utilizan microorganismos Gram-negativos para bioaumentación en productos líquidos, aquéllos están presentes como células vegetativas y, como tales, pueden ser destruidos por productos químicos, tales como agentes tensioactivos y conservantes, que se utilizan a menudo en tales formulaciones. Por esta razón, los productos que contienen organismos Gram-negativos no pueden contener biocidas y agentes tensioactivos. Entonces, los productos líquidos no conservados pueden desarrollar olores desagradables severos procedentes de los contaminantes microbianos que crecen en el producto. Algunos de estos contaminantes pueden ser indeseables en un entorno de servicios alimentarios. Adicionalmente, los productos no conservados pueden adolecer también de vida útil y eficacia reducidas. Evidentemente, si bien los microorganismos Gram-negativos presentan ventaja en la degrada-

ción de los ácidos grasos, su uso en los productos de servicios residenciales y alimentarios presenta serios inconvenientes.

Los productos Gram-negativos secos, por otra parte, son de hecho ventajosos en el sentido de una vida útil mejorada sobre las formulaciones Gram-negativas líquidas. Sin embargo, esta ventaja es moderada y varía significativamente de una cepa bacteriana a otra en el producto. Aunque los productos secos pueden rehidratarse con agua y aplicarse como productos líquidos, las desventajas de la utilización de productos líquidos no conservados que contienen microorganismos Gram-negativos serán todavía aplicables a los materiales secos rehidratados.

Se sabe que muchos microorganismos Gram-negativos tienen capacidad para biodegradar los ácidos grasos generados por la acción de la lipasa. Esta capacidad de oxidar y degradar los ácidos grasos no se encuentra generalmente en los microorganismos Gram-positivos, formadores de esporas, específicamente miembros del *Bacillus*.

De acuerdo con ello, existe necesidad de desarrollar formulaciones de bioaumentación que puedan degradar u oxidar eficaz y eficientemente las grasas, el aceite y la mugre sin causar olores desagradables u otras condiciones indeseables, tal como ocurre con los organismos Gram-negativos.

Específicamente, existe necesidad de encontrar una cepa bacteriana lipófila no patógena, Gram-positiva y formadora de esporas que produzca lipasa extracelular y oxide o descomponga eficientemente los ácidos grasos y la mugre. Hasta ahora, no ha sido identificado o producido un organismo Gram-positivo de este tipo y una formulación que contenga el mismo.

Si se identifican microorganismos degradantes de los ácidos grasos, existe una necesidad adicional de aumentar o mejorar la actividad degradante de los ácidos grasos de tales microorganismos a fin de maximizar la eficacia de los productos basados en ellos.

El documento DE 198 50 012 describe un agente de purificación de residuos sobre una base biológica que comprende esporas de un microorganismo aerobio formador de esporas que expresa lipasa fijada a la membrana.

El documento US 6.162.635 da a conocer una nueva cepa de bacteria *Bacillus* que produce enzimas lipasa para la degradación de materiales oleaginosos tales como grasas, mugre y aceites de cocina, enzimas de la clase de las proteasas que degradan las proteínas y amilasas que descomponen el almidón. Específicamente, se ha determinado que esta cepa es la especie *B. subtilis*.

El documento EP-A 0 569 140 se refiere a una formulación líquida desatascadora de desagües que comprende una suspensión estable de micoorganismos viables, un agente tensioactivo, y un conservante, contenido todo ello en un medio acuoso y que tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 3 a 10.

Sumario de la invención

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar una cepa bacteriana lipófila no patógena, Gram-positiva y formadora de esporas que produce lipasa extracelular e hidroliza o degrada al mismo tiempo eficientemente los ácidos grasos y la mugre o una mezcla de ácidos grasos y mugre.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar composiciones líquidas y secas que comprenden una cepa bacteriana lipófila no patógena, Gram-positiva y formadora de esporas que produce lipasa extracelular e hidroliza o degrada eficientemente grasas, aceites y mugre.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para degradar los ácidos grasos y la mugre utilizando una cepa Gram-positiva que es una especie del género *Bacillus*.

Otro objeto adicional de la presente invención es mejorar la actividad biodegradante de una cepa Gram-positiva de *Bacillus megaterium ATCC* PT A-3142. Un objeto adicional de la invención es proporcionar un método para aumentar la actividad degradante de los ácidos grasos de *Bacillus megaterium ATCC PTA-3142*, que emplea glicerol como mejorador de la actividad.

Diversos otros objetos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de una descripción breve de los dibujos y la descripción detallada de la invención.

Ventajas adicionales y nuevas características de la invención se expondrán en parte en la descripción que sigue, y en parte resultarán más evidentes para los expertos en la técnica después del examen de lo que sigue o de las enseñanzas deducidas de la práctica de la invención.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos, Fig. 1 muestra la eficacia de diversos microorganismos para degradar la mugre, y Figs 2 a 7 muestran el efecto del glicerol sobre la actividad biodegradante de SB3112 y diversos microorganismos.

Descripción detallada de la invención

Lo que antecede y diversos otros objetos y ventajas de la presente invención se consiguen por un cultivo biológicamente puro de un microorganismo Gram-positivo, *Bacillus megaterium*, cepa SB3112, número de depósito ATCC PTA-3142, y una composición que comprende el mismo. El depósito se mantendrá en condiciones viables en la ATCC durante el plazo total de la patente expedida y estará disponible para cualquier persona o entidad para uso no comercial sin limitación, pero de acuerdo con las provisiones de la ley que administra el depósito.

Debe entenderse que, a no ser que se define de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que es entendido comúnmente por una persona con experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria pueden utilizarse en la práctica o la prueba de la presente invención, se prefieren los métodos y materiales descritos en esta memoria. A no ser que se mencione otra cosa, las técnicas empleadas o contempladas en esta memoria son metodologías estándar bien conocidas por una persona con experiencia ordinaria en la técnica. Los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no limitantes.

Los términos "biodegradación", "biodegradado", o "biodegradante", tal como se utilizan en esta memoria, significan que el sustrato es descompuesto, oxidado o degradado por el microorganismo. Y la expresión "mejora de la actividad", tal como se utiliza en esta memoria, significa que la actividad de biodegradación del microorganismo se incrementa por la presencia o adición de un componente particular, designándose dicho componente como "mejorador de la actividad", o "activador".

Por la utilización de un organismo Gram-positivo formador de esporas que puede oxidar los ácidos grasos, se pueden obtener las ventajas de un producto líquido mejorado conservado, y productos secos estables, fáciles de utilizar. Al contrario que los productos que contienen microorganismos Gram-negativos, el producto conservado que contiene microorganismos Gram-positivos basados en esporas, puede contener conservantes y agentes tensioactivos para favorecer la biodegradación de grasas, aceites y mugre, dado que las esporas son relativamente resistentes a biocidas y agentes tensioactivos. Adicionalmente, estos productos pueden contener también micronutrientes que promueven el crecimiento de los microorganismos. Así, un producto Gram-positivo que comprende microorganismos productores de lipasa, degradantes de los ácidos grasos y formadores de esporas en una formulación líquida conservada ofrece diversas ventajas que son requeridas para la degradación eficaz de aceite y mugre. Los productos secos se benefician también de la actividad de SB3112.

Los productos líquidos y secos formulados de acuerdo con la presente invención para trampas de mugre u otros usos similares en los que precisan ser degradados ácidos grasos o mugre, pueden contener también, además de agentes tensioactivos, biocidas, cantidades no tóxicas promotoras del crecimiento de nutrientes y micronutrientes inorgánicos, ciertos mejoradores de la actividad, estabilizadores, aumentadores de la viscosidad, enzimas, cargas, conservantes y análogos. La Tabla 1 enumera ejemplos de diversos componentes que puede contener una formulación líquida además de SB3112 de acuerdo con la presente invención.

Otras inclusiones en formulaciones tanto líquidas como secas se ilustran a continuación:

(A) Otros microorganismos pueden seleccionarse del grupo constituido por los géneros *Acinetobacter, Aspergillus, Azospirillum, Burkholderia, Bacillus, Ceriporiopsis, Enterobacter, Escherichia, Lactobacillus, Paenebacillus, Paracoccus, Pseudomonas, Rhodococcus, Syphingomonas, Streptococcus, Thiobacillus, Trichoderma, y Xanthomonas*.

(B) Dentro del género *Bacillus*, el microorganismo puede seleccionarse del grupo constituido por *Bacillus licheniformes, Bacillus subtilis, Bacillus amylolique-faciens, Bacillus laevolacticus, Bacillus pasteurii* y *Bacillus megaterium* distinto de la cepa SB3112, y una combinación de los mismos. El conservante se selecciona del grupo constituido por 1,2-bencisotiazolin-3-ona; 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona; 2-metil-4-isotiazolin-3-ona; quaternium-15, fenol; o-fenilfenato de sodio; o-fenilfenol; 6-acetoxi-2,4-dimetil-n-dioxano; clorhexidina; tris(hidroximetil)-nitrometano; hexahidro-1,3,5-tris(2-hidroxietil)-s-triazina; ácido p-hidroxibenzoico o sus ésteres metílico, etílico, propílico o butílico; ácido benzoico, ascórbico, cítrico, o sórbico; imidazolidinil-urea; diazolidinil-urea; dimetilol-dimetilhidantoína; metileno-bistiocianato; 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol; 1,2-bencisotiazolina-3-ona; antranilato de metilo y una mezcla de los mismos.

(C) El agente tensioactivo se selecciona del grupo constituido por trideceth-3; aducto con 3 moles de óxido de etileno de un alcohol lineal primario C12-14; aducto con 7 moles de óxido de etileno de un alcohol lineal primario C12-14; lauril-sulfato de sodio; lauril-sulfato de amonio; ácido dodecil-benceno- sulfónico; lauril-sulfato de amonio; xileno-sulfonato de sodio; lauril-sulfato de sodio; cocoamida-dietanolamina; óxido de lauramina; sodio-alfasulfo-metil-éster C12-18 y disodio-alfasulfo-sal de ácido graso C12-18; dodecilbenceno-sulfonato de sodio; alquil-poliglicosido; nonilfenoxipoli-(etilenooxi)-etanol, ramificado; nonilfenoxipoli(etilenooxi)-etanol, ramificado; alcohol lineal alcoxilado; mezcla de etoxilatos de alcoholes primarios lineales con 12-14 átomos de carbono; alquil-sulfato lineal; alcano-lamida; octilfenoxipolietoxietanol absorbido sobre carbonato de magnesio; dodecil-bencenosulfonato de sodio y alcohol isopropílico; POE-(6)-tridecil-alcohol; poli-(oxi-1,2-etanodiílo), alfa-(nonil-fenil)-omega-hidroxi, ramificado, u otros agentes tensioactivos conocidos en la técnica, y una mezcla de los mismos.

(D) Los nutrientes se seleccionan del grupo constituido por fosfato disódico, fosfato monosódico, tiosulfato de sodio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, sulfato ferroso, fosfato potásico, fosfato dipotásico, fosfato monocálcico, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, hierro en forma de quelato, cloruro de manganeso, molibdato de sodio, cloruro de cobalto, nitrato de sodio, levadura de panadería, extracto de levadura, peptona de soja, leche desnatada en polvo, extracto de carne de buey, sarsaponina, lactosuero, gelatina, y urea y otros conocidos en la técnica, y una mezcla de los mismos.

(E) Las cargas secas se seleccionan del grupo constituido por almidón, cloruro de sodio, glucosa, bicarbonato de sodio, carozos de maíz, salvado, y diversos granos molidos.

(F) Las enzimas se seleccionan del grupo constituido por proteasa, amilasa, lipasa y celulasa y otras conocidas en la técnica, y una mezcla de las mismas.

(G) Los intervalos (p/p) en los cuales pueden incluirse diversos componentes en la composición de producto seco de acuerdo con la presente invención son como sigue:

(i) SB3112 comprendido entre aproximadamente 1 x 10^5 y aproximadamente 5 x 10^{11} CFU (unidades formadoras de colonias)/g

(ii) glicerol comprendido entre aproximadamente 0 y aproximadamente 10%

(iii) agente tensioactivo comprendido entre 0 y 10%

(iv) enzimas comprendidas entre 0 y 1%

(v) conservante comprendido entre 0 y 1,0%

(vi) nutrientes comprendidos entre aproximadamente 0 y 20%

(vii) carga comprendida entre 0 y 95%

(H) Los intervalos (p/v) en los cuales pueden incluirse diversos componentes en la composición de producto líquida de acuerdo con la presente invención son como sigue:

(i) SB3112 comprendido entre aproximadamente 1 x 10^5 y aproximadamente 5 x 10^{11} CFU/ml

(ii) glicerol comprendido entre aproximadamente 0 y aproximadamente 10%

(iii) agente tensioactivo comprendido entre 0 y 10%

(iv) conservante comprendido entre 1 ppm y 1,0%

(v) colorante comprendido entre 0 y 1,0%

(vi) perfume comprendido entre 0 y 1,0%

(vii) aumentador de la viscosidad comprendido entre 0 y 5%

(viii) nutrientes comprendidos entre 0 y 20%

(ix) enzimas comprendidas entre 0 y 2%.

Superioridad de SB3112

A fin de demostrar la superioridad inesperadamente significativa de SB3112 sobre otras cepas de *Bacillus megaterium*, se realizó el estudio comparativo en paralelo siguiente utilizando otras 3 cepas de *Bacillus megaterium* que tenían las designaciones Cepa 1, Cepa 2 y Cepa 3. Como sustratos se utilizaron ácido esteárico (SA) y glicerol (G). La degradación del ácido esteárico se determinó por medida respirométrica estándar (consumo de oxígeno) y se utilizaron en todos los estudios técnicas estériles.

Se utilizó una unidad de respirómetro CES AER-200. Las botellas del respirómetro de 500 ml contenían medio de sal SSC_3 mínimo y MOPS 20 mM ajustado a pH 7,2. Las botellas del respirómetro se prepararon por adición de medio de sal mineral SSC_3 a cada botella. Este medio contenía los productos químicos siguientes por litro de agua: NH_4Cl 0,8 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 mg, Fe_2Na_2 ácido etileno-diamina-tetraacético, 15 mg; KH_2PO_4 3,06 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 28 μg; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 140 μg; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 84 μg; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 24 μg; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 25 μg; $NaMoO_4.2H_2O$, 24 μg. Se añadieron 4,28 g por litro del tampón, ácido 3-(N-morfolino)-propano-sulfónico (MOPS). El pH del medio se ajustó a 7,0 antes del tratamiento en autoclave. Las botellas que contenían el medio SSC_3 se trataron en autoclave durante 2 horas.

El sustrato diana, 1000 ppm de ácido esteárico (SA), se añadió como se indica más adelante. El SA se pesó y se añadió individualmente al reactor apropiado antes del tratamiento en autoclave. Se añadió glicerol, 500 ppmv, a todas las botellas. El glicerol se diluyó primeramente a 50% v/v con agua desionizada para reducir la viscosidad y se añadieron 0,5 ml a cada reactor antes del tratamiento en autoclave. Se utilizó como inóculo un cultivo puro de microorganismo. La densidad óptica (OD) de un cultivo nocturno en caldo de recuento de placas (PCB) se determinó a fin de estimar el recuento de bacterias. La dosis diana en cada reactor era 1 x 10^6 CFU/ml basada en la medida de la densidad óptica del cultivo de caldo. Después de la inoculación, se suspendió en la botella una trampa cáustica que contenía 5 ml de KOH al 30% para eliminar dióxido de carbono y la cápsula de membrana se aseguró herméticamente. Se realizaron cultivos de banda MacConkey sobre el inóculo antes de su uso a fin de asegurar la ausencia de contaminación Gram-negativa. Los cultivos de banda de las placas MacConkey y de agar de métodos estándar (SMA) se realizaron también con el contenido de cada botella al final del experimento (se utilizaron placas de agar MacConkey para detectar la contaminación Gram-negativa; se utilizaron placas SMA para las pruebas de cultivos puros).

Los tratamientos (por duplicado) fueron como sigue:

Glicerol + SB3112

Glicerol + Ácido esteárico + SB3112

Glicerol + Cepa 1

Glicerol + Ácido esteárico + Cepa 1

Glicerol + Cepa 2

Glicerol + Ácido esteárico + Cepa 2

Glicerol + Cepa 3

Glicerol + Ácido esteárico + Cepa 3.

Como se ha indicado arriba, todos los cultivos se ensayaron con ácido esteárico más glicerol. Se monitorizó también un control de glicerol exclusivamente para cada cepa individual.

Los valores para la fase de retardo de la degradación del ácido esteárico, la tasa de consumo de oxígeno, y el consumo total acumulado de oxígeno para cada cepa se presentan en la Tabla 2. Las tasas de consumo de oxígeno se calcularon utilizando un valor medio de tres puntos y se muestran los valores máximos. Los datos indican claramente resultados sorprendentes, que muestran que SB3112 es superior, demostrando así la actividad máxima sobre el ácido esteárico por tener la fase de retardo más corta, la tasa de consumo más rápida y el consumo de oxígeno acumulativo máximo, en comparación con todas las restantes cepas ensayadas.

Eficacia de SB3112 para la degradación de diversos ácidos grasos

Una vez determinada la superioridad de SB3112 en comparación con otras cepas de *Bacillus megaterium*, se realizó el estudio siguiente para determinar la eficacia de SB3112 para la degradación de los ácidos grasos. Para este propósito, se obtuvieron varios ácidos grasos (pureza 99% o mayor) de fuentes comerciales como se indica a continuación:

Ácido oleico, C-18:1

Ácido esteárico, C-18

Ácido palmítico, C-16

Ácido valérico, C-5

Ácido butírico, C-4

Ácido acético, C-2.

Se utilizó la actividad respirométrica (consumo de oxígeno) para medir la capacidad de SB3112 para degradar los ácidos grasos.

Se utilizó una unidad respirométrica CES AR-200 para monitorizar el consumo de oxígeno en botellas de 500 ml mantenidas a 25°C. Cada botella de 500 ml contenía medio de sal mínimo SSC_3 y tampón MOPS 20 mM (ajustado en pH a 7,2). Se añadió a todas las botellas glicerol, 500 ppmv. El glicerol se diluyó primeramente a 50% v/v con agua

desionizada para reducir la viscosidad y se añadieron 0,5 ml a cada reactor. Los ácidos grasos de peso molecular alto (C-16 y C-18) se pesaron individualmente y se añadieron a las botellas apropiadas a una concentración de 1000 mg/l excepto en el caso del ácido oleico, que se probó a 200 mg/l. Los ácidos grasos de peso molecular bajo (C-2, C-4 y C-5) se esterilizaron por filtración utilizando filtros resistentes a los productos químicos (0,2 μm) y se añadieron a las botellas apropiadas tratadas en autoclave para proporcionar una concentración de 1000 mg/l.

Se utilizó como inóculo un cultivo puro de SB3112. La densidad óptica (OD) de un cultivo nocturno en caldo de recuento de placas (PCB) se determinó a fin de estimar el recuento de bacterias. La dosis diana en cada reactor fue 1 x 10^6 CFU/ml basada en la medida de la densidad óptica del cultivo de caldo. Se realizaron cultivos de banda MacConkey en el inóculo en el momento de uso para detectar la contaminación Gram-negativa. Se utilizaron en todos los experimentos técnicas estériles.

Tratamientos (los números muestran valores triplicados como se indica a continuación)

1,2,3.	Control de glicerol sólo
4,5,6.	C-18
7,8,9.	C-16
10,11,12.	C-5
13,14,15.	C-4
16,17,18.	C-2
19,20,21.	C-18:1

(C representa la longitud de la cadena de carbonos).

Se realizaron cultivos de bandas de agar MacConkey y agar de métodos estándar (SMA) sobre el contenido de cada botella al final del experimento. Las placas de agar MacConkey se utilizaron para detectar la contaminación Gram-negativa. Las placas de SMA se utilizaron para ensayar el cultivo puro. No se detectó contaminación alguna.

La respuesta de consumo de oxígeno atribuida al ácido graso individual se calculó sustrayendo los datos de ácido graso más glicerol, a fin de observar la cantidad de consumo de oxígeno atribuida a la oxidación del ácido graso exclusivamente. El pH de cada reactor al final del experimento estaba comprendido en el intervalo de 6,8 a 7,2. Se realizaron cultivos de bandas de placas de Agar de Métodos Estándar (SMA) de cada botella. Todas las botellas exhibían morfologías de colonias simples sobre las placas SMA al final del experimento, indicando que se había conseguido la prueba de cultivo puro. Los cultivos de bandas MacConkey finales de todas las botellas eran negativos (ausencia de contaminación Gram-negativa).

La Tabla 3 muestra la actividad de SB3112 para la degradación de diversos ácidos grasos. Las tasas de consumo de oxígeno se calcularon utilizando una media móvil de tres puntos y el valor máximo se muestra en la tabla. Los resultados indican que SB3112 degrada (oxida) la totalidad de estos ácidos grasos (ácidos oleico, esteárico, palmítico, valérico, butírico y acético). Puede indicarse que los ácidos valérico y butírico son particularmente olorosos, y dado que SB3112 degrada estos compuestos, SB3112 puede ser útil para reducir los olores atribuibles a estos ácidos y ácidos grasos volátiles similares.

Eficacia de SB3112 para degradar la mugre

Se realizó el estudio siguiente para demostrar la eficacia de SB3112 para degradar la mugre.

Se prepararon botellas de respirómetro por adición de 250 ml de medio de sales minerales SSC_3 a cada botella. Se ajustó el pH del medio a 7,0 antes del tratamiento en autoclave. Las botellas que contenían el medio SSC_3 se trataron en autoclave durante 2 horas. Se trató en autoclave por separado mugre de residuos de cocina para destruir los microorganismos indeseables. Después del tratamiento en autoclave de la mugre, se añadieron 2 ml de la mugre estéril caliente a cada botella de respirómetro de 250 ml enfriada. El inóculo para las botellas del respirómetro era un cultivo de caldo nocturno (caldo de recuento de placas) de cada cepa, o la mezcla de microorganismos 9002. Cada botella se inoculó de modo que contuviera inicialmente $\approx$ 3 x 10^5 CFU/ml. Después de la inoculación, se suspendió una trampa cáustica que contenía 5 ml de KOH al 30% para eliminar el dióxido de carbono en la botella y se aseguró herméticamente la cápsula de membrana.

Para demostrar la superioridad de SB3112, se realizó un estudio comparativo utilizando otras dos muestras de inóculo. Así pues, los tres inóculos eran como sigue:

1. *Bacillus megaterium*, cepa SB3112.

2. Inóculo 9002, que representaba una mezcla de cuatro esporas (*Bacillus licheniformis, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus pasteurii, y Bacillus laevolacticus*) que producen las enzimas extracelulares lipasa, amilasa y proteasa. Se sabe que esta mezcla efectúa la degradación de los materiales residuales de cocina, pero no degrada los ácidos grasos.

3. Inóculo SB3012 y SB3013 que representaban una mezcla de microorganismos Gram-negativos conocidos por su aptitud para degradar los ácidos grasos.

Después de la inoculación, las botellas que contenían el medio SSC_3 mugre de residuos de cocina y el inóculo se pusieron en el baño de agua del respirómetro (23°C). Cada botella se conectó luego a un puerto del respirómetro. El consumo de oxígeno se monitorizó continuamente por medio el respirómetro.

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 1. Los datos indican que la mezcla de microorganismos Gram-negativos (SB3012 y SB3013) comenzó a consumir oxígeno casi inmediatamente a una tasa de 1,5 mg O_2/l/h. La mezcla de esporas 9002 comenzó también a consumir oxígeno en seguida, pero la tasa de 1,2 mg O_2/l/h era ligeramente menor que la de SB3012 y SB3013. La cepa SB3013 tenía un retardo de 50 h antes que comenzara el consumo de oxígeno a la tasa de 0,5 mg O_2/l/h. Al cabo de aproximadamente 180 h, SB3112 comenzó un aumento rápido en el consumo de oxígeno que sobrepasaba tanto a la mezcla de esporas 9002 como a la mezcla Gram-negativa. La tasa de consumo de oxígeno por SB3112 después de 180 h era 4,4 mg O_2/l/h comparada con 0,7 y 0,8 mg de O_2/l/h para SB3012 más SB3013 y 9002, respectivamente, durante el mismo periodo de tiempo. Los controles no inoculados no mostraban consumo alguno de oxígeno (datos no presentados).

Efecto del Glicerol Sobre la Actividad Biodegradante de SB3112

Como se muestra por el estudio siguiente, se descubrió que la presencia de glicerol aumenta la actividad biodegradante de SB3112.

Se obtuvo un cultivo de SB3112 a partir del cultivo inclinado retenido y se extendió sobre agar por el método estándar. Se seleccionó una colonia simple y se dejó crecer luego durante una noche en caldo estándar de recuento de placas. Sobre la base de la densidad óptica medida, se añadieron a cada reactor 1 x 10^6 CFU/ml (diana) de SB3112. Cada sustrato (ácido esteárico y glicerol) se añadió al recipiente de reacción antes del tratamiento en autoclave. El tamaño del reactor era 500 ml que contenía medio SSC_3 tratado en autoclave.

Tratamientos (por duplicado)

1,2. Ácido esteárico, 0,2%,

3,4. Ácido esteárico, 0,2% + 0,1% glicerol

5,6. Glicerol, 0,1%.

Se realizaron cultivos de bandas MacConkey finales para detectar cualquier contaminación Gram-negativa. No se encontró contaminación alguna. Los resultados se muestran en la Figura 2. Los datos indican claramente que la actividad degradante de los ácidos grasos de 5B3112 aumenta significativamente por la presencia o adición de glicerol.

Estudio Comparativo del Nivel de Glicerol sobre la Degradación de los Ácidos Grasos por Diversos Microorganismos

Se realizaron comparaciones de la actividad biodegradante de diversos microorganismos en función de diversos niveles de glicerol para demostrar el efecto del glicerol como activador. Se utilizaron ácidos grasos de cadena larga (LCFA) como sustratos diana y se utilizó una dilución acuosa en serie de glicerol (G) para determinar el intervalo de concentración eficaz de glicerol como activador. La medida de la degradación de LCFA se determinó por el consumo de oxígeno respirométrico y la tasa de actividad biodegradante de un microorganismo se indicó por la tasa de consumo de oxígeno, siendo los métodos y materiales empleados similares a los descritos anteriormente en esta memoria para diversos experimentos. Sin embargo, las características específicas de diversos estudios se han indicado para cada estudio expuesto más adelante. Las cepas de *Bacillus megaterium* se obtuvieron de la ATCC.

Métodos comunes para cada uno de los experimentos siguientes:

Se utilizó un sistema de respirometría CES AER-200. Las botellas del respirómetro de 500 ml (reactores) contenían medio mínimo de sales minerales SSC_3 y MOPS 20 mM ajustado a un pH de 7,2. Los sustratos diana, LCFA, se añadieron como se describe en los métodos experimentales individuales a continuación.

Se diluyó glicerol al 50% (p/p) con agua desionizada para reducir la viscosidad y se pipeteó luego (v/v) en el reactor apropiado. Los reactores se esterilizaron por tratamiento en autoclave y se utilizaron técnicas estériles en cada experimento. Se realizaron cultivos de banda MacConkey en cada inóculo en el momento de utilización para detectar la contaminación Gram-negativa. Se realizaron cultivos de banda de placas de agar MacConkey y agar de métodos estándar (SMA) sobre el contenido de cada botella al final del experimento. Se utilizaron las placas SMA para ensayar cultivos puros.

Los métodos específicos empleados en cada uno de los cuatro estudios siguientes se detallan a continuación.

Estudio 1

Cultivo con glicerol en escalera

Este estudio se realizó para determinar la concentración eficaz de glicerol para la mejora de la degradación de un LCFA como se mide por la tasa incrementada de consumo de oxígeno.

Métodos específicos: Se añadió ácido palmítico a cada reactor a 500 mg por 500 ml (p/v). Se añadió glicerol diluido por medio de una pipeta (v/v) como se describe en la Tabla 4. Se utilizó como inóculo un cultivo puro de SB3112. Se determinó la densidad óptica (OD) de un cultivo nocturno en caldo de recuento de placas (PCB) a fin de estimar el recuento bacteriano. La dosis diana en cada reactor se basó en la medida de la densidad óptica del caldo de cultivo.

La Figura 3 muestra los datos promediados en función de la dilución en serie de glicerol utilizando ácido palmítico como sustrato. Todas las concentraciones de glicerol (10 ppm a 200 ppm) mostraron una mejora importante de la degradación del ácido palmítico. Sin la adición de glicerol, no se observaba consumo de oxígeno importante alguno, indicando la ausencia de degradación del ácido palmítico.

La Figura 4 muestra el consumo de oxígeno en función de la adición en serie de glicerol en ausencia de ácido palmítico. Estos valores se sustrajeron de los datos de glicerol más ácido palmítico que se muestran en la Figura 3 (obsérvense las diferencias en los valores del eje Y entre las Figuras 3 y 4). La Figura 5 muestra el resultado de la sustracción y por tanto muestra únicamente el consumo de oxígeno atribuido a la degradación del ácido palmítico por SB3112.

Por los datos presentados, está claro que el glicerol a una concentración tan baja como 10 ppm estimulará la degradación del LCFA, ácido palmítico. Es importante observar que el glicerol a una concentración de 10 ppm no produce un aumento importante en el número de células bacterianas.

Estudio 2

Otros Bacillus megaterium

Este estudio se realizó para comparar el efecto de glicerol sobre la degradación del LCFA, ácido palmítico, utilizando diversas cepas de *Bacillus megaterium*.

Métodos específicos:

Se añadió ácido palmítico, 500 mg por reactor de 500 ml de volumen (1000 ppmv). Se añadieron 50 mg de glicerol por reactor de 500 ml (100 ppmv). Se utilizó como inóculo un cultivo puro de cada cepa. Se determinó la densidad óptica (OD) de un cultivo nocturno en caldo de recuento de placas (PCB) a fin de estimar el recuento bacteriano. La dosis diana en cada reactor se basaba en la medida de la densidad óptica del cultivo de caldo. Los tratamientos para reactor se muestran en la Tabla 5.

La Figura 6 muestra los datos de consumo medio de oxígeno para diversas cepas de *Bacillus megaterium* para la degradación de ácido palmítico en presencia de glicerol. La Cepa SB3112 iniciaba el consumo de oxígeno más pronto, producía una tasa elevada de consumo y exhibía un consumo de oxígeno acumulado total mayor en comparación con la Cepa 3. Sin la presencia de glicerol, no se producía degradación alguna del ácido palmítico en este estudio, como se indicaba por la ausencia de consumo de oxígeno.

Las cepas de ATCC 2 y 1 no exhibían consumo alguno de oxígeno en ácido palmítico solo o en ácido palmítico con adición de glicerol. De hecho, la degradación de glicerol era inhibida en presencia de PA. La cantidad de consumo de oxígeno esperada a partir de 50 mg de glicerol debería ser aproximadamente 70 mg.

En resumen, SB3112 degradaba el ácido palmítico en una extensión mucho mayor que la cepa 3 con adición de glicerol. Las cepas de ATCC 2 y 1 no degradaban el ácido palmítico con o sin glicerol.

Estudio 3

Otras especies de bacterias

Este estudio se realizó para comparar un producto disponible en el comercio que contenía una mezcla Gram-positiva de 5 a 7 cepas con el producto totalmente formulado de la presente invención que contiene SB3112. Todas las cepas se encontraban en forma de esporas, con inclusión de la SB3112.

Los métodos específicos son como sigue:

Los productos totalmente formulados se diluyeron en el reactor apropiado para alcanzar un recuento inicial de esporas en los reactores de aproximadamente 5,4 x 10^4 CFU/ml. Los tratamientos para cada reactor se muestran en la Tabla 6.

La Figura 7 muestra la respuesta a la adición de glicerol al sustrato de LCFA por los dos productos. Los datos indican que mientras que el producto que contiene SB3112 consumía rápidamente el ácido palmítico, la mezcla disponible en el comercio no degradaba el ácido palmítico significativamente. Todos los productos y reactores estaban exentos de contaminación Gram-negativa como se indica por la ausencia de crecimiento cuando se cultiva en bandas en agar MacConkey.

Los datos indican que el producto que contenía SB3112 degradaba el ácido palmítico mientras que el producto disponible en el comercio no degradaba el ácido palmítico significativamente. Ambos productos eran capaces de degradar el glicerol en presencia del LCFA.

Estudio 4

Efecto del Glicerol sobre la Biodegradación

Este estudio se realizó para demostrar el efecto del glicerol sobre la oxidación de los ácidos grasos de diversas longitudes de cadena.

Los métodos específicos son como sigue: Se utilizó respirometría para ensayar cada uno de cierto número de ácidos carboxílicos que variaban en longitud de cadena desde 2 (ácido acético) a 18 (ácido oleico). Se ensayaron 1000 mg/l de cada ácido excepto del oleico, que se ensayó a 200 mg/l. Se utilizó glicerol a una concentración de 500 ppm. El estudio se condujo durante un periodo de 10 días.

La Tabla 7 muestra la utilización de ácidos grasos de cadena larga por esporas de SB2112 en presencia de glicerol (sustraído el consumo de glicerol). Cuando se comparan con los datos en sin glicerol, los resultados obtenidos en presencia de glicerol demuestran que el glicerol aumenta significativamente la degradación de los ácidos de cadena larga (grasos).

Se han descrito hasta aquí diversas realizaciones de la presente invención de acuerdo con los objetos y ventajas arriba indicados. Se apreciará que estos ejemplos son meramente ilustrativos y no limitantes de la invención. Por supuesto, muchas variaciones y modificaciones de la presente invención serán evidentes y serán ideadas por las personas con experiencia ordinaria en la técnica, y la totalidad de dichas variaciones y modificaciones se incluyen dentro del ámbito y alcance de las reivindicaciones.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Componentes Ilustrativos en una Composición Líquida de acuerdo con la presente invención

Componente	Intervalo de Cantidad	Cantidad Preferida
Agentes tensioactivos		
Ácido alquilbenceno–sulfónico lineal	0,5–5%	1–2%
Alcohol etoxilado	0,5–5%	0,5–1,5%
Conservantes		
1,2–bencisotiazolin–3–ona	0,025–0,2%	0,045–0,1%
Antranilato de metilo	20–40 ppm	25–35 ppm
Microorganismos		
Bacillus licheniformis	1 x 10^6 a 1 x 10^9 CFU/ml	5 x 10^6 a 1 x 10^8 CFU/ml
Bacillus amyloliquefaciens	1 x 10^6 a 1 x 10^9 CFU/ml	5 x 10^6 a 1 x 10^8 CFU/ml
Bacillus pasteurii	1 x 10^6 a 1 x 10^9 CFU/ml	5 x 10^6 a 1 x 10^8 CFU/ml
Bacillus laevolacticus	1 x 10^6 a 1 x 10^9 CFU/ml	5 x 10^6 a 1 x 10^8 CFU/ml
Activador		
Glicerol	0–10%	0,001%–4%
Otros ingredientes		
Etilenodiamina–tetra–acetato tetrasódico (estabilizador)	0,1–1,0%	0,2–0,5%
Fragancia	0–0,5%	0,2–0,3%
Otros microorganismos formadores de esporas	0 a 1 x 10^9 CFU/ml	5 x 10^6 a 1 x 10^8 CFU/ml
Aumentador de la viscosidad	0–0,5%	0,2–0,3%

TABLA 2

Utilización de ácido esteárico por diversas cepas de Bacillus megaterium

Parámetro	SB3112	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3
Fase de re–tardo (horas)	20	72	60	100
Tasa de consumo de oxígeno (mg/h)	1,9	1,1	0,8	0,9
Consumo total acu–mulado de oxígeno (mg)	180	140	110	90
Cada volumen de reactor era 0,5 litros.				

TABLA 3

Degradación de los ácidos grasos por la cepa SB3112 de Bacillus megaterium

Ácido graso utilizado	Tasa de consumo de oxígeno (mg/h)	Consumo total acumulado de oxígeno (mg)
Ácido oleico, C–18:1	4,9	185
Ácido esteárico, C–18	1,75	230
Ácido palmítico, C–16	2,87	480
Ácido valérico, C–5	2,37	342
Ácido butírico, C–4	1,96	308
Ácido acético, C–2	1,7	247
Cada volumen de reactor era 0,5 litros. El ácido oleico era 100 mg por reactor y todos los sustratos restantes eran 500 mg por reactor.		

TABLA 4

Tratamientos con Glicerol en Escalera

Reactor	Glicerol, ppm	Ácido palmítico (500 mg por reactor)	Volumen de glicerol diluido por reactor de 500 ml
1,2,3.	Sin glicerol	Sí	0
4,5.	10 ppm	Sí	10 µl
6,7.	25 ppm	No	25 µl
8,9,10.	25 ppm	Sí	25 µl
11,12.	100 ppm	No	100 µl
13,14,15.	100 ppm	Sí	100 µl
16,17.	200 ppm	No	0,20 ml
18,19,20.	200 ppm	Sí	0,20 ml

TABLA 5

Otros Tratamientos con Bacillus megaterium

Reactor	Glicerol, ppm	Cepa
1,3.	Sin glicerol	SB3112
4,5.	100 ppm	SB3112
6,7.	Sin glicerol	Cepa 2
8,9.	100 ppm	Cepa 2
14,15.	Sin glicerol	Cepa 1
16,17.	100 ppm	Cepa 1
22,23.	Sin glicerol	Cepa 3
24.	100 ppm	Cepa 3

TABLA 6

Tratamientos con otras especies de bacterias

Reactor #	Ácido palmítico	Producto
1,2,3	Sí	Producto disponible comercialmente
4,5,6	Sí	Producto SB3112
7,8	No	Producto disponible comercialmente
9,10	No	Producto SB3112

TABLA 7

Tasas de crecimiento de SB3112 sobre diversos ácidos carboxílicos

Ácido graso	Con glicerol*		Sin glicerol***	
	Tasa de consumo de oxígeno (mg/l/h)	Consumo total acumulado de oxígeno (mg/l)	Tasa de consumo de oxígeno (mg/l/h)	Consumo total acumulado de oxígeno (mg/l)
Ácido oleico**, C–18:1	9,8	370	0	0
Ácido esteárico, C–18	3,5	460	0	0
Ácido palmítico, C–16	5,7	960	0	0
* Sustraído el consumo por el glicerol				
** El ácido oleico era 200 mg por reactor, mientras que los ácidos esteárico y palmítico eran 500 mg por reactor de 500 ml				
*** No se midió consumo alguno para los ácidos grasos arriba indicados antes de 150 horas de tratamiento sin la presencia de glicerol				

REIVINDICACIONES

1. Un cultivo biológicamente puro de *Bacillus megaterium* ATCC PTA-3142.

2. Una composición para degradación de ácido acético, que comprende *Bacillus megaterium* ATCC PTA-3142 y un componente seleccionado del grupo constituido por una formulación nutriente no tóxica, agente tensioactivo, activador, conservante, carga, estabilizador, fragancia, aumentador de la viscosidad, enzimas, y una combinación de los mismos.

3. La composición de la reivindicación 2, que comprende además clases de bacterias adicionales.

4. La composición de la reivindicación 3, en la cual las clases de bacterias adicionales se seleccionan del grupo constituido por los géneros: *Acinetobacter, Aspergillus, Azospirillum, Burkholderia, Bacillus, Ceriporiopsis, Enterobacter, Escherichia, Lactobacillus, Paenebacillus, Paracoccus, Pseudomonas, Rhodococcus, Syphingomonas, Streptococcus, Thiobacillus, Trichoderma, Xanthomonas*, y una combinación de los mismos.

5. La composición de la reivindicación 3, en la cual las bacterias se seleccionan del grupo constituido por *Bacillus licheniformis, Bacillus amiloliquefaciens, Bacillus laevolacticus, Bacillus pasteurii, Bacillus subtilis, Bacillus megaterium* y una combinación de las mismas.

6. La composición de la reivindicación 2, en la cual los componentes son como sigue:

(i) *Bacillus megaterium* ATCC PTA-3142 comprendido entre 1 x 10^5 y 5 x 10^{11} CFU/ml;

(ii) glicerol comprendido entre 0% y 10%;

(iii) agente tensioactivo comprendido entre 0% y 10%;

(iv) conservante comprendido entre 1 ppm y 1,0%;

(v) colorante comprendido entre 0% y 1%;

(vi) fragancia comprendida entre 0% y 1,0%;

(vii) aumentador de la viscosidad comprendido entre 0% y 5%, siendo todos los porcentajes v/v.

7. Un método para degradar los ácidos grasos o la mugre, que comprende exponer ácido graso, mugre, o ácido graso y mugre a una composición que comprende *Bacillus megaterium* ATCC PTA-3142.

8. El método de la reivindicación 7, que comprende añadir a la composición un activador de la biodegradación.

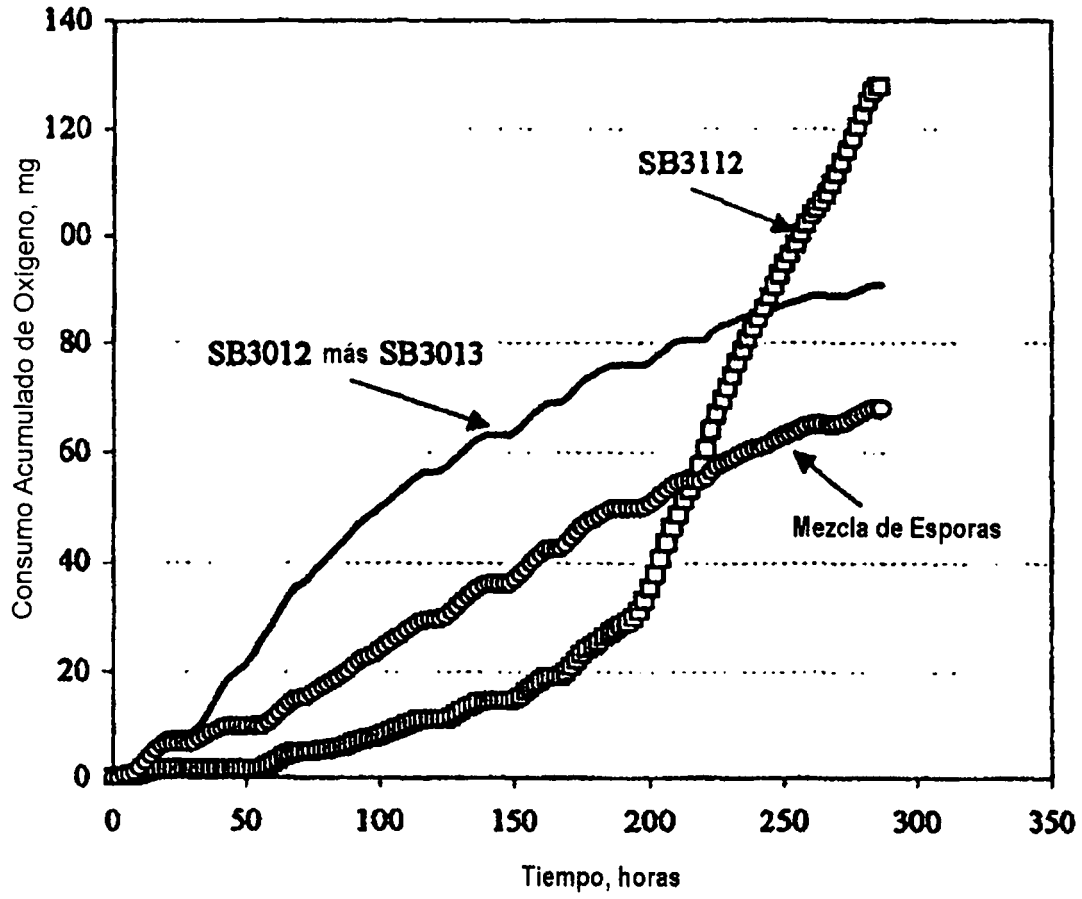
9. El método de la reivindicación 8, en el cual dicho activador es glicerol en un intervalo de 0,001% a 10% (v/v).

10. El método de la reivindicación 7, que comprende añadir un agente tensioactivo a la composición para mejorar la biodisponibilidad de los ácidos grasos y la mugre.

11. Un método para mejorar la actividad biodegradante de un cultivo biológicamente puro de *Bacillus megaterium* ATCC PTA-3142, que comprende poner a disposición glicerol en una cantidad eficaz para mejorar la actividad de biodegradación de dicho microorganismo.

12. El método de la reivindicación 11, en el cual la cantidad de glicerol está comprendida en un intervalo de 5 ppm a 1% (p/v).

Figura 1. La eficacia de SB3112 y diversos microorganismos para degradar la suciedad



El efecto del glicerol sobre la actividad biodegradante de SB3112

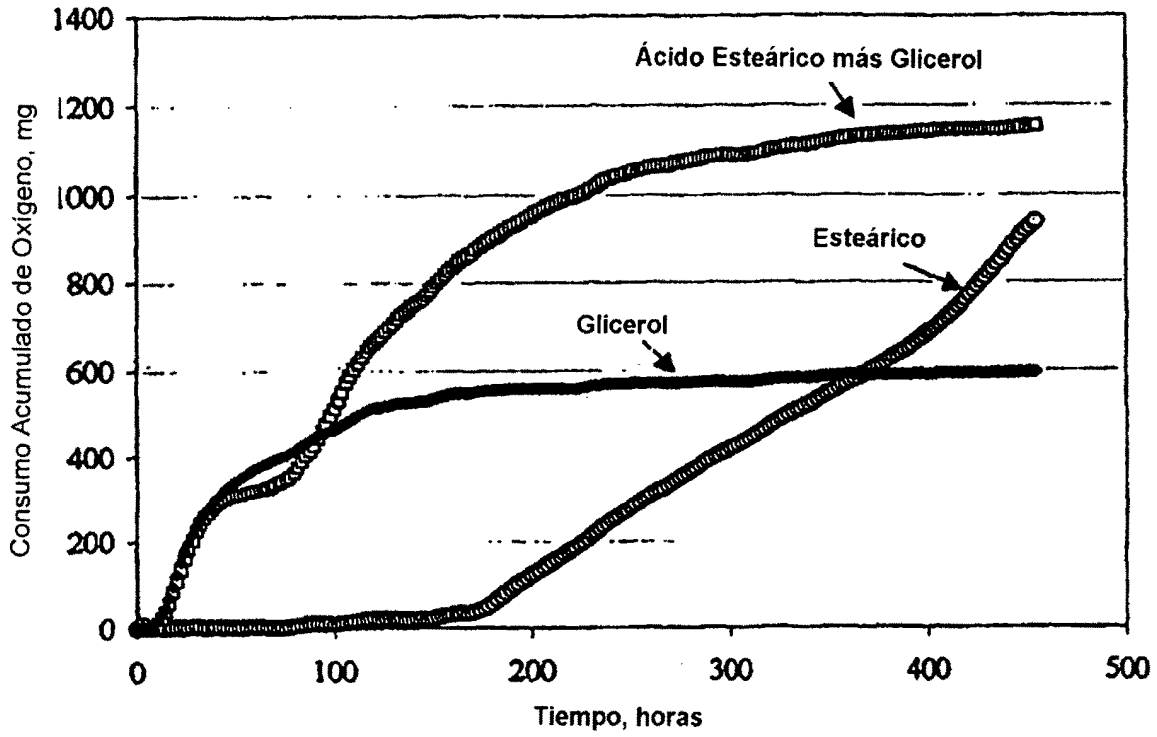


Figura 3. El efecto de una dilución en serie de glicerol sobre la degradación del ácido palmítico (PA)

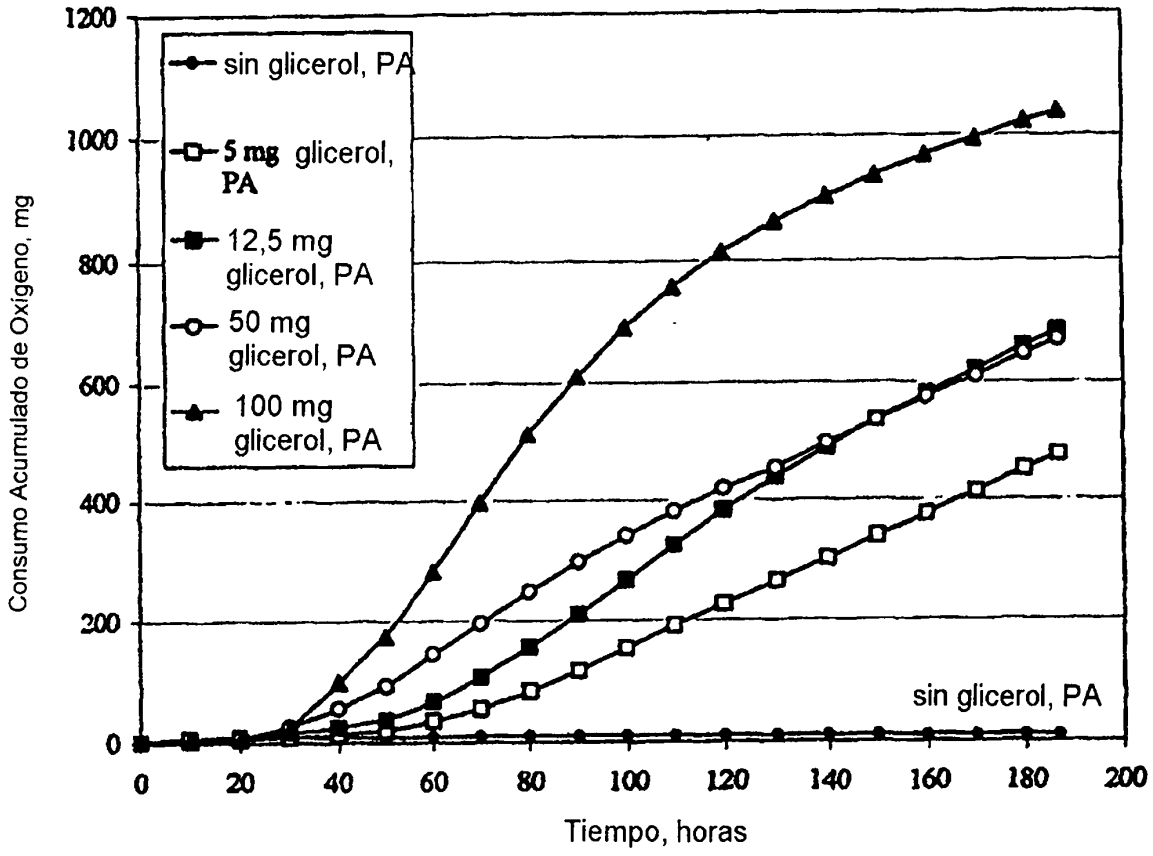


Figura 4. Degradación de diversas cantidades de glicerol por SB3112 sin la presencia de ácido palmítico

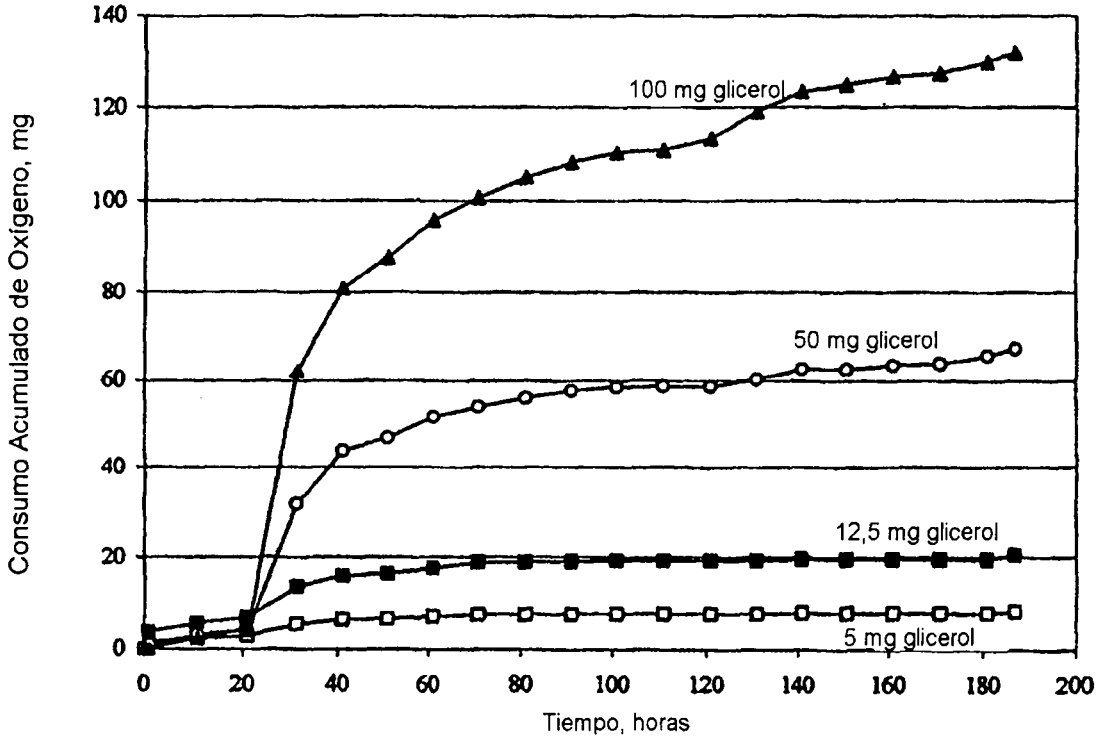


Figura 5. El consumo de oxígeno atribuido a la degradación del ácido palmítico después de sustraer el consumo de oxígeno por el glicerol. La leyenda muestra la cantidad original de glicerol presente.

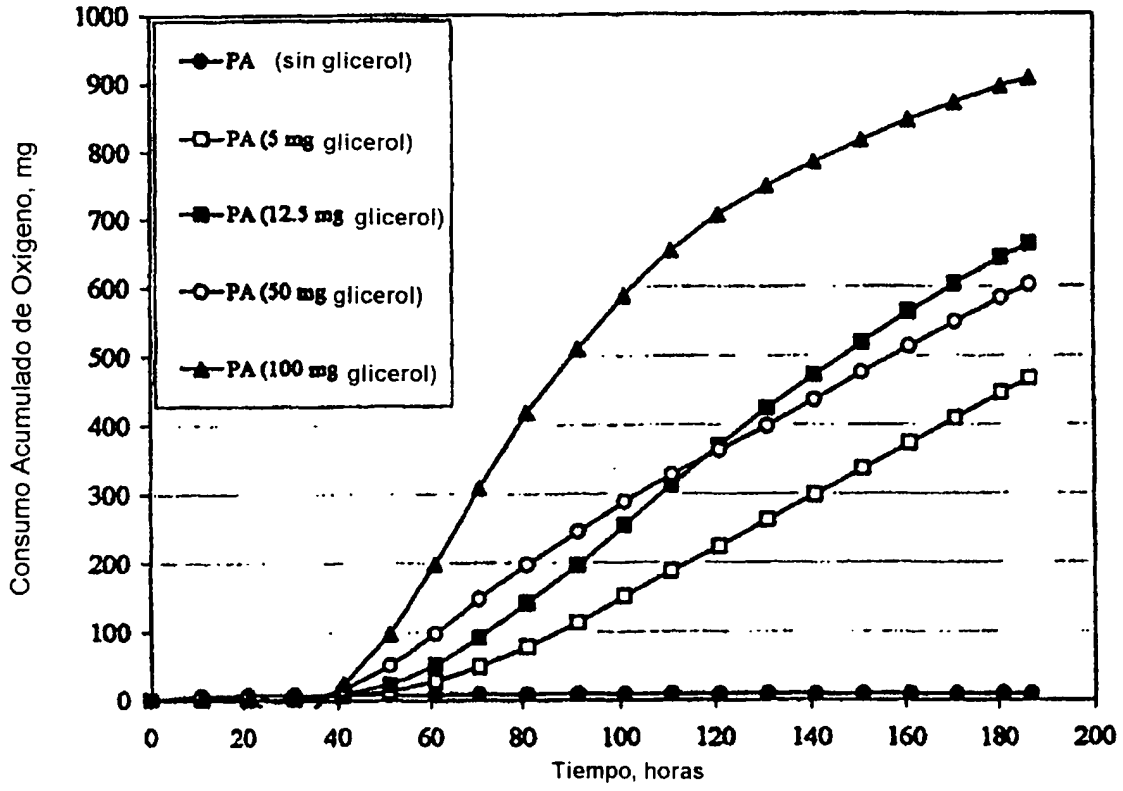


Figura 6. Se ensayaron diversas cepas de *Bacillus megaterium* para la degradación de ácido palmítico en presencia de glicerol

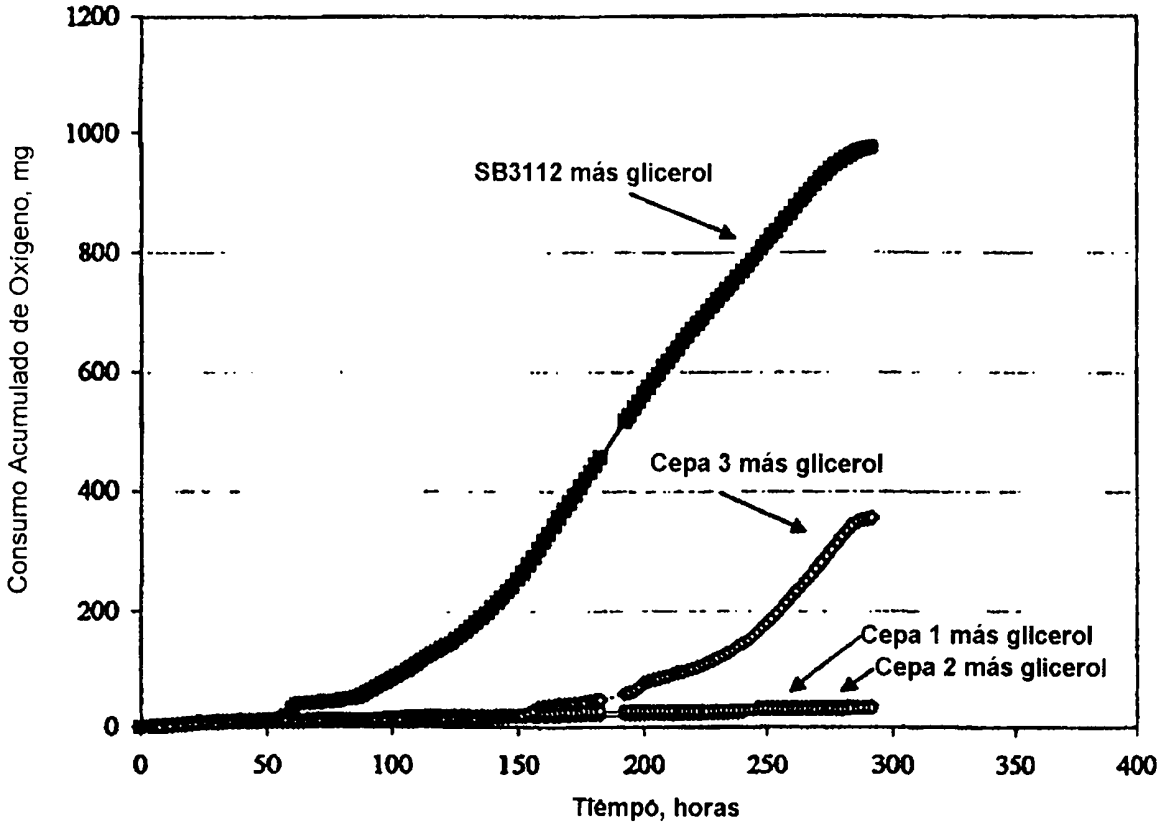


Figura 7. Producto disponible en el comercio frente al producto SB3112 para la degradación de ácido palmítico en presencia de glicerol. Se muestran también tratamientos con glicerol sólo

