

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 810**

51 Int. Cl.:

**C02F 3/34** (2013.01)

**C02F 103/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2020** **E 20164866 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2024** **EP 3712116**

54 Título: **Composición para optimizar el tratamiento biológico de piscinas**

30 Prioridad:

**21.03.2019 BE 201905176**

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

**03.10.2024**

73 Titular/es:

**AQUATIC SCIENCE SA (100.0%)  
Parc Ind. des Hauts Sarts, 3e av 1 bus 9  
4040 Herstal, BE**

72 Inventor/es:

**LUIZI, FRÉDÉRIC;  
POGNOT, JEAN-FRANÇOIS y  
WERQUIN, RUBEN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 980 810 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Composición para optimizar el tratamiento biológico de piscinas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición adecuada para optimizar el tratamiento biológico de piscinas. Más específicamente, una composición que comprende una mezcla de especies seleccionadas de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Paracoccus*, que supera los problemas existentes en la técnica anterior y permite completar adecuadamente el ciclo del nitrógeno. En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a la utilización de la composición en piscinas biológicas. En un aspecto todavía adicional, la presente invención se refiere a un método para la preparación de la composición.

15 Antecedentes

Con el fin de garantizar la calidad del agua, la mayoría de piscinas están cloradas. La cloración, aunque garantiza la desinfección del agua, genera productos secundarios que resultan perjudiciales. Generalmente en las piscinas tienden a utilizarse sales de hipoclorito. Estas sales reaccionan con el agua para producir el oxidante fuerte ácido hipocloroso (HClO). Este HClO es el agente bactericida principal en las aguas de piscina cloradas. El amoníaco y los compuestos de tipo amoníaco presentes en el sudor humano y en la orina, así como los que resultan de la degradación de la materia orgánica arrastrada a la piscina por el viento, reaccionan con el HClO, produciendo cloraminas. Estos compuestos pueden causar sibilancias e irritaciones oculares en los usuarios de la piscina. Además, estos potentes oxidantes pueden dañar las barras epiteliales de las vías respiratorias de los bañistas. En niños pequeños, dichos daños en el epitelio pueden incrementar la sensibilidad a alergias. Además, los derivados de cloro pueden cruzar el escroto y dañar las células espermáticas, reduciendo de esta manera la fertilidad. En consecuencia, se han buscado diversas alternativas a la cloración.

Una alternativa habitual a la cloración es la eliminación biológica de los compuestos nitrogenados inorgánicos, tales como amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3$ ) de los sistemas acuáticos. Esta eliminación ha sido un cuestión de interés entre ingenieros de aguas residuales y otros profesionales del tratamiento de aguas. Estos compuestos contribuyen a la eutrofización y son tóxicos para muchos organismos acuáticos. Por lo tanto, su presencia en aguas residuales tratadas y en sistemas acuáticos limpios, tales como estanques, lagos y embalses, resulta indeseable. Sin embargo, hasta la fecha no se ha encontrado ninguna solución fácil de implementar para este problema.

Las soluciones al tratamiento biológico de los sistemas acuáticos son conocidas a partir del documento n.º WO 2016/179 390. Este documento da a conocer una composición para eliminar el nitrato de un medio acuoso bajo condiciones aeróbicas que comprenden microorganismos. Los microorganismos dados a conocer comprenden, entre otros, cepas de *Bacillus*. Dicho documento adolece de la desventaja de que se requieren nieles elevados de oxígeno disuelto. El método está centrado en la degradación del nitrato, pero no considera la degradación de la materia orgánica o cualesquiera otros contaminantes. Además, los consumidores indican que el método de dicho documento todavía requiere cloración suplementaria.

Las soluciones al tratamiento biológico de sistemas acuáticos también son conocidas a partir del documento n.º WO 2014/189 963. Este documento da a conocer una composición para degradar materia orgánica que comprende microorganismos. Los microorganismos dados a conocer comprenden, entre otros, cepas de *Bacillus*. Dicho documento adolece de la desventaja de que el método está centrado en la degradación de materia orgánica pero no considera la degradación del nitrato, nitrito o cualesquiera otros contaminantes. Además, los consumidores indican que el método de dicho documento todavía requiere cloración suplementaria.

Los documentos n.º CN 105 132 326, n.º CN 105 152 487 y n.º CN 102 826 895 describen sistemas de tratamiento de aguas residuales. El documento n.º CN 105 132 326 describe un sistema de tratamiento de aguas residuales de glutamato sódico. Los documentos n.º CN 105 152 487 y n.º CN 102 826 895 describen sistemas de tratamiento de aguas residuales. Ninguno de los documentos anteriormente indicados se refiere al tratamiento de piscinas. Ninguno de los documentos anteriormente indicados discute un completado correcto del ciclo del nitrógeno.

Los documentos n.º US 9 302 924 y n.º US 2017 0 121 198 se refieren al tratamiento para piscinas. Ninguno de los documentos anteriormente indicados discute un completado correcto del ciclo del nitrógeno.

Allen et al.: "MALDI-TOF MS as a supportive tool for the evaluation of bacterial diversity in soils from Africa and the Americas", *Aerobiologia*, Springer-Verlag, Dordrecht, Países Bajos, vol. 31, n.º 1, 18 de octubre de 2014, páginas 111 a 126, comenta una herramienta analítica para la evaluación de la diversidad bacteriana en suelos. En esta obra no se da a conocer el tratamiento de aguas.

La presente invención tiene como objetivo resolver por lo menos algunos de los problemas y desventajas mencionados anteriormente.

Descripción resumida de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a una composición adecuada para optimizar el tratamiento biológico de piscinas según la reivindicación 1, en donde la composición comprende un agente bacteriano, en donde dicho agente bacteriano comprende una mezcla de especies seleccionadas de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Paracoccus*, en donde el agente bacteriano comprende una proporción en peso de bacterias seleccionadas del género *Paracoccus* a bacterias seleccionadas del género *Paenibacillus* de entre aproximadamente 1:1 y 15:1, preferentemente de entre aproximadamente 2:1 y 13:1, lo más preferentemente de entre aproximadamente 3:1 y 10:1, en donde el agente bacteriano comprende bacterias seleccionadas del género *Bacillus* en una proporción en peso de entre aproximadamente 60 % p/p y 95 % p/p. En un segundo aspecto, la invención se refiere a la utilización de la composición en piscinas según la reivindicación 14, preferentemente en piscinas biológicas. En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método para la preparación de la composición según la reivindicación 15.

Se muestran en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, realizaciones preferentes de la composición que resultan adecuadas para optimizar el tratamiento biológico de piscinas. Dichas realizaciones se refieren en particular a las diferentes proporciones de los géneros en el agente bacteriano. Más en particular, dichas realizaciones se refieren a las diferentes especies dentro de los géneros y a los diferentes agentes comprendidos en la composición. De esta manera, permiten completar adecuadamente el ciclo del nitrógeno y la consiguiente prevención de las floraciones algales y la contaminación. De esta manera, se elimina la necesidad de cloración de las piscinas. En la reivindicación 15 se muestran realizaciones preferentes del método para la preparación de la composición. Dichas realizaciones se refieren a un método de preparación, en el que las especies dentro del agente bacteriano están individualmente fermentadas, recolectadas y secadas. De esta manera, permiten obtener condiciones de producción más óptimas y un mayor grado de flexibilidad.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra un gráfico de la demanda química de oxígeno (DQO) para las diferentes combinaciones de cepas bacterianas A1, A2 y A3.

La figura 2 muestra un gráfico de la variación del consumo de nitrato para las diferentes combinaciones de las cepas bacterianas A1, A2 y A3.

La figura 3 muestra un gráfico de la variación del consumo de nitrito para las diferentes combinaciones de las cepas bacterianas A1, A2 y A3.

La figura 4 muestra un gráfico de la variación del consumo de fósforo inorgánico para las diferentes combinaciones de las cepas bacterianas A1, A2 y A3.

La figura 5 muestra un gráfico de la DQO de cepas puras y el grupo comprende la combinación de las cepas A1, A2 y A3 a partes iguales.

La figura 6 muestra un gráfico de la variación de la concentración de fósforo inorgánico para cepas puras y el grupo comprende la combinación de las cepas A1, A2 y A3 a partes iguales.

Descripción detallada de la invención

La presente exposición se refiere a limitaciones conocidas de la técnica relacionadas con productos para la optimización del tratamiento biológico de piscinas. La invención se refiere a una composición adecuada para optimizar el tratamiento biológico de piscinas, en donde la composición comprende un agente bacteriano, y en donde dicho agente bacteriano comprende una mezcla de especies seleccionadas de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Paracoccus*, en donde por lo menos una especie se selecciona de cada uno de dichos géneros, en donde el agente bacteriano comprende una proporción en peso de bacterias seleccionadas del género *Paracoccus* a bacterias seleccionadas del género *Paenibacillus* de entre aproximadamente 1:1 y 15:1, preferentemente de entre aproximadamente 2:1 y 13:1, lo más preferentemente de entre aproximadamente 3:1 y 10:1, en donde el agente bacteriano comprende bacterias seleccionadas del género *Bacillus* en una proporción en peso de entre aproximadamente 60 % p/p y 95 % p/p. La invención se refiere, además, a la utilización de la composición en piscinas, y preferentemente en piscinas biológicas. La invención se refiere, además, a un método para la preparación de la composición.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos utilizados en la descripción de la invención, incluyendo los términos técnicos y científicos, presentan el significado habitualmente entendido por el experto habitual en la materia a la que se refiere la presente invención. A modo de guía adicional, se incluyen las definiciones de los términos para apreciar mejor la enseñanza de la presente invención.

Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos siguientes presentan los significados siguientes:

“Un” o “una” y “el” o “la” tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a referentes tanto singulares como plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A título de ejemplo, “un compartimiento” se refiere a un compartimiento o a más de uno.

“Aproximadamente” tal como se utiliza en la presente memoria en referencia a un valor medible, tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal, y similares, pretende comprender variaciones de +/-20 % o inferiores, preferentemente de +/-10 % o inferiores, más preferentemente de +/-5 % o inferiores, todavía más preferentemente de +/-1 % o inferiores, y todavía más preferentemente, de +/-0,1 % o inferiores respecto al valor especificado, en la medida en que dichas variaciones resultan adecuadas para llevarse a cabo en la invención descrita. Sin embargo, debe entenderse que el valor mismo al que se refiere el modificador “aproximadamente” también es dado a conocer específicamente.

“Comprende”, “comprendiendo” y “que comprende” tal como se utilizan en la presente memoria son sinónimos de “incluye”, “incluyendo” y “que contiene” o de “contiene”, “conteniendo” y “que contiene”, y son términos inclusivos o de sentido abierto que especifican la presencia de lo siguiente, p. ej., un componente, y no excluyen o impiden la presencia de componentes, características, elementos, miembros o etapas no recitadas adicionales, conocidas de la técnica o dadas a conocer en la misma.

Además, los términos primer, segundo, tercer y similares en la descripción y en las reivindicaciones, se utilizan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico, a menos que se especifique. Debe entenderse que los términos utilizados de esta manera son intercambiables bajo circunstancias adecuadas y que las realizaciones de la invención descritas en la presente memoria son capaces de operar en otras secuencias diferentes de las descritas o ilustradas en la presente memoria.

La enumeración de intervalos numéricos mediante los extremos incluye todos los números y fracciones subsumidos dentro de esos intervalos, así como los extremos indicados.

La expresión “% en peso”, “porcentaje en peso”, “% en peso” o “% p”, aquí y a lo largo de toda la descripción, a menos que se defina de otro modo, se refiere al peso relativo del componente respectivo respecto al peso total de la formulación.

Mientras que las expresiones “uno o más” o “por lo menos uno”, tal como uno o más o por lo menos uno o más miembros de un grupo de miembros, resulta evidente de por sí, mediante ejemplificación adicional, el término comprende, entre otros, una referencia a cualquiera de dichos miembros, o a dos o más cualesquiera de dichos miembros, tales como, p. ej.,  $\geq 3$ ,  $\geq 4$ ,  $\geq 5$ ,  $\geq 6$  o  $\geq 7$ , etc. cualesquiera de dichos elementos, y hasta la totalidad de dichos miembros.

Los términos “microbiano”, “bacteria” o “microorganismos” tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a microorganismos que confieren un beneficio. Los microorganismos según la invención pueden ser viables o no viables. Los microorganismos no viables son metabólicamente activos. La expresión “metabólicamente activo” se refiere a que muestran por lo menos cierta actividad enzimática o de metabolito secundario residual característica de ese tipo de microorganismo.

La expresión “bacterias viables” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una población de bacterias que es capaz de replicarse bajo condiciones adecuadas bajo las cuales es posible la replicación. Una población de bacterias que no satisfaga la definición de “no viables” (tal como se ha proporcionado anteriormente) se considera que es “viable. La expresión “aguas residuales”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a aguas residuales domésticas procedentes de viviendas, edificios de oficinas, instituciones y granjas, que contienen agua subterránea, agua superficial y/o agua pluvial.

La expresión “no viable” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una población de bacterias que no es capaz de replicarse bajo cualquier condición conocida. Sin embargo, debe entenderse que, debido a las variaciones biológicas normales en una población, un pequeño porcentaje de la población (es decir, 5 % o menos) todavía podría ser viable y, de esta manera, capaz de replicación bajo condiciones de crecimiento adecuadas en una población que de otro modo se define como no viable.

El término “activas” referido a células (bacterianas) tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al número de células viables. La cantidad de células activas, es decir, viables, puede especificarse en cualquier unidad o medida que se utilice habitualmente en la técnica. Por ejemplo, la cantidad de células activas puede expresarse en el número de células o unidades formadoras de colonia (UFC) viables por gramo de muestra.

La expresión “agente de conservación” tal como se define en la presente memoria se refiere a un agente que ayuda a la conservación y/o estabilización de un agente bacteriano. Los agentes de conservación comprende, por ejemplo, aunque sin limitarse a ellos, los crioprotectores.

El término "crioprotector" tal como se define en la presente memoria se refiere a una sustancia utilizada para proteger las células bacterianas frente a los daños durante la congelación, liofilización y descongelación, así como durante el almacenamiento. El crioprotector puede ser cualquier aditivo, con la condición de que proteja las células frente a los daños durante la congelación, liofilización, descongelación y almacenamiento. Entre los ejemplos de crioprotectores se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, azúcares (p. ej., sacarosa, fructosa y trehalosa), polialcoholes (p. ej., glicerol, sorbitol o manitol), polisacáridos (p. ej., celulosas, almidón, gomas o maltodextrina), poliéteres (p. ej., polipropilenglicol, polietilenglicol o polibutilenglicol)), antioxidantes (p. ej., antioxidantes naturales, tales como ácido ascórbico, beta-caroteno, vitamina E, glutatió o antioxidantes químicos), aceites (p. ej., aceite de colza, aceite de girasol o aceite de oliva), surfactantes (p. ej., Tween-20, Tween-80 o ácidos grasos), grasas, peptonas (p. ej., peptonas de soja, peptona de trigo o peptona de suero), triptonas, vitaminas, minerales (p. ej., hierro, manganeso o zinc), hidrolizados (p. ej., hidrolizados de proteínas, tales como suero en polvo, extracto de malta, soja o hidrolizado de caseína), aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleótidos, nucleobases (p. ej., citosina, guanina, adenina, timina, uracilo, xantina, hipoxantina, inosina o inositol), extractos de levadura (p. ej., extractos de levadura de *Saccharomyces* spp., *Kluyveromyces* spp., o *Torula* spp.), extracto de vaca, factores de crecimiento y lípidos. Otros ejemplos de crioprotectores se dan a conocer en los documentos n.º WO 2012/088 261 y n.º WO 2012/076 665.

La adición de un crioprotector en un procedimiento de la invención puede llevarse a cabo mediante la mezcla de un crioprotector sólido al concentrado de bacterias durante un periodo de tiempo suficiente a una temperatura adecuada.

La expresión "agente dispersante" tal como se define en la presente memoria se refiere a un agente que ayuda en la formación y/o estabilización de una dispersión.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos utilizados en la descripción de la invención, incluyendo los términos técnicos y científicos, presentan los significados entendidos habitualmente por el experto habitual en la materia a la que se refiere la presente invención.

En un primer aspecto, la invención se refiere a una composición adecuada para optimizar un tratamiento biológico de piscinas, en donde la composición comprende un agente bacteriano, en donde dicho agente bacteriano comprende una mezcla de especies seleccionadas de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Paracoccus*, en donde el agente bacteriano comprende una proporción en peso de bacterias seleccionadas del género *Paracoccus* a bacterias seleccionadas del género *Paenibacillus* de entre aproximadamente 1:1 y 15:1, preferentemente de entre aproximadamente 2:1 y 13:1, lo más preferentemente de entre aproximadamente 3:1 y 10:1, en donde el agente bacteriano comprende bacterias seleccionadas del género *Bacillus* en una proporción en peso de entre aproximadamente 60 % p/p y 95 % p/p.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a la utilización de la composición en piscinas, y preferentemente en piscinas biológicas.

Con el fin de garantizar una buena calidad del agua, la mayoría de las piscinas se cloran. Sin embargo, las soluciones actuales adolecen de la desventaja de que se crean productos secundarios perjudiciales debido a la cloración de la piscina. En general, en las piscinas tienden a utilizarse sales hipoclorito. Ambas reaccionan con el agua, produciendo el oxidante fuerte HClO. El amoníaco y los compuestos de tipo amoníaco presentes en el sudor y orina humanos, así como los resultantes de la degradación de la materia orgánica arrastrada a la piscina por el viento, reaccionan con el HClO, produciendo cloraminas. Estos potentes oxidantes pueden dañar la barrera epitelial que protege las vías respiratorias de los bañistas. En niños pequeños, dichos daños al epitelio puede incrementar la sensibilidad a alergias. Los inventores han encontrado inesperadamente un agente bacteriano que es capaz de completar adecuadamente el ciclo del nitrógeno. Debido a que el ciclo del nitrógeno se completa adecuadamente, se previenen floraciones algales y se degrada la contaminación. De esta manera, se elimina la necesidad de clorar las piscinas.

El ciclo del nitrógeno es el ciclo por el que el nitrógeno se convierte en múltiples formas químicas a medida que circula por los ecosistemas acuáticos. La conversión del nitrógeno puede llevarse a cabo mediante tanto procesos biológicos como físicos. En una primera etapa del ciclo del nitrógeno, se degrada la materia orgánica. La degradación de la materia orgánica libera nitrógeno orgánico en forma de compuestos de tipo amoníaco. Estos compuestos seguidamente son convertidos en nitrito y nitrato en la presencia de oxígeno. El nitrato es asimilado por plantas o algas. Alternativamente, el nitrato puede ser asimilado por otros géneros de bacterias o desnitrificado en nitrógeno gaseoso. La invención se refiere en particular a la potenciación del ciclo del nitrógeno con el fin de degradar rápidamente la materia orgánica sin la acumulación de nitrato, nitrito o fósforo. Más en particular, la invención se refiere a establecer condiciones bioquímicas que son favorables a los bañistas y a la diversidad de la vida acuática.

Los niveles de bacterias utilizados según la presente invención dependerán de los tipos de las mismas. Resulta preferente que el producto anticipado por la presente invención contenga bacterias en una cantidad de entre aproximadamente  $10^5$  y  $10^{11}$  unidades formadoras de colonias (UFC) por ml.

Como indicador del completado correcto del ciclo del nitrógeno, se seleccionaron las especies del agente bacteriano basándose en su capacidad de reducir la demanda biológica de oxígeno (DBO), la demanda química de oxígeno (DQO), la concentración de fósforo, la concentración de nitrato y la concentración de nitrito. Los inventores observaron

que especies separadas seleccionadas de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Paracoccus* rendían excelentes rendimientos a este respecto. Además, los inventores observaron inesperadamente que combinaciones de especies de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Paracoccus* rendían un efecto sinérgico en su capacidad global de completar adecuadamente el ciclo del nitrógeno. En particular, los agentes bacterianos que comprendían una proporción en peso de bacterias seleccionadas del género *Paracoccus* a bacterias seleccionadas del género *Paenibacillus* de entre aproximadamente 1:1 y 15:1, rindieron una degradación completa de la materia orgánica sin la acumulación de nitrato, nitrito o fósforo, manteniendo todavía las condiciones bioquímicas que son favorables a los bañistas y a la diversidad de la vida acuática.

En una realización preferente de la invención, el agente bacteriano comprendía bacterias seleccionadas del género *Bacillus* en una proporción en peso de entre aproximadamente 65 % p/p y 90 % p/p, más preferentemente de entre aproximadamente 70 % p/p y 87,5 % p/p, lo más preferentemente de entre aproximadamente 75 % p/p y 85 % p/p.

El crecimiento de *Bacillus* es óptimo bajo condiciones aeróbicas. El crecimiento bajo dichas condiciones aeróbicas generalmente requiere cualesquiera formas inorgánicas de nitrógeno y fósforo. Bajo condiciones anóxicas, el nitrato o el nitrito son utilizados como un aceptor de electrones en lugar del oxígeno por parte de las especies de *Bacillus* facultativas anaeróbicas. Debido a que los estanques en general están fuertemente aireados, las especies de *Bacillus* son responsables de la eliminación de las formas inorgánicas de nitrógeno y fósforo utilizando una ruta oxidativa. Sin embargo, el final de la ruta oxidativa del amoníaco es el nitrato, que puede acumularse en el medio. Además, resulta crucial que el nitrato sea eliminado a fin de evitar el crecimiento de algas y su acumulación en el agua. Los inventores han observado inesperadamente que los agentes bacterianos que comprenden especies de *Bacillus* en una proporción en peso de entre aproximadamente 60 % p/p y 95 % p/p, preferentemente de entre aproximadamente 65 % p/p y 90 % p/p, más preferentemente de entre aproximadamente 70 % p/p y 87,5 % p/p, lo más preferentemente de entre aproximadamente 75 % p/p y 85 % p/p, rendían los mejores resultados de eliminación del nitrógeno y fósforo inorgánicos, manteniendo simultáneamente una desnitrificación adecuada y condiciones bioquímicas que eran favorables a los bañistas y a la diversidad de la vida acuática.

En una realización preferente de la invención, el agente bacteriano comprende una o más especies seleccionadas del género *Bacillus*, en donde la especie o especies seleccionadas del género *Bacillus*, comprenden una o más especies seleccionadas del grupo: *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus circulans* y *Bacillus subtilis*.

El contenido de materia orgánica es rico en fuentes de carbono que pueden ser utilizadas por microorganismos heterotróficos. Además, la materia orgánica es requerida tanto para la generación de energía como para el mantenimiento constitutivo de las células. El mantenimiento constitutivo de las células requiere compuestos como el fósforo y el nitrógeno. Debido a que el nitrógeno puede ser fijado por bacterias diazotróficas, el fósforo aparentemente es el elemento más limitante en los sistemas acuáticos. Por lo tanto, la incorporación de fósforo por bacterias heterotróficas debería competir eficientemente con el crecimiento del fitoplancton.

La capacidad de degradar materia orgánica se analizó para un grupo de bacterias. Dicho grupo comprendía, entre otros, especies seleccionadas de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Paracoccus*. Las especies de *Bacillus*: *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus circulans* y *Bacillus subtilis* inesperadamente rindieron los mejores resultados al someterlas a ensayo por separado. Se ilustran resultados similares en el Ejemplo 1.

La reducción sinérgica de la DQO se analizó para un grupo de especies de *Bacillus*. Los inventores observaron inesperadamente una fuerte influencia de las diferentes cepas sobre la reducción de la DQO. El rendimiento individual de las diferentes cepas en comparación con el rendimiento de los diferentes grupos solo puede explicarse por las fuertes interacciones y efectos antagonistas y agonistas entre las diferentes cepas. Se ilustran resultados similares en el Ejemplo 3. Además, los inventores observaron inesperadamente que agentes bacterianos que comprendía diferentes combinaciones de especies de *Bacillus* seleccionadas del grupo de *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus circulans* y *Bacillus subtilis*, rendían los efectos sinérgicos más grandes sobre la reducción de la DQO.

La capacidad de competir eficientemente con el crecimiento del fitoplancton se analizó para un grupo de especies de *Bacillus*. Todas las especies de *Bacillus* sometidas a ensayo presentaban diferentes actividades metabólicas bajo diferentes condiciones de oxígeno. Se ilustran resultados similares en el Ejemplo 2.

Los inventores observaron inesperadamente que los agentes bacterianos que comprendía las especies de *Bacillus* seleccionadas del grupo de *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus circulans* y *Bacillus subtilis*, eran activas en un amplio abanico de diferentes condiciones de oxígeno. Además, se observaron muy pocos efectos antagonistas entre dichas especies.

En una realización de la invención, el agente bacteriano comprendía una mezcla de 3 especies seleccionadas del grupo que comprendía las especies *Bacillus* siguientes: de *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus circulans* y *Bacillus subtilis*.

En una realización adicional de la invención, el agente bacteriano comprendía una mezcla de 3 especies seleccionadas del grupo que comprendía las especies de *Bacillus* siguientes: de *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus circulans* y *Bacillus subtilis*, en donde las especies de *Bacillus* se habían añadido en partes iguales.

Las mezclas que comprendían 3 especies seleccionadas del grupo que comprendía las especies de *Bacillus* siguientes: de *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus circulans* y *Bacillus subtilis*, rindieron una gran reducción sinérgica del fósforo.

En una realización de la invención, el agente bacteriano comprendía una mezcla de las especies de *Bacillus* siguientes: de *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus circulans* y *Bacillus subtilis*.

En una realización adicional de la invención, el agente bacteriano comprendía una mezcla de las especies de *Bacillus* siguientes: de *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus circulans* y *Bacillus subtilis*, en la que el agente bacteriano comprendía las especies de *Bacillus* en proporciones en peso iguales.

Las mezclas que comprendían las especies de *Bacillus* siguientes: de *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus circulans* y *Bacillus subtilis*, en partes iguales rindieron una reducción sinérgica del fósforo simultáneamente a una reducción sinérgica del nitrato.

En una realización preferente de la invención, el agente bacteriano comprendía una o más especies seleccionadas del género *Paracoccus*, en donde la especie o especies seleccionadas del género *Paracoccus*, comprendía una o más especies seleccionadas del grupo siguiente: *Paracoccus denitrificans*, *Paracoccus ferrooxidans*, *Paracoccus haeundaensis*, *Paracoccus halotolerans*, *Paracoccus homiensis*, *Paracoccus kawasakiensis*, *Paracoccus kocurii*, *Paracoccus kondratievae*, *Paracoccus koreensis*, *Paracoccus marcusii*, *Paracoccus methylutens*, *Paracoccus pantotrophus*, *Paracoccus seriniphilus*, *Paracoccus solventivorans*, *Paracoccus alcaliphilus*, *Paracoccus alkenifer*, *Paracoccus aminophilus*, *Paracoccus aminovorans*, *Paracoccus bengalensis*, *Paracoccus carotinifaciens*, *Paracoccus thiocyanatus*, *Paracoccus thiophilus*, *Paracoccus versutus*, *Paracoccus yeei*, and *Paracoccus zeaxanthinifaciens*, preferentemente *Paracoccus denitrificans*, *Paracoccus aminovorans* y *Paracoccus pantotrophus*, lo más preferentemente *Paracoccus pantotrophus*.

El final de la ruta oxidativa del amoníaco es el nitrato, que puede acumularse en el medio. Es crucial que se elimine el nitrato a fin de evitar el crecimiento algal. Para contrarrestar este efecto, los inventores incluyeron especies seleccionadas del género *Paracoccus*. Dichas especies son inesperadamente eficientes en su eliminación del nitrógeno, tal como se ilustra en los Ejemplos 4 y 5. Las especies de *Paracoccus*: *Paracoccus denitrificans*, *Paracoccus aminovorans* y *Paracoccus pantotrophus* resultaron particularmente eficientes. Además, *Paracoccus pantotrophus* no rindió ningún efecto antagonista contra las diferentes especies de *Bacillus*.

En una realización de la invención, el agente bacteriano comprende las especies de *Paracoccus* siguientes: *Paracoccus denitrificans*, *Paracoccus aminovorans* y *Paracoccus pantotrophus*. En una realización adicional de la invención, el agente bacteriano comprende *Paracoccus pantotrophus*.

En una realización de la invención, el agente bacteriano comprende *Paracoccus pantotrophus* y por lo menos una especie de *Bacillus* seleccionada del grupo siguiente: *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus circulans* y *Bacillus subtilis*. En una realización adicional de la invención, las especies de *Bacillus* y *Paracoccus pantotrophus* se añaden a partes iguales. En una realización adicional de la invención, el agente bacteriano comprende una proporción en peso de bacterias seleccionadas del género *Bacillus* a bacterias seleccionadas del género *Paracoccus* de entre aproximadamente 70:1 y 5:1. En una realización preferente de la invención, el agente bacteriano comprende una proporción en peso de bacterias seleccionadas del género *Bacillus* a bacterias seleccionadas del género *Paracoccus* de entre aproximadamente 70:1 y 5:1, preferentemente de entre aproximadamente 60:1 y 10:1, más preferentemente de entre aproximadamente 50:1 y 15:1, lo más preferentemente de entre aproximadamente 40:1 y 20:1.

Los inventores han observado inesperadamente efectos antagonistas muy pequeños entre la especie *Paracoccus pantotrophus* y las especies de *Bacillus*. En particular, se observaron efectos antagonistas pequeños entre la especie *Paracoccus pantotrophus* y las especies de *Bacillus* seleccionadas del grupo siguiente: *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus circulans* y *Bacillus subtilis*. Además, el rendimiento de las especies de *Bacillus* con respecto a la eliminación del fósforo no resultó afectado y se mantuvo una excelente reducción del nitrógeno por *Paracoccus*. Por lo tanto, la mezcla resultante es una combinación ideal para empobrecer el agua de piscinas y estanques biológicamente filtrados, impidiendo de esta manera el crecimiento algal. Además, un agente bacteriano que comprende una proporción en peso de bacterias seleccionadas del género *Bacillus* a bacterias seleccionadas del género *Paracoccus* de entre aproximadamente 70:1 y 5:1 se observó que resultaba particularmente eficiente en su eliminación de la materia orgánica sin la acumulación de nitrato, nitrito o fósforo. Se ilustran resultados similares en el Ejemplo 4.

En una realización de la invención, el agente bacteriano comprende la especie *Pseudomonas stutzeri*. En una realización adicional de la invención, la especie de *Pseudomonas stutzeri* es la cepa *Pseudomonas stutzeri* LMG 2243.

Los inventores incluyeron la especie *Pseudomonas stutzeri*, ya que dicha especie resulta inesperadamente eficiente en su eliminación del nitrógeno.

En una realización preferente de la invención, el agente bacteriano comprende una o más especies seleccionadas del género *Paenibacillus*, caracterizado porque la especie o especies seleccionadas del género *Paenibacillus* comprenden una o más especies seleccionadas del grupo siguiente: *Paenibacillus alvei*, *Paenibacillus azotofixans*, *Paenibacillus dendritiformis*, *Paenibacillus durum*, *Paenibacillus koreensis*, *Paenibacillus larvae*, *Paenibacillus thailandensis*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus popilliae*, *Paenibacillus tylopili*, *Paenibacillus vortex*, *Paenibacillus vulneris*, preferentemente *Paenibacillus polymyxa* o *Paenibacillus thailandensis*, lo más preferentemente *Paenibacillus polymyxa*.

Las cremas solares y los textiles que llevan los bañistas son responsables de las pequeñas concentraciones de hidrocarburos en el agua de las piscinas, en particular tintes textiles y alcohol polivinílico (PVA). Aunque las concentraciones excretadas son bajas, existe la posibilidad de que dichos contaminantes se acumulen y afecten a la salud de la vida acuática, así como a la salud de los bañistas. Para degradar dichos contaminantes, las especies de *Paenibacillus* pueden producir diversos enzimas que metabolizan los contaminantes orgánicos alifáticos y aromáticos, incluyendo enzimas oxigenasas, deshidrogenasas y lignolíticos. Los inventores han observado que mediante la incorporación de especies de *Paenibacillus*, puede mantenerse la salud acuática de las piscinas y evitarse la acumulación de contaminantes.

Además, las especies de *Paenibacillus* producen enzimas quitinasas, que es un polisacárido estructural de los exoesqueletos de insectos y recubrimientos intestinales, llevando a bajas tasas de alimentación y a la muerte de los insectos infectados. Mediante la incorporación de especies de *Paenibacillus* en el agente bacteriano, se mantiene la diversidad acuática y no puede proliferar ninguna especie.

En una realización de la invención, el agente bacteriano comprende una o más especies seleccionadas del grupo de *Paenibacillus polymyxa* o *Paenibacillus thailandensis*. En una realización adicional de la invención, el agente bacteriano comprende la especie *Paenibacillus polymyxa*.

El inventor ha observado inesperadamente que los agentes bacterianos que comprenden la especie *Paenibacillus polymyxa* o *Paenibacillus thailandensis*, y más en particular *Paenibacillus polymyxa*, fueron los más eficientes en su eliminación de contaminantes originados en, por ejemplo, cremas solares o textiles.

En una realización preferente de la invención, el agente bacteriano comprende una proporción en peso de bacterias seleccionadas del género *Bacillus* a bacterias seleccionadas del género *Paenibacillus* de entre aproximadamente 10:1 y 1:1, preferentemente de entre aproximadamente 7:1 y 2:1, lo más preferentemente de entre aproximadamente 6:1 y 3:1.

Los inventores observaron inesperadamente que los agentes bacterianos que comprendían una proporción en peso de bacterias seleccionadas del género *Bacillus* a bacterias seleccionadas del género *Paenibacillus* de entre aproximadamente 10:1 y 1:1, rendían los mejores resultados con respecto a la eliminación de contaminantes, por ejemplo originados en cremas solares y textiles, conservando simultáneamente la capacidad de eliminar el nitrógeno y fósforo inorgánicos.

En una realización preferente de la invención, el agente bacteriano comprende una proporción en peso de bacterias seleccionadas del género *Bacillus*, a bacterias seleccionadas del género *Paracoccus*, y a bacterias seleccionadas del género *Paenibacillus* de entre aproximadamente 125:25:1 y 4,5:1,3:1, preferentemente de entre aproximadamente 100:20:1 y 10:2,5:1, lo más preferentemente de entre aproximadamente 70:15:1 y 15:5:1.

Los inventores observaron inesperadamente que los agentes bacterianos que comprendían una proporción en peso de bacterias seleccionadas del género *Bacillus* a bacterias seleccionadas del género *Paracoccus* y a bacterias seleccionadas del género *Paenibacillus* de entre aproximadamente 125:25:1 y 4,5:1,3:1 rendían los mejores resultados con respecto a la eliminación de contaminantes, por ejemplo originados en cremas solares y textiles, conservando simultáneamente la capacidad de degradar por completo la materia orgánica sin la acumulación de nitrato, nitrito y fósforo.

En una realización preferente de la invención, el agente bacteriano comprende: una cepa de *Bacillus pumilus* en una proporción en peso de entre aproximadamente 4,0 % p/p y 16 % p/p, preferentemente de entre aproximadamente 6,0 % p/p y 14 % p/p, lo más preferentemente de entre aproximadamente 7,0 % p/p y 12 % p/p; una cepa de *Bacillus licheniformis* en una proporción en peso de entre aproximadamente 5,0 % p/p y 16 % p/p, preferentemente de entre aproximadamente 7,0 % p/p y 14 % p/p, lo más preferentemente de entre aproximadamente 8,0 % p/p y 12 % p/p; una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* en una proporción en peso de entre aproximadamente 5,0 % p/p y 16 % p/p, preferentemente de entre aproximadamente 7,0 % p/p y 14 % p/p, lo más preferentemente de entre aproximadamente

8,0 % p/p y 12 % p/p; una cepa de *Bacillus circulans* en una proporción en peso de entre aproximadamente 5,0 % p/p y 16 % p/p, preferentemente de entre aproximadamente 7,0 % p/p y 14 % p/p, lo más preferentemente de entre aproximadamente 8,0 % p/p y 12 % p/p; una cepa de *Bacillus subtilis* en una proporción en peso de entre aproximadamente 5,0 % p/p y 16 % p/p, preferentemente de entre aproximadamente 7,0 % p/p y 14 % p/p, lo más preferentemente de entre aproximadamente 8,0 % p/p y 12 % p/p; una cepa de *Paracoccus pantotrophus* en una proporción en peso de entre aproximadamente 1,0 % p/p y 7 % p/p, preferentemente de entre aproximadamente 1,5 % p/p y 6,5 % p/p, lo más preferentemente de entre aproximadamente 3,0 % p/p y 6,0 % p/p; y una cepa de *Paenibacillus polymyxa* en una proporción en peso de entre aproximadamente 7,0 % p/p y 16 % p/p, preferentemente de entre aproximadamente 8,0 % p/p y 14 % p/p, lo más preferentemente de entre aproximadamente 9,0 % p/p y 12 % p/p.

Los inventores observaron inesperadamente que agentes bacterianos que comprendían: una cepa de *Bacillus pumilus* en una proporción en peso de entre aproximadamente 4,0 % p/p y 16 % p/p, una cepa de *Bacillus licheniformes* en una proporción en peso de entre aproximadamente 5,0 % p/p y 16 % p/p, una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* en una proporción en peso de entre aproximadamente 5,0 % p/p y 16 % p/p, una cepa de *Bacillus circulans* en una proporción en peso de entre aproximadamente 5,0 % p/p y 16 % p/p, una cepa de *Bacillus subtilis* en una proporción en peso de entre aproximadamente 5,0 % p/p y 16 % p/p, una cepa de *Paracoccus pantotrophus* en una proporción en peso de entre aproximadamente 1,0 % p/p y 7 % p/p, y una cepa de *Paenibacillus polymyxa* en una proporción en peso de entre aproximadamente 7,0 % p/p y 16 % p/p, rindió resultados todavía mejores con respecto a la eliminación de contaminantes, por ejemplo originados en cremas solares y textiles, conservando simultáneamente la capacidad de degradar completamente la materia orgánica sin la acumulación de nitrato, nitrito y fósforo.

En una realización preferente de la invención, la composición son unos polvos humectables, una suspensión acuosa, una emulsión acuosa, o combinaciones de los mismos, preferentemente una suspensión acuosa y/o una emulsión acuosa.

Mediante la utilización de unos polvos humectables, una suspensión acuosa, una emulsión acuosa o combinaciones de los mismos, la composición se dispersa por completo con la adición de agua. Las composiciones que no están totalmente dispersadas con la adición de agua presentan la desventaja de que la superficie de contacto es más reducida en comparación con las composiciones totalmente dispersadas, limitando de esta manera la eficiencia de los diferentes agentes en la composición. En una realización específica de la invención, la composición comprende, además, un agente dispersante.

En una realización preferente de la invención, la composición comprende, además, un agente de conservación en una proporción en peso de entre aproximadamente 10 % p/p y 50 % p/p, preferentemente de entre aproximadamente 20 % p/p y 40 % p/p, lo más preferentemente de entre aproximadamente 25 % p/p y 35 % p/p.

Para la conservación a largo plazo, las bacterias habitualmente se liofilizan o se secan por pulverización. Para reactivar las bacterias que han sido tratadas de esta manera, se requieren unos cuantos días a unas cuantas semanas según la cepa. Durante ese periodo, el agua experimenta cambios significativos debido al desarrollo progresivo de todas las cepas bacterianas. Tal como en las piscinas, por ejemplo en piscinas biológicas, no puede utilizarse ningún desinfectante para clarificar el agua, puede haber un periodo inicial en el que la piscina puede verse afectada por floraciones algales. Mediante la incorporación de un agente de conservación, se protege el agente bacteriano de daños durante la congelación, liofilización, descongelación, almacenamiento o cualquier otra manipulación. Debido a que el agente bacteriano está protegido, se acorta el periodo de reactivación y no se requiere ninguna preactivación del agente bacteriano previamente a la adición a agua. Los inventores observaron que las concentraciones de los agentes de conservación de entre aproximadamente 10 % p/p y 50 % p/p rendían los mejores resultados.

En una realización preferente de la invención, el agente de conservación de la composición es un crioprotector, en donde el crioprotector es preferentemente propilenglicol o una variante del mismo.

La incorporación de un crioprotector protege específicamente las células bacterianas frente a daños durante la congelación, liofilización, descongelación o almacenamiento. Además, los inventores observaron que el propilenglicol rendía los mejores resultados, tal como se ilustra en el Ejemplo 6.

En una realización de la invención, se añadió propilenglicol a una concentración de aproximadamente 30 % p/p.

En una realización preferente de la invención, la composición comprendía, además, un agente enzimático y/o un agente mineral.

La adición del agente enzimático permite la digestión de materiales poliméricos, reduciendo de esta manera el tiempo necesario para la degradación de materia orgánica polimérica o contaminantes poliméricos. La combinación del agente bacteriano con un agente enzimático resulta en un efecto sinérgico que permite la rápida eliminación de contaminantes.

Sin la adición del agente mineral, el crecimiento de los microorganismos se ve comprometido, lo que a su vez afecta a su capacidad de degradar contaminantes. La combinación del agente bacteriano con un agente mineral resulta en un efecto sinérgico que permite la rápida eliminación de contaminantes.

5 En una realización preferente de la invención, el agente enzimático comprende uno o más enzimas seleccionados del grupo de peroxidasas, lignina peroxidasas, lacasas, catalasas, citocromo-c oxidasas, glucosa oxidasas, fenol oxidasas, n- y o-desmetilasas, proteasas, lipasas, alfa-amilasas y bacteriocinas.

10 Una composición que comprende un enzima enzimático muestra sinergia y elimina eficazmente los contaminantes de una piscina. Los enzimas disocian las moléculas de contaminante en formas más simples y los microorganismo utilizan estos compuestos intermedios simples en sus actividades metabólicas, degradando por completo de esta manera los contaminantes en las aguas residuales. Los microorganismos crecen más rápido debido a la creciente disponibilidad de compuestos intermedios simples y producen más enzimas que pueden degradar adicionalmente los contaminantes. La adición del agente enzimático es particularmente pertinente en el caso de que la composición se añada a la piscina por primera vez. La disociación mediada por el enzima de las moléculas de contaminante ayuda de esta manera a la colonización inicial de la piscina.

20 En una realización preferente de la invención, el agente mineral comprende un agente macroelemento y un agente de elemento traza, en donde dicho agente macroelemento comprende uno o más macroelementos seleccionados del grupo siguiente: sulfato de magnesio, cloruro sódico, carbonato sódico, bicarbonato sódico, cloruro cálcico, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio y sulfato potásico, preferentemente carbonato sódico, bicarbonato sódico, cloruro cálcico y sulfato de magnesio, y en donde dicho agente elemento traza comprende uno o más iones o compuestos de los metales siguientes: cobre, cobalto, cromo, molibdeno, níquel, tungsteno y zinc.

25 El agente macroelemento potencia directamente el crecimiento y sostenimiento de los microorganismos en la piscina y/o el filtro, los cuales son responsables de utilizar las moléculas más simples en sus actividades metabólicas, ayudando de esta manera a la degradación completa de los contaminantes en el agua. Sin los nutrientes del agente macroelemento, el crecimiento de los microorganismos se ve comprometido lo que a su vez afecta a su capacidad de degradar contaminantes.

30 El agente elemento traza comprende sales inorgánicas de iones metálicos, las cuales son necesarias para la catálisis enzimática, facilitando la disociación de enlaces de la molécula de contaminante, lo que resulta importante, ya que cuanto antes se disocian los enlaces, antes se degradarán los contaminantes. En una realización de la invención, se añade sulfato ferroso heptahidratado y cloruro férrico a la composición para proporcionar una mezcla de iones  $Fe^{2+}$  y  $Fe^{3+}$ . En la presencia de  $Fe^{2+}$ , los enzimas presentan una capacidad mayor de catalizar la disociación de enlaces de las moléculas de contaminante. Además,  $Fe^{2+}$  ayuda al metabolismo de las células microbianas. En ausencia de  $Fe^{2+}$ , la degradación de contaminantes se ve comprometida. En una realización adicional de la invención, se añade peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno libera oxígeno molecular, que facilita la catálisis enzimática. El peróxido de hidrógeno además reacciona con el  $Fe^{2+}$  y reduce el color producido por esta reacción.

40 Tal como podrá entenderse, el agente bacteriano, el agente nutricional y el agente cofactor colaboran estrechamente para facilitar la degradación de moléculas de contaminante.

45 En una realización de la invención, el agente mineral comprende una o más sales seleccionadas del grupo de carbonato sódico, bicarbonato sódico, cloruro cálcico y sulfato de magnesio. En una realización adicional de la invención, el agente mineral comprende una o más sales seleccionadas del grupo de carbonato sódico, bicarbonato sódico, cloruro cálcico y sulfato de magnesio, en donde dichas sales se dosifican a una piscina.

50 El metabolismo bacteriano de las especies comprendidas en los agentes bacterianos requiere unos cuantos días para resultar eficaz. Durante ese periodo pueden producirse floraciones algales. Debido a que en una piscina verdaderamente biológica no puede utilizarse ningún desinfectante para clarificar el agua, resulta muy difícil cruzar dicho periodo de transición sin que se produzca una floración algal. Una vez una piscina ha resultado afectada por una floración algal, debe preverse un periodo largo para clarificar nuevamente la piscina de materias biológicas. Por lo tanto, es de la máxima importante que durante este periodo de transición no se produzcan floraciones algales. Por lo tanto, la adición de un agente bacteriano excelente al agua es clave, pero no suficiente. También se requiere un equilibrio calcocarbónico adecuado. Este equilibrio actuará como un tampón para evitar cambios significativos de la calidad del agua durante el tiempo, los ciclos circadianos, las condiciones meteorológicas y la mayor parte de otros parámetros externos. Es clave a dicha capacidad tamponadora la proporción de dureza total (DT) a dureza de carbonatos (DC). Los inventores han observado que las sales carbonato sódico, bicarbonato sódico, cloruro cálcico y sulfato de magnesio son las más adecuadas para mantener la proporción de dureza total (DT) a dureza de carbonatos (DC).

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método para la preparación de la composición.

Las bacterias en el agente bacteriano según la invención pueden producirse utilizando cualquier procedimiento estándar de fermentación conocido de la técnica. Por ejemplo, la fermentación en sustrato sólido o sumergida en un líquido. Los cultivos fermentados pueden ser cultivos mixtos o aislados individuales.

5 En una realización preferente de la invención, las especies del agente bacteriano se fermentan individualmente y se recolectan.

En algunas realizaciones, las bacterias se fermentan aeróbicamente. Para aquellas bacterias capaces de formar esporas, el procedimiento de fermentación incluye una etapa de “choque” para inducir que las bacterias pasen a la forma espora. Cualquier método de “choque” conocido de la técnica resulta adecuado para este procedimiento. Por ejemplo, la fermentación puede someterse a choque térmico para conseguir la esporulación. En algunas realizaciones, las bacterias se fermentan anaeróbicamente en la presencia de carbohidratos. Entre los carbohidratos adecuados se incluyen inulina, fructooligosacáridos y glucoligosacáridos. Mediante la fermentación individual y recolección de las diferentes especies del agente bacteriano puede ajustarse fácilmente la composición. De esta manera, permite una mayor grado de flexibilidad durante la producción. Además, mediante la fermentación de cada especie por separado, se cultiva cada especie bajo condiciones óptimas para su crecimiento.

En una realización preferente de la invención, cada una de las especies del agente bacteriano se seca individualmente. Tras fermentar individualmente y recolectar cada especie, las especies recolectadas se secan individualmente. Mediante el secado individual de las diferentes especies, se ajusta fácilmente la composición. De esta manera, permite un mayor grado de flexibilidad durante la producción. En una realización específica de la invención, las especies secas se trituran para producir unos polvos. En una realización adicional de la invención, las especies trituradas se combinan para producir las composiciones preferentes finales.

25 En una realización de la invención, la mezcla microbiana final presenta un contenido de humedad inferior a aproximadamente 5 % y una concentración bacteriana final de entre aproximadamente  $10^5$  y  $10^{11}$  UFC/ml.

La concentración del agente mineral en la composición depende de los parámetros actuales del sistema de la piscina a la que se añade la composición. Entre estos parámetros del sistema se incluyen la DC, la DT y el pH, etc. Estos parámetros del sistema podrían determinarse o no determinarse utilizando un kit de ensayo estandarizado. La concentración del agente mineral en la composición puede comprender o no comprender una proporción en peso del agente mineral al agente bacteriano de entre aproximadamente 100000:1 y 1:1.

La concentración del agente enzimático en la composición depende de los parámetros actuales del sistema de la piscina a la que se añade la composición. Estos parámetros del sistema se refieren, por ejemplo, al tiempo hasta el arranque de la piscina. Tal como se ha comentado anteriormente en la presente memoria, la adición de un agente enzimático resulta particularmente pertinente en el caso de que la composición se añade a la piscina por primera vez, ya que la disociación mediada enzimáticamente de las moléculas de contaminante ayuda a la colonización inicial de la piscina. La concentración del agente enzimático en la composición puede comprender o no comprender una proporción en peso del agente enzimático a agente bacteriano de entre aproximadamente 1000:1 y 1:1000.

#### Descripción de las figuras

La descripción siguiente de las figuras de realizaciones específicas de la invención es de naturaleza meramente ejemplar y no pretende ser limitativa de las presentes enseñanzas, su aplicación o sus usos. En todos los dibujos, números de referencia iguales indican partes y características iguales o similares.

La figura 1 muestra un gráfico de la demanda química de oxígeno (DQO) de las diferentes combinaciones de cepas bacterianas A1, A2 y A3. La demanda química de oxígeno (DQO) se mantuvo constante durante 96 horas para todas las combinaciones de cepas. Tras 96 horas, con el grupo que comprendía las combinaciones de las cepas A1 y A2 se redujo significativamente. Con el grupo que comprendía las combinaciones de las cepas A1 y A3 no se redujo en absoluto.

La figura 2 muestra un gráfico de la variación del consumo de nitrato para las diferentes combinaciones de cepas bacterianas A1, A2 y A3. El grupo que comprendía las combinaciones de A1 y A2 tuvo el mejor rendimiento de asimilación de grandes cantidades de nitrato. Además, el grupo que comprendía las combinaciones A1 y A2 presentó el mejor rendimiento al prever concentraciones más altas de la cepa A2 en la combinación. Los grupos que comprendía las combinaciones A1 y A3 no consumieron nada de nitrato.

La figura 3 muestra un gráfico de la variación del consumo de nitrito para las diferentes combinaciones de cepas bacterianas A1, A2 y A3. Se observó una reducción de la concentración de nitrito con todas las combinaciones de cepas bacterianas. El grupo que comprendía las combinaciones A1 y A2 fue capaz de eliminar por completo el nitrato del agua.

La figura 4 muestra un gráfico de la variación del consumo de fósforo inorgánico para las diferentes combinaciones de cepas bacterianas A1, A2 y A3. Se observó una reducción de la concentración de fósforo en todas las combinaciones

de cepas bacterianas. El grupo que comprendía las combinaciones de A1 y A2 fue capaz de eliminar por completo el fósforo del agua. Se observó una degradación más rápido en el caso de que el grupo comprendiese una concentración más alta de A1 que de A2.

La figura 5 muestra un gráfico de la DQO de cepas puras y el grupo que comprendía la combinación de las cepas A1, A2 y A3 a partes iguales. El grupo que comprendía la combinación de las cepas A1, A2 y A3 a partes iguales rindió la reducción más grande de la DQO, seguido de la especie *Paracoccus*.

La figura 6 muestra un gráfico de la variación de la concentración de fósforo inorgánico para cepas puras y el grupo que comprende la combinación de las cepas A1, A2 y A3 a partes iguales. El grupo que comprendía la combinación de las cepas A1, A2 y A3 a partes iguales rindió la mayor reducción del fósforo, seguido de las especies de *Paracoccus*.

La presente invención no se encuentra limitada en modo alguno a las realizaciones mostradas en las figuras. Por el contrario, los métodos según la presente invención pueden realizarse de muchas maneras diferentes sin apartarse del alcance de la invención.

### Ejemplos

La invención se describe adicionalmente mediante los ejemplos no limitativos siguientes, que ilustran en mayor detalle la invención y no pretenden ser, ni debe interpretarse que son, limitativos del alcance de la invención.

#### Ejemplo 1

El Ejemplo 1 se refiere a la eficiencia de biodegradación de bacterias seleccionadas de colecciones de microorganismos y especímenes aislados de medios acuáticos. Dichas bacterias comprenden, entre otras, especies seleccionadas de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Paracoccus*. Todas las especies sometidas a ensayo se incubaron por separado con un sedimento orgánico muestreado de un estanque. Una primera observación realizada por los inventores fue que las bacterias del género *Bacillus* eran las más eficientes en la degradación de la materia orgánica. Las especies de *Bacillus* más eficientes se denominan posteriormente A1 a A4. La tasa de inoculación para los tratamientos biológicos varió entre  $6,0 \times 10^5$  y  $7,4 \times 10^7$  UFC/ml. Para la totalidad de dichas cepas, los inventores realizaron un seguimiento de la demanda de oxígeno en el sedimento del estanque durante periodos de 24 horas a lo largo de 5 días. La tabla a continuación ilustra estos resultados. Los valores se expresan en  $O_2$  mg l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Debido a que las especies A1 a A4 fueron las más eficientes en la degradación de la materia orgánica, se utilizaron como el punto de partida para ejemplos futuros y para la composición.

Tratamientos	control		A1		A2		A3		A4	
Periodo	media	±SD	media	±SD	media	±SD	media	±SD	media	±SD
0-24	2,31	0,68	2,90	0,79	4,05	0,61	3,38	0,94	3,79	0,95
24-48	2,53	0,99	3,22	1,02	3,52	1,38	2,81	0,97	3,05	1,14
48-72	1,91	0,68	2,31	0,99	2,60	0,95	2,18	0,66	2,21	0,58
72-96	1,25	0,85	1,30	0,58	2,31	0,63	1,75	0,93	1,89	0,55
96-120	1,70	0,64	1,61	1,04	2,13	1,26	1,80	0,84	1,34	0,97

#### Ejemplo 2

El Ejemplo 2 se refiere a la capacidad de un grupo de especies de competir eficientemente con el crecimiento del fitoplancton. Se hace referencia posteriormente en la presente memoria a las especies que se analizaron como A1 a A4. El contenido de materia orgánica es rico en fuentes de carbono que pueden ser utilizadas por los microorganismos heterotróficos. Además, la materia orgánica resulta necesaria tanto para la generación de energía como para el mantenimiento constitutivo de las células. El mantenimiento constitutivo de las células requiere compuestos como el fósforo y el nitrógeno. Debido a que el nitrógeno puede ser fijado por las bacterias diazotróficas, aparentemente el fósforo es el elemento más limitante en los sistemas acuáticos. Por lo tanto, la incorporación de fósforo por las bacterias heterotróficas debería competir eficientemente con el crecimiento del fitoplancton.

Las condiciones aeróbicas resultan adecuadas para el crecimiento de *Bacillus*, que generalmente requiere cualesquiera formas inorgánicas de nitrógeno y fósforo. Bajo condiciones anóxicas, solo las especies anaeróbicas facultativas de *Bacillus* son capaces de utilizar el nitrato o el nitrito como aceptor de electrones en lugar del oxígeno (A4 es clásicamente un aerobio estricto que no es capaz de incorporar el fosfato bajo condiciones anóxicas). Además, la falta de oxígeno reduce el equilibrio energético. En consecuencia, el fósforo asimilado por unidad de DQO (demanda química de oxígeno) también resulta afectado negativamente por la ausencia de oxígeno. Para la cepa A3, el fósforo asimilado por unidad de DQO se reduce a la mitad bajo condiciones anóxicas. El contenido de fósforo en lo sucesivo se denomina P.

mg P/g DQO				
Condición	Aeróbica		Anóxica	
	Media	± SD	Media	± SD
A1	-13,6	1,1	-13,5	1,1
A2	-17,0	0,1	-14,5	3,2
A3	-27,8	0,6	-13,7	2,4
A4	-37,7	14,6	x	x
P	-3,8	4,5	1,5	0,6

Basándose en estos resultados, los inventores pudieron seleccionar las cepas según las condiciones de oxígeno: aeróbicas o anaeróbicas. Las cepas A3 y A4 son las más eficientes bajo condiciones aeróbicas, mientras que A1, A2 y A3 presentan actividades metabólicas similares bajo condiciones anaeróbicas. A4 fue la única cepa que era una bacteria estrictamente aeróbica.

### Ejemplo 3

El Ejemplo 3 se refiere al análisis del completado adecuado del ciclo del nitrógeno. Como indicador del completado adecuado del ciclo de nitrógeno, se sometieron a ensayo las cepas seleccionadas para su capacidad de reducir la DQO, la concentración de fósforo, la concentración de nitrato y la concentración de nitrito. Las especies que se analizaron se denominan en lo sucesivo A1 a A4. Las cepas se combinaron según la distribución siguiente.

	A1	A2	A3
A1<A2	20 %	80 %	/
A1=A2	50 %	50 %	/
A1>A2	80 %	20 %	/
A1<A3	20 %	/	80 %
A1=A3	50 %	/	50 %
A1>A3	80 %	/	20 %

Utilizando la concentración de inoculación inicial de  $10^6$  UFC/ML sobre agua que contenía nitratos, nitritos, amonio y fósforo inorgánico en las concentraciones siguientes: 50, 10, 25 y 12 ppm, se llevó a cabo el seguimiento de la actividad de los diferentes grupos durante 11 días.

Los resultados se ilustran en las figuras 1 a 4. La DQO se mantuvo constante durante 96 horas para todas las combinaciones de cepas. Tras 96 horas, los grupos que comprendían las combinaciones A1 y A2 y las combinaciones de A1 y A3 incrementaron inesperadamente su consumo de materia orgánica. El grupo que comprendía las combinaciones de A1 y A2 presentaron el mejor rendimiento de asimilación de grandes cantidades de nitrato. Además, el grupo que comprendía las combinaciones de A1 y A2 presentaron el mejor rendimiento al prevenir concentraciones más altas de la cepa A2 en la combinación. El grupo que comprendía las combinaciones de A1 y A3 no consumió nada de nitrato. Se observó una reducción de la concentración de nitrito con todas las combinaciones de cepas bacterianas. El grupo que comprendía las combinaciones de A1 y A2 fue capaz de eliminar por completo el nitrato del agua. Se observó una reducción de la concentración de fósforo con todas las combinaciones de cepas bacterianas. El grupo que comprendía las combinaciones de A1 y A2 fue capaz de eliminar por completo la concentración de fósforo del agua. Se observó una degradación más rápida en el caso de que el grupo comprendiese una concentración más alta de A1 que de A2.

En conclusión, los resultados mostraron una fuerte influencia de las diferentes cepas sobre los rendimientos. Los rendimientos individuales de las diferentes cepas solo pueden explicarse por fuertes interacciones y efectos antagonistas y agonistas entre las diferentes cepas.

### Ejemplo 4

El Ejemplo 4 se refiere al análisis del completado adecuado del ciclo del nitrógeno. Como indicador del completado adecuado del ciclo de nitrógeno, se sometieron a ensayo las cepas seleccionadas para su capacidad de reducir la DQO, la concentración de fósforo y la concentración de nitrito. Las especies que se analizaron se denominan en lo sucesivo A1 a A4. Las cepas se combinaron en grupos de 3 o en grupos de 4. Todas las cepas se añadieron a partes iguales. Las especies de *Paracoccus* se analizaron por separado. Se realizó un seguimiento de la actividad de los diferentes grupos durante 11 días.

Las figuras 5 y 6 ilustran la reducción de la DQO y la reducción de la concentración de fósforo, respectivamente. El grupo que comprendía la combinación de las cepas A1, A2 y A3 a partes iguales rindió la mayor reducción de la DQO, seguido de las especies de *Paracoccus*. De manera similar, el grupo que comprendía la combinación de las cepas A1, A2 y A3 a partes iguales rindió la reducción más grande de fósforo, seguido de las especies de *Paracoccus*.

Para resumir se clasificaron todas las combinaciones según la reducción del fósforo y del nitrato. La ordenación se estableció basándose en el rendimiento tras 72 h. Además, los tratamientos que permitieron una reducción superior a 85 % del fósforo inorgánico en 168 h se han destacado en ambas tablas. La tabla a continuación ilustra la reducción de la concentración de nitrato. La reducción más grande de la concentración de nitrato se observó tras 168 horas, con un 79 %, con el grupo que comprendía la combinación de las cepas A1, A3 y A4 a partes iguales.

Combinaciones	Reducción de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	
	72 h	168 h
A1 = A2 = A3	50 %	58 %
A1 = A2 = A4	59 %	70 %
A1 = A3 = A4	49 %	79 %
A2 = A3 = A4	52 %	63 %
A1 = A2 = A3 = A4	52 %	64 %

Los resultados de la reducción del fósforo y del nitrato se resumen en la tabla a continuación. El grupo que comprendía la combinación de las cepas A1, A2 y A3 a partes iguales rindió la mayor reducción de la concentración de fósforo. Sin embargo, la mayor reducción total de tanto la concentración de fósforo como de nitrato se observó con el grupo que comprendía la combinación de las cepas A1, A2, A3 y A4 a partes iguales.

Reducción del fósforo (P)			
Tratamiento	72 h	168 h	Orden
A1 = A3 = A4	57 %	93 %	1
A1 = A2 = A3	57 %	83 %	2
A1 = A2 = A3 = A4	55 %	86 %	3
A1 > A3	54 %	81 %	4
A3 > A4	53 %	83 %	5
A3 < A4	53 %	93 %	6
A1 < A4	53 %	94 %	7
A3 = A4	52 %	78 %	8
A2 = A3 = A4	52 %	83 %	9
A3	52 %	70 %	10
A2 < A3	51 %	72 %	11
A1 = A3	51 %	79 %	12
A1 < A3	50 %	77 %	13
A2 = A3	49 %	78 %	14
A1 = A4	48 %	84 %	15
A2 = A4	47 %	92 %	16
A2 > A3	42 %	53 %	17
A2 < A4	42 %	62 %	18
A1 = A2 = A4	40 %	77 %	19
A1 > A2	37 %	64 %	20
A2 > A4	36 %	36 %	21
A2	33 %	32 %	22
A1 = A2	31 %	32 %	23
A1 < A2	29 %	42 %	24
A1 > A4	27 %	25 %	25
A1	27 %	26 %	26
A4	22 %	21 %	27
<i>Paracoccus</i>	19 %	22 %	28

Reducción del nitrato (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )			
Tratamiento	72 h	168 h	Orden
<i>Paracoccus</i>	99 %	99 %	1
A4	86 %	88 %	2
A2	79 %	83 %	3
A3	72 %	88 %	4
A1	72 %	73 %	5
A1 > A2	62 %	79 %	6
A2 > A3	60 %	58 %	7
A1 = A2 = A4	59 %	70 %	8
A1 = A2	58 %	60 %	9
A2 < A4	56 %	54 %	10
A2 = A4	55 %	67 %	11
A1 > A4	55 %	47 %	12
A3 > A4	53 %	49 %	13
A1 = A2 = A3 = A4	52 %	64 %	14
A2 = A3 = A4	52 %	63 %	15
A2 < A3	52 %	55 %	16
A3 = A4	52 %	50 %	17
A2 = A3	51 %	55 %	18
A1 > A3	50 %	59 %	19
A1 < A3	50 %	64 %	20
A1 = A2 = A3	50 %	58 %	21
A1 = A3 = A4	49 %	79 %	22
A2 > A4	48 %	43 %	23
A1 < A4	48 %	51 %	24
A1 = A3	47 %	72 %	25
A3 < A4	45 %	47 %	26
A1 = A4	44 %	53 %	27
A1 < A2	43 %	62 %	28

En conclusión, los resultados mostraron una fuerte influencia de las diferentes cepas sobre los rendimientos. Los rendimientos individuales de las diferentes cepas solo pueden explicarse por fuertes interacciones y efectos antagonistas y agonistas entre las diferentes cepas.

#### Ejemplo 5

El Ejemplo 5 se refiere al análisis de la capacidad de las diferentes cepas de reducir el nitrato a gas nitrógeno. Tal como se ha ilustrado mediante los ejemplos anteriores, los inventores seleccionaron combinaciones de cepas bacterianas que eran capaces de completar adecuadamente el ciclo del nitrógeno. Sin embargo, el final de la ruta oxidativa del ciclo del nitrógeno es el nitrato, que puede acumularse en el medio. Por lo tanto, con el fin de evitar el crecimiento algal, debe eliminarse el nitrato.

Se seleccionaron bacterias a partir de colecciones de microorganismos y especímenes aislados de medios acuáticos. Dichas bacterias comprenden, entre otras, especies seleccionadas de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y

*Paracoccus*, que seguidamente se analizaron basándose en su capacidad de reducir el nitrato a gas nitrógeno. Se analizó la actividad enzimática de la óxido nítrico reductasa (Nor) y la óxido nitroso reductasa (Nos) para todas las diferentes especies. *Paracoccus* sp. rindió una contribución pequeña a la reducción del fósforo, aunque una reducción máxima del nitrito y el nitrato. Además, inesperadamente no se observó ningún efecto antagonista entre *Paracoccus* sp. y las diferentes especies de *Bacillus*. Estos resultados fueron pertinentes en particular a las cepas de *Paracoccus pantotrophus*.

#### Ejemplo 6

El Ejemplo 6 se refiere a la reactivación más rápida de las bacterias. Para la conservación a largo plazo, las bacterias normalmente se liofilizan o se secan por pulverización. Para reactivar las bacterias que han sido tratadas de esta manera, se requieren unos cuantos días a unas cuantas semanas, según la cepa. Durante ese periodo, el agua experimenta cambios significativos debido al progresivo desarrollo de todas las cepas bacterianas. Por lo tanto, podría haber un periodo inicial durante el enriquecimiento de la biofiltración cuando la piscina se viese afectada por floraciones algales.

Para reducir dicho periodo, se requiere una reactivación más rápida de las bacterias utilizadas en la composición. Los inventores llevaron a cabo una serie de experimentos utilizando diferentes agentes de conservación. De media, la adición de los diferentes agentes de conservación resultó en una reducción del tiempo de reactivación de entre 15 a 20 días y 10 a 14 días. La conservación a largo plazo de las bacterias en propilenglicol al 30 % inesperadamente permitió la reactivación más rápida de todos los agentes de conservación sometidos a ensayo. Para concentraciones de aproximadamente 30 % p/p de propilenglicol, la reducción del tiempo de reactivación fue de entre 15 a 20 días y 2 a 5 días, lo que sugiere una fuerte interacción entre el propilenglicol y los diferentes constituyentes de la composición.

#### Ejemplo 7

El Ejemplo 7 se refiere a una composición simple según la presente invención. La composición simple comprende únicamente un agente bacteriano. Dicho agente bacteriano comprende una mezcla de especies seleccionadas de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Paracoccus*.

Los ejemplos de la composición según la presente invención se ilustran a continuación. Las concentraciones bacterianas se expresan en UFC/ml.

	Ejemplo A	Ejemplo B	Ejemplo C	Ejemplo D
<i>Bacillus circulans</i>	5,00x10 <sup>7</sup>	2,33x10 <sup>7</sup>	2,75x10 <sup>7</sup>	2,75x10 <sup>7</sup>
<i>Bacillus licheniformis</i>	5,00x10 <sup>7</sup>	1,80x10 <sup>7</sup>	2,75x10 <sup>7</sup>	2,75x10 <sup>7</sup>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5,00x10 <sup>7</sup>	1,80x10 <sup>7</sup>	2,75x10 <sup>7</sup>	2,75x10 <sup>7</sup>
<i>Bacillus pumilus</i>	5,00x10 <sup>7</sup>	1,49x10 <sup>7</sup>	2,75x10 <sup>7</sup>	2,75x10 <sup>7</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	5,00x10 <sup>7</sup>	1,88x10 <sup>7</sup>	2,75x10 <sup>7</sup>	2,75x10 <sup>7</sup>
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	5,00x10 <sup>7</sup>	3,00x10 <sup>7</sup>	2,75x10 <sup>7</sup>	2,75x10 <sup>7</sup>
<i>Paracoccus</i> sp.	2,00x10 <sup>7</sup>	1,00x10 <sup>7</sup>	2,00x10 <sup>6</sup>	5,00x10 <sup>6</sup>

REIVINDICACIONES

1. Composición adecuada para optimizar un tratamiento biológico de piscinas, en donde la composición comprende un agente bacteriano, y en donde dicho agente bacteriano comprende una mezcla de especies seleccionadas de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Paracoccus*, caracterizada porque el agente bacteriano comprende una proporción en peso de bacterias seleccionadas del género *Paracoccus* a bacterias seleccionadas del género *Paenibacillus* de entre aproximadamente 1:1 y 15:1, preferentemente de entre aproximadamente 2:1 y 13:1, lo más preferentemente de entre aproximadamente 3:1 y 10:1, en la que el agente bacteriano comprende bacterias seleccionadas del género *Bacillus* en una proporción en peso de entre aproximadamente 60 % p/p y 95 % p/p.
2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque el agente bacteriano comprende bacterias seleccionadas del género *Bacillus* en una proporción en peso de entre aproximadamente 65 % p/p y 90 % p/p, más preferentemente de entre aproximadamente 70 % p/p y 87,5 % p/p, lo más preferentemente de entre aproximadamente 75 % p/p y 85 % p/p.
3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 y 2, caracterizada porque el agente bacteriano comprende una proporción en peso de bacterias seleccionadas del género *Bacillus* a bacterias seleccionadas del género *Paracoccus* de entre aproximadamente 70:1 y 5:1, preferentemente de entre aproximadamente 60:1 y 10:1, más preferentemente de entre aproximadamente 50:1 y 15:1, lo más preferentemente de entre aproximadamente 40:1 y 20:1.
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 3, caracterizada porque el agente bacteriano comprende una proporción en peso de bacterias seleccionadas del género *Bacillus* a bacterias seleccionadas del género *Paenibacillus* de entre aproximadamente 10:1 y 1:1, preferentemente de entre aproximadamente 7:1 y 2:1, lo más preferentemente de entre aproximadamente 6:1 y 3:1.
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 4, caracterizada porque el agente bacteriano comprende una proporción en peso de bacterias seleccionadas del género *Bacillus* a bacterias seleccionadas del género *Paracoccus* y a bacterias seleccionadas del género *Paenibacillus* de entre aproximadamente 125:25:1 y 4,5:1,3:1, preferentemente de entre aproximadamente 100:20:1 y 10:2,5:1, lo más preferentemente de entre aproximadamente 70:15:1 y 15:5:1.
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el agente bacteriano comprende una o más especies seleccionadas del género *Bacillus*, caracterizada porque la especie o especies seleccionadas del género *Bacillus* comprende una o más especies seleccionadas del grupo de *Bacillus pumilus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus circulans* y *Bacillus subtilis*.
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 6, caracterizada porque el agente bacteriano comprende:
  - una cepa de *Bacillus pumilus* en una proporción en peso de entre aproximadamente 4,0 % p/p y 16 % p/p, preferentemente de entre aproximadamente 6,0 % p/p y 14 % p/p, lo más preferentemente de entre aproximadamente 7,0 % p/p y 12 % p/p;
  - una cepa de *Bacillus licheniformis* en una proporción en peso de entre aproximadamente 5,0 % p/p y 16 % p/p, preferentemente de entre aproximadamente 7,0 % p/p y 14 % p/p, lo más preferentemente de entre aproximadamente 8,0 % p/p y 12 % p/p;
  - una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* en una proporción en peso de entre aproximadamente 5,0 % p/p y 16 % p/p, preferentemente de entre aproximadamente 7,0 % p/p y 14 % p/p, lo más preferentemente de entre aproximadamente 8,0 % p/p y 12 % p/p;
  - una cepa de *Bacillus circulans* en una proporción en peso de entre aproximadamente 5,0 % p/p y 16 % p/p, preferentemente de entre aproximadamente 7,0 % p/p y 14 % p/p, lo más preferentemente de entre aproximadamente 8,0 % p/p y 12 % p/p;
  - una cepa de *Bacillus subtilis* en una proporción en peso de entre aproximadamente 5,0 % p/p y 16 % p/p, preferentemente de entre aproximadamente 7,0 % p/p y 14 % p/p, lo más preferentemente de entre aproximadamente 8,0 % p/p y 12 % p/p ;
  - una cepa de *Paracoccus pantotrophus* en una proporción en peso de entre aproximadamente 1,0 % p/p y 7 % p/p, preferentemente de entre aproximadamente 1,5 % p/p y 6,5 % p/p, lo más preferentemente de entre aproximadamente 3,0 % p/p y 6,0 % p/p; and
  - una cepa de *Paenibacillus polymyxa* en una proporción en peso de entre aproximadamente 7,0 % p/p y 16 % p/p, preferentemente de entre aproximadamente 8,0 % p/p y 14 % p/p, lo más preferentemente de entre aproximadamente 9,0 % p/p y 12 % p/p ;
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 7, caracterizada porque la composición son unos polvos humectables, una suspensión acuosa, una emulsión acuosa o una combinación de los mismos, preferentemente una suspensión acuosa y/o una emulsión acuosa.

- 5
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 8, caracterizada porque la composición comprende, además, un agente de conservación en una proporción en peso de entre aproximadamente 10 % p/p y 50 % p/p, preferentemente de entre aproximadamente 20 % p/p y 40 % p/p, lo más preferentemente de entre aproximadamente 25 % p/p y 35 % p/p.
- 10
10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 9, en la que el agente de conservación de la composición es un crioprotector, en la que el crioprotector es preferentemente propilenglicol o una variante del mismo.
- 15
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 10, caracterizada porque la composición comprende, además, un agente enzimático y/o un agente mineral.
12. Composición según la reivindicación 11, en la que el agente enzimático comprende uno o más enzimas seleccionados del grupo de peroxidasas, lignina peroxidasas, lacasas, catalasas, citocromo-c oxidasas, glucosa oxidasas, fenol oxidasas, n- y o-desmetilasas, proteasas, lipasas, alfa-amilasas y bacteriocinas.
- 20
13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 12, en la que el agente mineral comprende un agente macroelemento y un agente elemento traza, en la que dicho agente macroelemento comprende uno o más macroelementos seleccionados del grupo de sulfato de magnesio, cloruro sódico, carbonato sódico, bicarbonato sódico, cloruro cálcico, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio y sulfato potásico, preferentemente carbonato sódico, bicarbonato sódico, cloruro cálcico y sulfato de magnesio, y en la que dicho agente elemento traza comprende uno o más iones o compuestos de los metales siguientes: cobre, cobalto, cromo, molibdeno, níquel, tungsteno y zinc.
- 25
14. Utilización de la composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 13 en piscinas, y lo más preferentemente en piscinas biológicas.
- 30
15. Método para la preparación de la composición según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 13, en el que cada una de las especies del agente bacteriano se fermentan y recolectan individualmente, en el que cada una de las especies del agente bacteriano se seca individualmente.

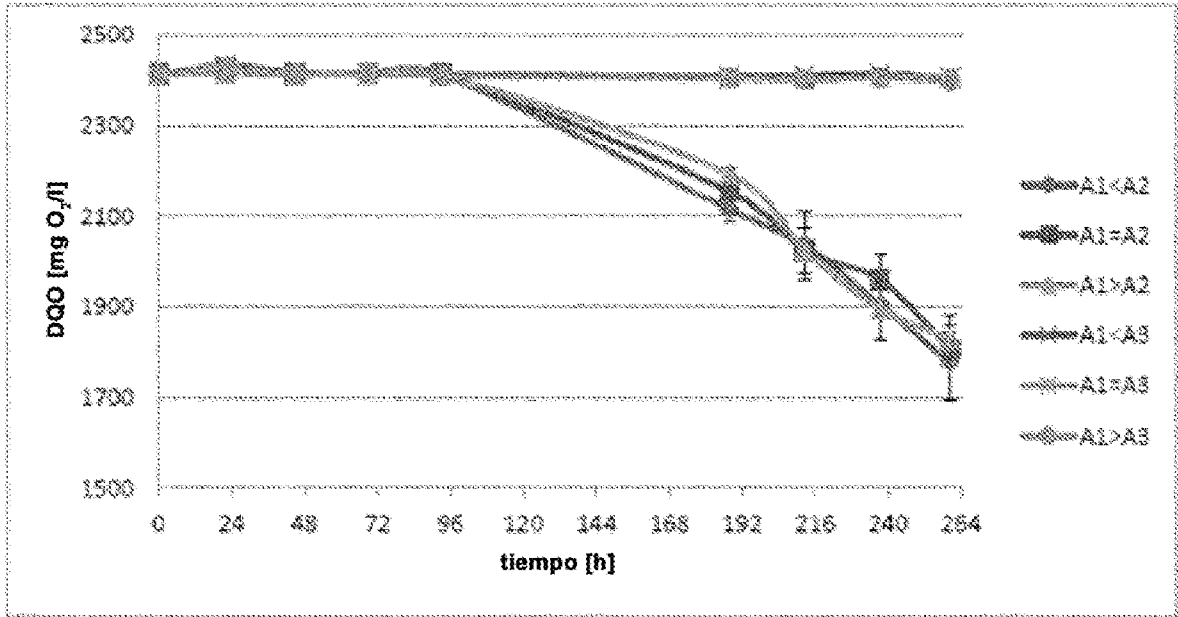


FIG. 1

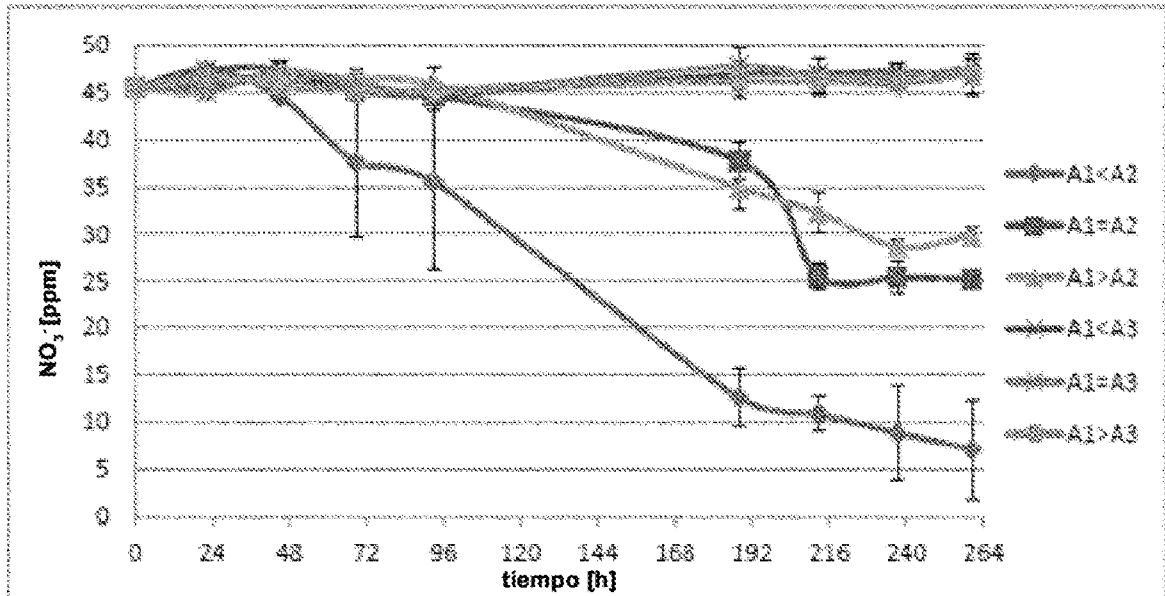


FIG. 2

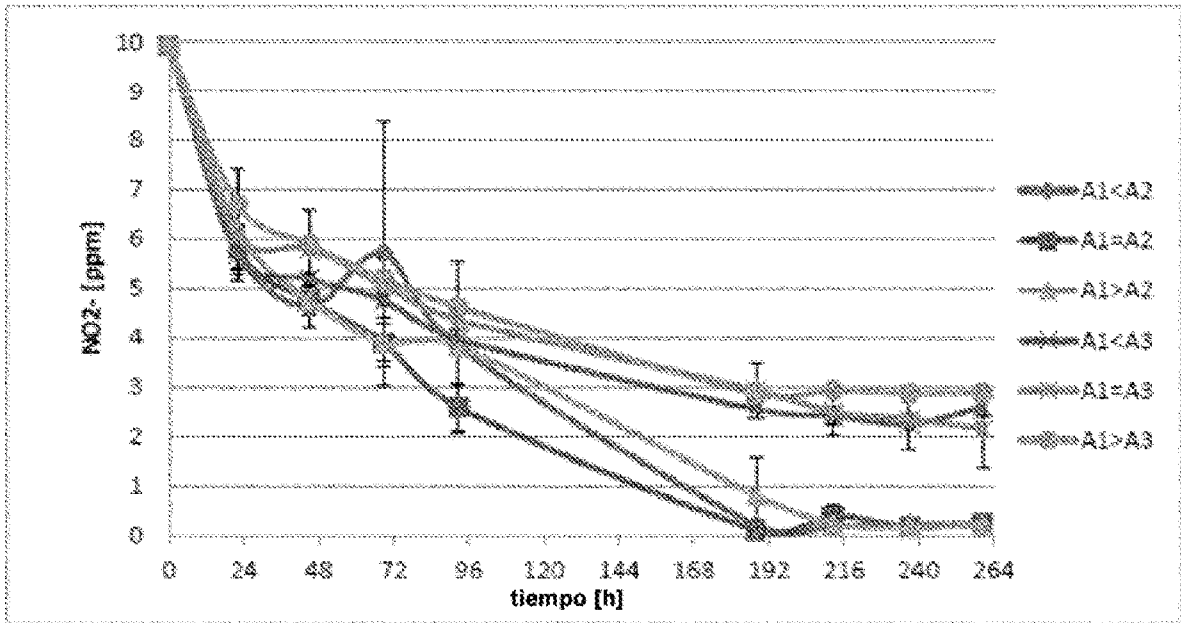


FIG. 3

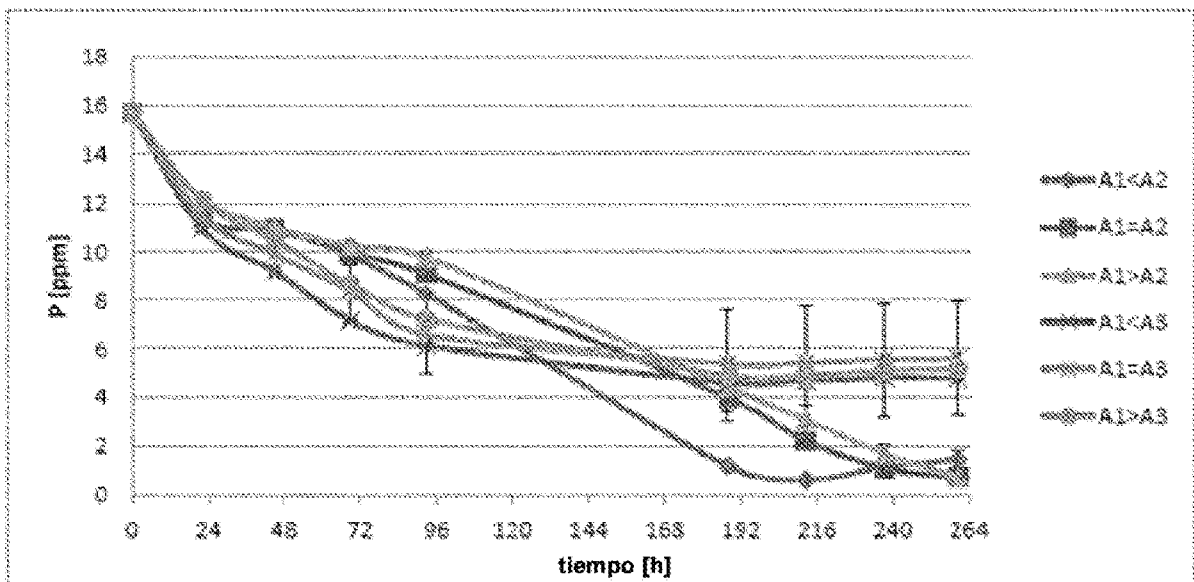


FIG. 4

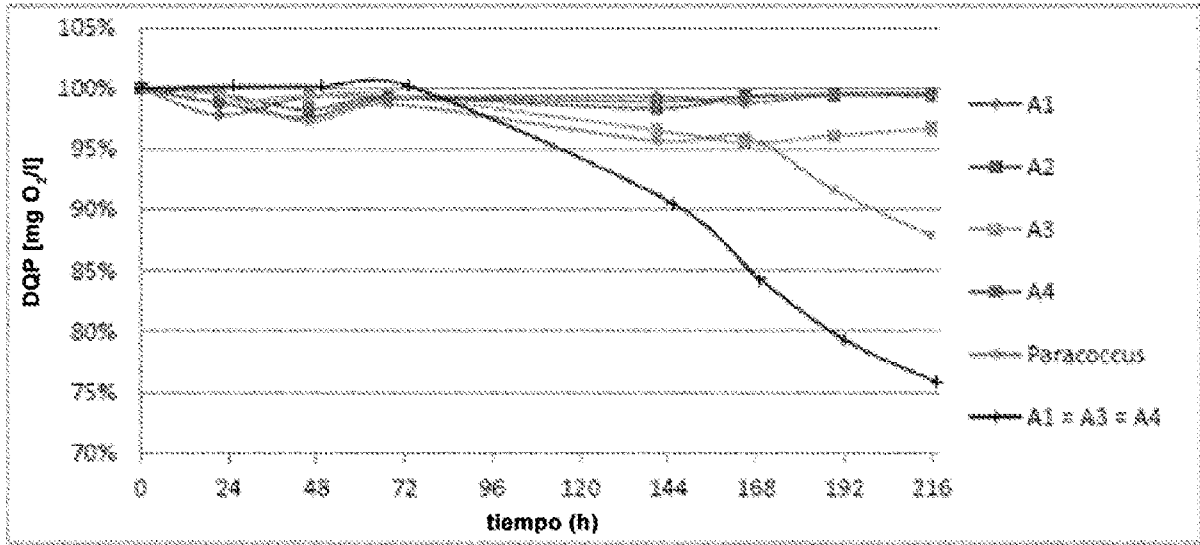


FIG. 5

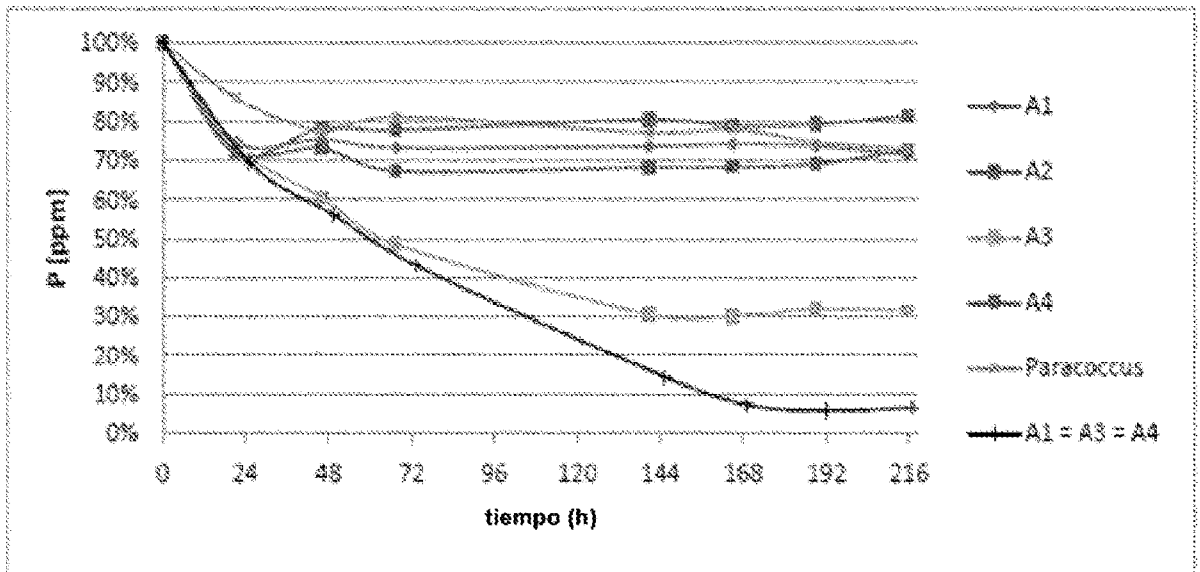


FIG. 6