

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 304 203**

21 Número de solicitud: 200602321

51 Int. Cl.:

**C23C 26/00** (2006.01)

**C12P 1/04** (2006.01)

**A62D 3/02** (2007.01)

**C02F 3/34** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **08.09.2006**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.2008**

Fecha de la concesión: **04.08.2009**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **28.09.2009**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**28.09.2009**

73 Titular/es:  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
c/ Serrano, 117  
28006 Madrid, ES  
Universidad de Sevilla**

72 Inventor/es: **González Grau, Juan Miguel;  
Portillo Guisado, María Carmen;  
Serrano Martín, Laura y  
Sáiz Jiménez, Cesáreo**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Películas aislantes de origen biológico.**

57 Resumen:

Películas aislantes de origen biológico.

El objeto de la presente invención una película aislante natural, no sintetizada por métodos químicos, el procedimiento para su elaboración y la utilización de dicha película. La película se produce durante el crecimiento de microorganismos en un medio de cultivo determinado bajo condiciones anaerobias. La película se forma en la superficie del cultivo. Dicha película está compuesta fundamentalmente de metales y sirve de aislamiento del oxígeno atmosférico y protección de la radiación solar, además de ser producida de modo natural. La película obtenida actúa de aislante entre el medio líquido y la atmósfera.

Dicho procedimiento permite la obtención de una película aislante por medios naturales. Dicha película sirve para el aislamiento y protección del oxígeno y otros gases, y puede utilizarse para la separación de líquidos y para el recubrimiento, aislamiento, y protección de sustancias de distinta naturaleza, así como materiales sólidos y partículas. La película no es tóxica, es inócua, por lo que no presenta problemas como producto de desecho. Este procedimiento, llevado a cabo en la naturaleza, es de utilidad para eliminar metales tóxicos en ambientes contaminados por acumulación en este tipo de películas.

ES 2 304 203 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Películas aislantes de origen biológico.

### 5 Sector de la técnica

El sector principal de aplicación es la biotecnología y sus aplicaciones en todo tipo de campos en los que se requiera una separación física entre dos fases o materiales, incluyendo gases, líquidos y sólidos. Campos de aplicación incluirían electrónica, medicina, farmacia, protección del medio ambiente y bio-eliminación de contaminantes, microbiología, alimentación, embalajes, satélites e industria aeroespacial, protección solar, y otras aplicaciones especializadas.

### Estado de la técnica

15 La preparación de películas separadoras es de gran interés para el aislamiento de dos fases o materiales que de otra manera estarían en contacto. La naturaleza, composición y aplicaciones de películas de aislamiento es muy variada. Existen películas tanto de composición tanto orgánica como inorgánica y con diferentes propiedades.

Las películas de una sola capa son generalmente bastante permeables a los gases y se tiende al empleo de películas con multicapas como un imperativo para obtener alta impermeabilidad al paso de gases. Películas aislantes de distintos tipos se pueden utilizar para el aislamiento de gases, o separación entre líquidos o sólidos. La aplicación de películas aislantes tienen un sin fin de aplicaciones algunas tan comunes como los embalajes de productos que encontramos en los supermercados y otras tan insospechadas como el aislamiento de componentes determinados en satélites y la industria electrónica o aeroespacial. En la actualidad hay una constante búsqueda de nuevos materiales y procedimientos para mejorar los productos existentes y satisfacer las necesidades crecientes que se requieren por parte de la industria, los avances tecnológicos, los consumidores y otros tipos de aplicaciones específicas.

La mayoría de películas utilizadas se basan en el empleo de compuestos orgánicos (polietileno, teflón, poliamidas, etc.). El empleo de películas de aluminio (papel de aluminio) es una excepción que aporta unas propiedades muy interesantes para el aislamiento y protección de gases, líquidos y sólidos. La mayoría de estas películas se ven seriamente afectadas por su exposición prolongada a la radiación solar incluido el papel de aluminio. El desarrollo de nuevos materiales y métodos de fabricación que rellene esos huecos y aplicaciones tecnológicas es de gran interés.

Los procedimientos de fabricación de esas películas aislantes requieren métodos sintéticos, mientras que en la actualidad no existen procedimientos biológicos que den lugar a la fabricación de películas con propiedades aislantes equivalentes. Hoy en día la fabricación de numerosos productos utilizando métodos biológicos está en auge y representa la base de la biotecnología. En muchos casos se mejora la velocidad de producción y frecuentemente el proceso de fabricación da lugar a la reducción significativa de residuos tóxicos, típicos de procesos de síntesis química. Hoy en día, la sociedad premia la utilización de productos naturales frente a aquellos sintetizados químicamente. Además, la utilización de productos naturales es importantísima ya que el desecho de las películas propuestas no causa daño ambiental o ecológico alguno.

Los microorganismos desempeñan un papel crítico en los ciclos biogeoquímicos (Brock y Madigan, 1991. Biology of microorganisms. 6th. Edn. Prentice Hall, New Jersey, USA) de los elementos aunque aun hoy en día se sabe muy poco de como llevan a cabo muchos de estos procesos. Diversos microorganismos se desarrollan en ambientes aeróbicos y anaeróbicos. Como el oxígeno es uno de los componentes principales de nuestra atmósfera, los microorganismos anaeróbicos han de enfrentarse frecuentemente con adaptar su entorno a las condiciones que ellos mismos requieren, como por ejemplo, anaerobiosis. Un elevado número de transformaciones bioquímicas las llevan a cabo los microorganismos exclusivamente en ambientes anaeróbicos, como por ejemplo, la denitrificación, producción de metano, reducción de sulfatos, reducción de hierro, etc.

### Breve descripción de la invención

Tal y como se ha mencionado previamente, sería deseable la incorporación de procedimientos biológicos para la preparación de películas aislantes, así como la producción de películas cuyas propiedades de aislamiento y resistencia a diversos agentes físicos y químicos mejoren los materiales existentes en el mercado.

Constituye, por tanto, un objeto de la presente invención una película aislante de origen biológico, impermeable al oxígeno, cuya composición es mayoritariamente metálica y que no contiene células o restos de células de microorganismos. El componente metálico es un metal pesado, preferentemente manganeso, cadmio, uranio y hierro.

Otro aspecto de la invención se relaciona con un procedimiento biológico para la producción de la película aislante objeto de la presente invención. Dicho procedimiento da lugar a una película natural, no sintética, obtenida mediante el cultivo de un microorganismo o una combinación de microorganismos implicados en la oxido-reducción del hierro, en condiciones de anaerobiosis y en un medio de cultivo adecuado.

En otro aspecto la invención se relaciona con la utilización de la película aislante. Dicha película sirve para separar distintas fases gaseosas, líquidas y sólidas. Asimismo, la película puede utilizarse para proteger de la oxidación

distintos compuestos, productos, sustancias, tales como alimentos, medicinas, productos semiconductores, etc., y mantener en anaerobiosis cultivos de microorganismos. Otra aplicación de la película objeto de la presente invención es el recubrimiento de cualquier tipo de materiales con objeto de evitar su corrosión y/o protegerlos frente a radiación solar.

5

En otro aspecto la invención se relaciona con la utilización del procedimiento de obtención de la película aislante para la acumulación y eliminación de metales pesados en procesos de bio-recuperación de ecosistemas (acuáticos o terrestres) contaminados con dichos metales.

10

### Breve descripción del contenido de las figuras

Figura 1. Cultivos anaeróbicos de los microorganismos mencionados (*Enterobacter* y *Anaeroarcus*). En A (izquierda), se presenta un cultivo a tiempo 0, justo después de ser inoculado; el medio es oscuro. En B (centro), el cultivo después de una incubación de tres días, en el que la película ya se ha formado en la superficie y el medio ha adquirido un color prácticamente transparente con la turbidez propia del crecimiento bacteriano. En C (derecha), se presenta un detalle del cultivo mostrado en B. Se observa el biofilm con color negro en la superficie del cultivo.

### 20 Descripción detallada de la invención

Un objeto de la presente invención es una película aislante de origen biológico, impermeable al oxígeno cuya composición es mayoritariamente metálica y no contiene células o restos de células de microorganismos.

25 La película se produce durante el crecimiento de microorganismos en un medio de cultivo anaerobio. Estos microorganismos durante su crecimiento desarrollan la formación de una película en la superficie del cultivo. Dicha película está compuesta fundamentalmente de metales dependiendo de la composición del medio de cultivo, y sirve principalmente de aislamiento del oxígeno atmosférico y protección de la radiación solar y es producida de modo natural. La película obtenida actúa como un aislante del oxígeno atmosférico, además de una barrera física entre el medio líquido y la atmósfera.

30

La película no se forma en aerobiosis aunque una vez formada, proporciona aislamiento frente al oxígeno atmosférico y permite el mantenimiento de las condiciones anaeróbicas en el medio, aunque esté expuesto a la atmósfera. La película se forma más fácilmente en condiciones de iluminación por lo que puede utilizarse como protector de radiaciones solares. La película no es tóxica y es inocua para el medio ambiente por lo que no presenta problemas como producto de desecho.

35

En una realización particular de la invención el cultivo microbiano es una mezcla de los microorganismos *Enterobacter* y *Anaeroarcus* en proporción similar de ambos microorganismos, que crecen en anaerobiosis y producen una película cuyo componente mayoritario es el hierro.

40

Otro objeto de la presente invención lo constituye el procedimiento de formación de la película mediante el cultivo de microorganismos relacionados con los procesos de oxido-reducción del hierro, en condiciones anaerobias. En este procedimiento no intervienen procesos artificiales de síntesis química.

45

La película formada proporciona aislamiento frente al oxígeno atmosférico permitiendo la existencia de anaerobiosis justo al otro lado de la película. Esta capacidad de aislamiento o barrera frente a gases es de gran utilidad práctica en numerosos campos. Por lo tanto constituye otro objeto de la presente invención la utilización de la película aislante en diversas aplicaciones. Dicha película puede utilizarse para la separación de líquidos y para el recubrimiento, aislamiento, o protección de materiales sólidos o partículas. Por ejemplo, la producción de películas para el aislamiento del oxígeno atmosférico de todo tipo de sustancias o productos, separación de líquidos, aislamiento o recubrimiento de partículas o sólidos. Ello se requiere, por ejemplo, en medicina, alimentación, electrónica, farmacia, protección del medio ambiente, microbiología, embalajes, satélites, industria aeroespacial, etc. Asimismo la película objeto de la invención puede tener aplicación en la protección solar, y otras aplicaciones especializadas.

55

En zonas con elevada contaminación de metales pesados el procedimiento de formación de este tipo de películas, objeto de la invención, se puede utilizar para eliminar dichos metales tras su acumulación en las películas. Por tanto, en otro aspecto la invención se relaciona con la utilización del procedimiento (anteriormente descrito) de formación de películas, objeto de la invención, de composición mayoritariamente metálica en la bio-recuperación de zonas contaminadas tras vertidos masivos de metales pesados (como, por ejemplo, cadmio, plomo, uranio, hierro, etc.), mediante la concentración de materiales metálicos en forma de películas facilitando su eliminación del medio.

60

Este procedimiento permitiría eliminar metales tóxicos en ambientes contaminados con elevadas concentraciones de esos compuestos (como ejemplo y entre otros, el Cadmio, Plomo, Uranio, hierro).

65

**Ejemplo de realización de la invención**

## Ejemplo 1

5 *Producción de las películas aislantes*

El crecimiento de las bacterias *Enterobacter* y *Anaerococcus* en el mismo cultivo (en proporción similar) bajo condiciones de anaerobiosis y en el medio descrito a continuación dio lugar a la utilización de compuestos orgánicos y a la acumulación de iones metálicos de hierro en forma de película superficial.

10

La composición del medio de cultivo utilizado es (por litro): Citrato de Fe(III) 13,70 g, NaHCO<sub>3</sub> 2,50 g, NH<sub>4</sub>Cl 1,50 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,60 g, KCl 0,10 g, Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 0,25 mg, solución de elementos traza 10 ml, acetato de sodio 2,50 g, solución de vitaminas 10 ml (añadir justo antes de inocular). La solución de elementos traza se compone de (por litro): Nitrotriacetic acid 1,5 g, MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 3,0 g, MnSO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 0,5 g, NaCl 1,0 g, FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,1 g, CoSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,18 g, CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 0,1 g, ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,18 g, CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O 0,01 g, KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> x 12 H<sub>2</sub>O 0,02 g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,01 g, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 0,01 g, NiCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 0,025 g, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O 0,3 mg, el pH de la solución de elementos traza se ajusta a 7,0. La solución de vitaminas contiene (por litro): Biotina 2,0 mg, ácido fólico 2,0 mg, hidrocloreto de piridoxina 10,0 mg, hidrocloreto de tiamina x 2H<sub>2</sub>O 5,0 mg, riboflavina 5,0 mg, ácido nicotínico 5,0 mg, D-Ca-pantotenato 5,0 mg, vitamina B<sub>12</sub> 0,1 mg, p-ácido aminobenzoico 5,0 mg, ácido lipoico 5,0 mg. Los componentes, excepto las vitaminas, se disuelven, se calienta hasta hervir, y se gasean con gas N<sub>2</sub> mientras se enfría a temperatura ambiente. Se ajusta el pH del medio a 6,8-7,0. Se transfiere a botellas de anaerobiosis (como las de la figura 1) que se sellan con tapones de goma y cápsulas de aluminio. Se esteriliza en un autoclave. Una vez a temperatura ambiente el medio de cultivo se puede inocular. Justo antes de inocularse se añade la solución de vitaminas. Las células se transfieren con jeringuillas sin abrir las botellas selladas para evitar la entrada de oxígeno en la botella de cultivo. El cultivo se incuba entre 28-35°C hasta la formación de la película deseada (generalmente 3-5 días).

La formación de esta película se produce utilizando ambas bacterias a temperatura ambiente (generalmente se facilita a temperaturas entre 28 y 35°C). La iluminación (radiación solar) facilita su formación. La preparación del medio de cultivo, inoculación de los cultivos y su mantenimiento se ha de hacer siguiendo los métodos estándar llevados a cabo en cualquier laboratorio de microbiología de bacterias anaeróbicas, conocidos por un experto en la materia.

Una vez que los cultivos descritos anteriormente han iniciado la formación de la deseada película se abren y exponen al aire, evitando movimientos bruscos o corrientes fuertes para evitar la rotura de las películas. El cultivo es capaz de seguir su crecimiento y de incrementar la formación de película. Dicha película toma una coloración parda. El medio de cultivo se mantiene transparente indicando que el oxígeno no penetra ya que en ausencia de la película (o si esta es retirada) el medio adquiere una coloración amarillenta primero, y parda después como consecuencia de la penetración del oxígeno. Este hecho se ha comprobado midiendo la concentración de oxígeno bajo la película y en ausencia de la película. El medio se satura de oxígeno rápidamente en ausencia de la película mientras que cuando esta está presente se mantiene anóxico.

45

50

55

60

65

# ES 2 304 203 B1

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Película aislante de origen biológico **caracterizada** porque es impermeable al oxígeno, su composición es mayoritariamente metálica y no contiene células o restos de células de microorganismos.
2. Película aislante de origen biológico según la reivindicación 1 **caracterizada** porque el componente metálico es un metal pesado, preferentemente seleccionado entre los siguientes: manganeso, cadmio, uranio y hierro.
- 10 3. Procedimiento de elaboración de una película aislante según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** porque comprende el cultivo de un microorganismo o una combinación de microorganismos, en proporción adecuada, implicados en la oxido-reducción del hierro, en condiciones de anaerobiosis, en un medio de cultivo adecuado.
- 15 4. Procedimiento según la reivindicación 3 **caracterizado** porque el cultivo de microorganismos es una mezcla de *Enterobacter* y *Anaerococcus* en una proporción adecuada.
5. Utilización de películas aislantes según las reivindicaciones 1 y 2 para separar gases, líquidos y sólidos.
- 20 6. Utilización de películas aislantes según las reivindicaciones 1 y 2 para la protección frente al oxígeno de compuestos, productos, o sustancias de cualquier tipo, y cultivos de microorganismos, evitando la oxidación de los mismos.
7. Utilización de películas aislantes según la reivindicación 6 donde los compuestos protegidos se seleccionan entre alimentos, medicinas y semiconductores, entre otros.
- 25 8. Utilización de películas aislantes según las reivindicaciones 1 y 2 para el mantenimiento de cultivos microbianos en anaerobiosis.
- 30 9. Utilización de películas aislantes según las reivindicaciones 1 y 2 en el recubrimiento de cualquier tipo de materiales con objeto de evitar su corrosión y/o protegerlos frente a radiación solar.
10. Utilización de un procedimiento según las reivindicaciones 3 y 4 para la acumulación y eliminación de metales pesados en procesos de bio-recuperación de ecosistemas (acuáticos o terrestres) contaminados con dichos metales.

35

40

45

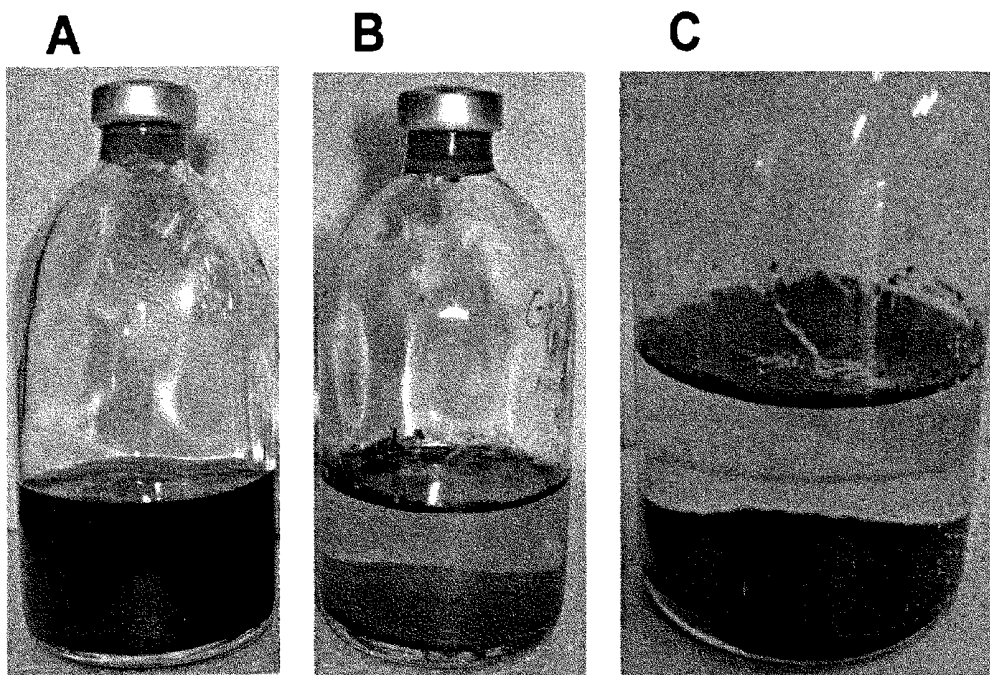
50

55

60

65

Figura 1





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 304 203

② Nº de solicitud: 200602321

② Fecha de presentación de la solicitud: **08.09.2006**

③ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑥ Documentos citados   | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| A         | WO 2005122773 A1 (MBEC BIOPRODUCTS INC.) 29.12.2005  |                            |
| A         | HARRISON, J.J. et al.: "Biofilm Susceptibility to Metal Toxicity", Environmental Microbiol. (2004), vol. 6 (12), pp.: 1220-1227.   |                            |
| A         | SPOERING, A.L. et al.: "Biofilms and Planktonic Cells of Pseudomonas aeruginosa Have Similar Resistance to Killing by Antimicrobials", J. Bacteriol., (2001), vol. 183 (23), pp.: 6746-6751. |                            |

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

19.08.2008

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C23C 26/00** (2006.01)

**C12P 1/04** (2006.01)

**A62D 3/02** (2007.01)

**C02F 3/34** (2006.01)