



00 91832

**SOLICITUD DE
PATENTE DE
INVENCION**

RAMITE: 02 EVENTO: 01 ACTUACIÓN: 411

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 00031A32 005/0000

Folios: 64

Fecha (MM): 2000-11-30 10:04:46

Tramite : 002 PATENTES 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social

PETROLEO BRASILEIRO S.A. -PETROBRAS

No. de identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

Brasil

Departamento o Estado

Dirección

Av. República de Chile No. 65,

Ciudad

Rio de Janeiro, (RJ).

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

EMILIO FERRERO

Dirección y Domicilio

Carrera 4 No. 72-35 Piso 4º.

Ciudad

Bogotá, Colombia

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del inventor(es)

1- John J. KILBANE II

2- Claudia Maria SOARES RIBEIRO

3- Mónica Moreira LINHARES

Identificación

1- 14706 Dogwood Lane, Woodstock, Illinois 60098, Estados Unidos.

2- Rua Inhangá, 42, ap. 501, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

3- Rua Marquês de Olinda, 64, ap. 907 B, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Dirección

Ciudad

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención

**MICROORGANISMOS ÚTILES PARA LA SEGMENTACIÓN
DE ENLACES ORGÁNICOS DE C-N**

PRIORIDAD REIVINDICADA

SI ☒

NO ☐

TIPO DE PRIORIDAD

ANDINA ☐

UNIONISTA ☒

(33) País

US.

Fecha

30 de Noviembre de 1999

No. Solicitud

09/449.615

Convención de París

Para Publicar a los

☐ 6 meses

☐ 12 meses

☒ 18 meses a partir de la fecha de la presente solicitud

Colo: 00795-801-018-8

MLR/mmm-ld-173

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL

: C12N 001/020

30 NOV. 2000

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención describe una cepa mutante de *Pseudomonas* ayucida ATCC No. PTA-806 que es capaz de segmentar selectivamente enlaces de C-N y reduce el contenido de nitrógeno de material orgánico carbonáceo.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

- | | |
|--|-------------------------------------|
| Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica | ☒ |
| Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC | ☒ |
| Recibo de la tasa respectiva <i>por v/r de \$ 608.000 =</i> | ☒ |
| Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación | ☐ |
| Si se reivindica prioridad Andina: | |
| Copia de la primera solicitud | ☐ |
| Traducción oficial | ☐ |
| Si se reivindica prioridad Unionista: | |
| Copia certificada de la primera solicitud: <i>Norteamericana Ab. 09/449.615</i> | ☒ |
| Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior | |
| Traducción simple | ☒ |
| Capítulo descriptivo | ☒ |
| Dibujos, planos necesarios <i>(3 pág.)</i> | ☒ |
| Capítulo reivindicatorio | ☒ |
| Tarjeta archivo propietarios según formato | ☒ |
| Tarjeta archivo temático según formato | ☒ |
| Extracto para publicación según formato | ☒ |
| Arte final 12 x 12 cms Y 6x6 cms | ☐ |
| Otros Documentos | ☐ |

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA

NOMBRE EMILIO FERRERO

CC. 438.019 de Usaquén

T.P.No. 31.929

MICROORGANISMOS ÚTILES PARA LA SEGMENTACIÓN DE ENLACES ORGÁNICOS DE C-N

CAMPO DE INVENCION

Esta invención está relacionada con un cultivo mutante de *Pseudomonas ayucida* capaz de retirar selectivamente el nitrógeno orgánicamente enlazado de materiales carbonáceos mientras que se retiene el valor calorífico de dichos materiales carbonáceos. Los microorganismos de esta invención son particularmente útiles para retirar nitrógeno orgánico de combustibles fósiles tales como el carbón y petróleos conteniendo nitrógeno.

INFORMACIÓN SOBRE ANTECEDENTES

La calidad del petróleo deteriora progresivamente según se ponen en producción preferencial los depósitos de la mejor calidad de petróleo. Como consecuencia es cada vez más preocupante la concentración de compuestos/contaminantes tales como sulfuro, nitrógeno y metales en el petróleo. Estos contaminantes no sólo contribuyen a la polución ambiental como resultado de la combustión de petróleo, sino que también interfieren con el procesamiento del petróleo, envenenando catalizadores y contribuyendo a la corrosión. El retiro selectivo de contaminantes del petróleo mientras que se retienen los valores de combustibilidad supone un difícil desafío técnico.

El retiro selectivo de sulfuro del dibenzotiofeno con la ayuda de una bacteria útil para la segmentación de enlaces C-S es instruido en la patente US 5,002.888.

La patente US 5,297,625 enseña un método de preparación, aislamiento y uso de un microorganismo que pueda metabolizar petróleos crudos y otros hidrocarburos de elevado peso molecular, como fuente de energía, y la emulsificación de crudos pesados bajo las condiciones extremas existentes en depósitos de petróleo.

La biorefinería del petróleo es por ello una tecnología que pronto será comercializada y puede resultar muy prometedora.

El retiro de nitrógeno y de metales del petróleo es otro de los usos potenciales de biocatalizadores, aunque hasta la fecha este área de investigación ha recibido muy poca atención.

La quinolina es quizás el compuesto de organonitrógeno más estudiado en lo que respecta a biodegradación, y es considerada como representante de muchos compuestos de organonitrógeno comúnmente hallados en el petróleo. Se ha observado que muchos cultivos aeróbicos y anaeróbicos microbianos pueden degradar la quinolina. La mayoría, si no todos, los cultivos microbianos descritos que metabolizan la quinolina lo hacen degradándola totalmente, y por lo tanto pueden utilizar quinolina como fuente exclusiva de carbono, energía y nitrógeno.

Shukla, Onkar P., en "La Transformación Microbiana de Quinolina por un *Pseudomonas sp.*", *Microbiología Aplicada y Ambiental*. Tomo 51, Junio 1986, págs. 1332-1342, señala que un *Pseudomonas sp* aislado de efluentes por un cultivo de enriquecimiento en quinolina, metabolizó este sustrato por una nueva vía de 8-hidroxycoumarin. Este microorganismo usa quinolina como fuente exclusiva de carbono, nitrógeno y energía.

Schwarz, G. et al, in "Metabolismo Microbiano de Quinolina y Compuestos Relacionados". "I. Aislamiento y Caracterización de Bacteria Degradante de Quinolina", en "System Appl. Microbiol. 10, 185-190 (1988)", reporta que se aislaron 16 estirpes de bacterias de suelo, aguas y lodos activados que pueden utilizar la quinolina como fuente única de carbono y nitrógeno. De estas 16 cepas de bacterias investigados, 13 podrían ser asignadas al género *Pseudomonas*. Estas bacterias son Gram-negativas, con aspecto de vástagos, de movimiento espontáneo, derechos a ligeramente curvados, que en Agar HNB forman colonias suaves o parcialmente rugosas, circulares y de color amarillento a crema. Las especies identificadas son las de *Pseudomonas putida* Biovar A y B, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas testosteroni*. Se reporta que el crecimiento en 2-hidroxiquinolina es común en todas las cepas investigadas. Se ha estudiado la degradación de quinolina en diversas especies de *Pseudomonas* y se observó que 2-hidroxiquinolina fué el primer intermediario en la vía de degradación.

Grant, D.J.W. et al, en "Degradación de la quinolina por una bacteria del suelo", *Microbios* 1976, 15, págs. 177-189, reporta que se aisló una bacteria del suelo de un jardín, la cual creció aeróbicamente en un medio de sales minerales con la quinolina como fuente exclusiva de Carbono y NH_4^+ como fuente de Nitrógeno.

Durante el crecimiento con quinolina, se acumuló 2-hidroxiquinolina en el fluido de cultivo y más tarde desapareció. 2,6-Dihidroxiquinolina es probablemente el próximo

intermedio ya que las células completas lo oxidan totalmente y con rapidez. La segmentación de anillos aromáticos bajo condiciones aeróbicas sigue casi invariablemente la formación de un compuesto con dos estirpes de hidroxilos anexos a un anillo en las posiciones o- ó p- entre sí.

O'Loughlin, E.J. et al. En "Aislamiento, Caracterización y Uso de Substratos de una Bacteria de Quinolina en Degradación", " Biodeterioro y Biodegradación Internacional (1996), págs. 107-118, reporta un organismo con aspecto de vástago Gram (+), identificado como un *Rhodococcus* sp, capaz de crecer usando la quinolina como la fuente dominante de carbono, energía y nitrógeno. Este elemento aislado, designado *Rhodococcus* sp. Q1 también es capaz de crecer en 2-hidroxiquinolina, piridina, 2-3 dimetil piridina, catechol, benzoato y ácido protocatechuico, sugiriendo una capacidad diversa para degradación de anillo aromático. Aunque el nitrógeno de anillo fué aplicado al medio de crecimiento en forma de amoníaco, la degradación de quinolina no se vió limitada por la disponibilidad del producto inorgánico de degradación N.A. identificado y la 2-hidroxiquinolina fué identificada a base de varios análisis espectroscópicos.

De forma que, aunque las publicaciones citadas mencionan cultivos microbianos que pueden metabolizar la quinolina degradándola totalmente, el uso de tales cultivos en una aplicación de biorefinería de petróleo requeriría que el nitrógeno sea selectivamente retirado de la quinolina, dejando intacto el valor carbónico y calorífico de la molécula.

Según señalado en dichas publicaciones, las vías metabólicas utilizadas por diversos microorganismos aeróbicos degradantes de quinolina parecieron iniciar la degradación de quinolina, oxidando selectivamente y retirando nitrógeno de la quinolina. Como no se provveyó ninguna otra fuente de carbono, el metabolismo de tales especies continuaría segmentando enlaces de C-C.

Aunque la biodegradación de la quinolina ha sido razonablemente bien estudiada, hay muy poca información relativa al uso de microorganismos degradantes de quinolina para retirar nitrógeno del petróleo. Por otra parte, se observó que varios *Pseudomonas* degradantes de quinolina no tenían la capacidad de retirar niveles significativos de nitrógeno del petróleo crudo o de fracciones de asfalto (Aislabe et al. 1990, "Degradación Microbiana de la Quinolina y la Methilquinolina", Apl. Environ. Microbiol. 56: págs. 345-351).

Por lo tanto, hay necesidad de aislar cultivos aeróbicos capaces de utilizar quinolina como una fuente de nitrógeno, pero incapaces de utilizar la quinolina como una fuente de carbono, examinando a continuación la vía metabólica de la degradación de la quinolina, así como la habilidad de tales cultivos de retirar selectivamente nitrógeno del petróleo, lográndose estos objetivos mediante la presente invención.

RESUMEN DE LA INVENCION

Un objeto de la presente invención es proveer un microorganismo y un proceso para el retiro de nitrógeno orgánicamente ligado, de materias carbonáceas orgánicas contenedoras de nitrógeno.

Otro objeto de la presente invención es proveer un proceso microbiano para el retiro selectivo de nitrógeno de combustibles orgánicos fósiles contenedores de nitrógeno y combustibles de derivados de fósiles.

Aún otro objeto de la presente invención es proveer un microorganismo y proceso capaces de segmentación específica o formación de enlaces C-N en reacciones de materias orgánicas carbonáceas, tales como en síntesis orgánica.

Aún otro objeto de la presente invención es proveer un microorganismo que sea estable y retenga sus características específicas de nitrógeno bajo condiciones de proceso que se valgan del microorganismos para la segmentación del enlace de C-N.

Y aún otro objeto de la presente invención es proveer un microorganismo y proceso para retiro específico de nitrógeno de la quinolina que resulte en productos substancialmente exclusivos de 2-quinolina y 8-hidroxycoumarina.

Estos y otros objetos y ventajas, que resultarán aparentes al leer esta descripción, han sido logrados con el puro cultivo de un microorganismo que ha sido aislado y sujeto a procesos en la forma especificada a continuación en más detalle en esta invención e identificado como *Pseudomonas ayucida*. El cultivo ha sido depositado con la Colección de Cultivos de Tipo Americano, 10801 University Blvd, Manassas, VA 20110-2209, USA, y ha sido asignado el ATCC N°PTA-806 PTA-806.

Pseudomonas ayucida ATCC N° PTA-806 PTA-806 puede ser preparado inyectando muestras del medio ambiente obtenidas de emplazamientos que tengan presentes materias de enlace C-N que se desee segmentar, un medio de crecimiento que comprenda nutrientes

minerales, una fuente asimilable de carbono, y encontrándose en substancial ausencia de un compuesto conteniendo nitrógeno, excepto compuestos que sólo tengan nitrógeno presente en enlace C-N del tipo que se desee segmentar; creciendo el cultivo bacterial en presencia de oxígeno a temperaturas de unos 30°C durante tiempo suficiente para producir selectivamente *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 que tiene la propiedad de segmentación selectiva de enlaces de C-N en materiales carbonáceos orgánicos.

El contenido de nitrógeno de materia carbonácea orgánica contenedora de nitrógeno puede ser reducido poniendo en contacto dicha materia carbonácea orgánica conteniendo nitrógeno con el microorganismo *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806. El proceso es especialmente apto para uso cuando el material conteniendo nitrógeno es carbón, petróleo de esquisto bituminoso o petróleo de hidrocarburos. El continuo crecimiento de la cepa de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 en la presencia de petróleo de esquisto bituminoso conteniendo nitrógeno resulta en el retiro de más del 5% del total de nitrógeno y preferiblemente más del 68% del total de quinolina.

El proceso para reducir el contenido de nitrógeno del material carbonáceo orgánico conteniendo nitrógeno ocurre por segmentación de los enlaces C-N orgánicos del microorganismo *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806. El cultivo puro de nitrógeno orgánico selectivo de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 tiene la capacidad de reducir selectivamente el contenido de nitrógeno del material carbonáceo orgánico mediante segmentación de los enlaces orgánicos de C-N produciendo 2-hidroxiquinolina y 8-hidroxycoumarina cuando se cultiva en un medio de crecimiento que incluye nutrientes minerales y una fuente asimilable de carbono en substancial ausencia de un compuesto que contenga nitrógeno, excepto el material carbonáceo orgánico conteniendo nitrógeno, y en la presencia de oxígeno a temperaturas de unos 35°C a 30°C. Los derivados de la cepa de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 retienen la habilidad de reducir selectivamente el contenido de nitrógeno de materiales orgánicos carbonáceos por segmentación de enlaces C-N de la misma forma.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS ESQUEMAS

FIG 1 es un gráfico que ilustra una comparación de datos MS de un metabolito de quinolina producido por *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 con 2-quinolinona.

FIG 2 es un gráfico que ilustra una comparación de datos MS de un metabolito de quinolina producido por *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 con 7-hidroxi-2H-1-benzopirán-2-uno(7-hidroxycoumarina).

FIG 3 es una representación esquemática de la vía parcial para la degradación de quinolina por *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES PREFERIDAS DE LA INVENCION

Cultivos ambientales con un conocido historial de exposición a compuestos organonitrogenados, así como cultivos de enriquecimiento utilizando fuentes de carbono, acetato, benceno, ácido benzoico, etanol, glucosa, glicerol, caldo nutriente, succinato y tolueno, y compuestos de nitrógeno orgánicos tales como quinolina, carbazol y piridina produciendo cultivos bacteriales capaces de metabolizar cada uno de los compuestos de nitrógeno utilizados.

Según el material técnico provisto, los microorganismos más conocidos para utilización del nitrógeno de compuestos organonitrogenados son los *Pseudomonas* aislados de cultivos de enriquecimiento empleando quinolina como fuente exclusiva de nitrógeno. Mientras que las especies de *Pseudomonas* son capaces de utilizar nitrógeno orgánicamente enlazado, no muestran especificidad para la oxidación de enlaces de carbono-nitrógeno. Esto muestra la falta de desarrollo de cultivo de enriquecimiento de un microorganismo de ocurrencia natural que muestre especificidad para oxidación de enlaces orgánicos de C-N. De aquí que se deba utilizar un proceso no natural de mutación selectiva para desarrollar un microorganismo que posea dicho metabolismo selectivo de nitrógeno.

Los microorganismos con capacidad metabólica no específica al nitrógeno con respecto a sustratos orgánicos pueden ser desarrollados por selección a través de experimentos con enriquecimiento por inoculación quimiostática y de matraz vibrador en los que los nutrientes y el nitrógeno orgánicamente enlazado que normalmente no se encuentran en el tejido vivo, puedan ser suministrados en substancial ausencia de otra fuente de nitrógeno disponible tal como nitrógeno inorgánico en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

El medio de crecimiento deberá proveer nutrientes orgánicos e inorgánicos para un buen crecimiento del microorganismo, pero estará desprovisto de compuestos inorgánicos y orgánicos que contengan nitrógeno que se desee metabolizar por el microorganismo. Un medio adecuado para el crecimiento de microorganismos bajo condiciones de

organonitrógeno puede que sea una composición apropiada de nutrientes minerales, tales como 0,37g KH_2PO_4 , 0,25g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,07g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,02g de FeCl_3 y 20,0g de glucosa/glicero/sucinato por litro de agua destilada ionizada. Dicho medio es conocido como ModA. Cualquier fuente asimilable de carbono desprovista de nitrógeno puede ser utilizada en cantidades de apoyo del crecimiento microbiano deseado. Entre las fuentes

adecuadas de carbono asimilable se encuentran la glucosa, el glicerol, acetato de sodio, benzoato de sodio, succinato de sodio y sucrosa, en concentraciones de 1 a 20mM..

El compuesto organonitrogenado preferido con enlaces orgánicos C-N es la quinolina. A continuación se enumeran otros compuestos adecuados con enlaces de C-N.

Las muestras ambientales de tierra de suelo y de agua pueden obtenerse de emplazamientos de elaboración de carbones, de turba y otros en los que existan hidrocarburos de petróleo.

Las muestras tomadas del medio ambiental son utilizadas para experimentos de cultivo de enriquecimiento por inoculación de quimiostato y matraz vibratorio para obtener cultivos capaces de utilizar quinolina como fuente exclusiva de nitrógeno. En la presente invención, todos los experimentos utilizaron los medios minerales definidos a continuación:

0,37g KH_2PO_4

0,25g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,07g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,02g g FeCl_3

y 20,0g de glucosa/glicero/sucinato por litro de agua destilada ionizada.

Estos medios van ajustados a un pH de 6,5 a 7,0 y el nitrógeno es suministrado en la forma de quinolina que se encuentra presente en concentraciones de 1 a 20mM, o para experimentos de control se utiliza $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ a una concentración de 1,3g por litro.

Los quimiostatos y matraces vibratorios son operados a temperatura ambiente (25°C) ó 30°C. El volumen de trabajo de los quimiostatos es de 1 litro y los experimentos con matraz vibrador normalmente usan 50 ó 100ml de medio líquido. Se ajustan los grados de flujo de los quimiostatos para obtener tiempos de retención hidráulica de dos días de duración hasta un mes, y se alteran los caudales y también el compuesto organonitrogenado de ensayo en la forma requerida para asegurarse de que los quimiostatos crean un ambiente adecuado

para la selección de cultivos con capacidad mejorada de segmentar selectivamente los enlaces C-N. La densidad de célula bacteriana en los quimiostatos/matrazes vibratorios varía de 10^2 a 10^8 células/ml, con densidades promedio de células de 10^4 a 10^5 células/ml mantenidas. Las bacterias aisladas del efluente de quimiostatos y/o de matraces vibratorios son sujetas a mutagenesis química y/o física utilizando nitrosoguanidina (NTG) y corta irradiación ultravioleta respectivamente. Las poblaciones de células son mutagenizadas bajo condiciones

que resultan en la muerte de aproximadamente un 99% de la población. Las células mutagenizadas son entonces usadas para reinocular quimiostatos, iniciar experimentos adicionales con matraces vibratorios, y para platos de agar que contienen compuestos de organonitrógeno de prueba. Se debe llevar cuidado de que la cantidad de biomasa añadida de nuevo a los quimiostatos en forma inoculada sea suficiente para proveer una cantidad considerable de nitrógeno en forma de células de biomasa muertas de los efluentes de los quimiostatos, matraces vibratorios y platos de agar y sean comprobados con regularidad usando el Ensayo de Prueba de Biodisponibilidad de Nitrógeno descrito a continuación.

La determinación de las secuencias de gene 16S-rRNA para la determinación de las especies de aislados bacteriales fue llevada a cabo por MIDI Labs (Newark, DE).

Ensayo de Biodisponibilidad de Nitrógeno

La capacidad de las bacterias de utilizar compuestos de nitrógeno orgánicos para crecimiento puede ser medida mediante el Ensayo de Biodisponibilidad de Nitrógeno (NBA). Este ensayo se basa en el hecho de que todo proceso de vida requiere nitrógeno para el crecimiento y por lo tanto se puede crear una situación en la que la cuantificación del crecimiento bacteriano provea una medida del grado de utilización de cualquier compuesto orgánico o inorgánico como fuente de nitrógeno.

De aquí que, el Ensayo de Biodisponibilidad de Nitrógeno utilice un medio de sales minerales definidas en las pruebas de crecimiento en las que los compuestos modelo de organonitrógeno tales como quinolina, piridina, carbazol y porfirina sirven como fuentes de carbono y/o de nitrógeno. Las pruebas de crecimiento se hacen usando seis condiciones:

1. Compuesto de prueba como fuente exclusiva de carbono y nitrógeno.
2. Compuesto de prueba como fuente exclusiva de carbono (se encuentra disponible amoníaco como fuente alternativa de nitrógeno).

3. **Compuesto de prueba como fuente exclusiva de nitrógeno (como fuente alternativa disponible de carbono: glucosa/glicerol/sucinato).**
4. **Compuesto de prueba presente, además de fuentes alternativas de carbono y de nitrógeno.**
5. **Con sólo fuentes alternativas de nitrógeno (amoníaco) y de carbono (glucosa/glicerol/sucinato). No se encuentra presente el compuesto de prueba.**
6. **Sin compuestos de nitrógeno de clase alguna presentes, pero con fuentes alternativas de carbono (glucosa/glicerol/sucinato).**

Estas seis condiciones para crecimiento constituyen un bioensayo para comprobar la habilidad de un cultivo particular de metabolizar compuestos organonitrógenados. Cuando se requieren fuentes de carbono y de nitrógeno en adición a los compuestos de prueba, son provistas en forma de una mezcla de glucosa/glicerol/sucinato (20g/L) y de amoníaco (20mM) respectivamente.

La prueba NBA puede ser realizada con cualquier compuesto de organonitrógeno de prueba que sea ordinariamente usado a una concentración de desde 3mM a 20mM.

Para determinar la gama de compuestos de organonitrógeno que podrían servir como fuentes exclusivas de nitrógeno para crecimiento de los diversos cultivos puros de la invención, se han probado varios compuestos de organonitrógeno y de control, siguiendo el proceso de Ensayo de Biodisponibilidad de Nitrógeno. Todos los compuestos son muy puros y de grado analítico.

Entre estos compuestos figuran:

- 2-Metil-beta-Naftociazol**
- 2-Metil-Benzotiazol**
- 2(Metilmercapto)Benzimidazol**
- 1,1-Metileno Bis(3-Metil Pipridina)**
- Tiazol**
- 1-Butilpirrolidina**
- 2-Metileno-1,3,3-Trimetil Indolina**
- 2-Metil-3-Propilpirazina**
- 2-Fenilbenzotiazol**

2-Metil Quinoxalina
2-Metil Indolina
Carbazol
Quinolina
Quinazolina
Quinoxolina
2,4-Quinolindiol
Isoquinolina
3-Metil Isoquinolina
Isocarbostiril
Protoporfirin
Piridina
Fenil Benzotiazol
Ácido Nicotínico
Imidazol
Indole
Solución Tampón HEPES
Urea
Guanina
Lisina
Tritofan
Cloruro de Amonio.

Los diversos cultivos son inoculados en tubos de ensayo o matraces que contienen componentes de medios apropiados para las seis condiciones antedichas de prueba.

Los cultivos son incubados a continuación aeróbicamente durante 2 a 4 días a temperatura ambiental de 30°C.

Se monitorea el crecimiento de los cultivos midiendo densidad óptica/de turbulencia de los cultivos en las diferentes condiciones de ensayo, o determinando las unidades que forman colonias.

La condición de ensayo N°6 (muestra libre de nitrógeno) es de control negativo.

Las condiciones N° 4 y 5 son controles positivos porque las muestras son alteradas con fuente de carbono y de nitrógeno y por lo tanto debieran producir un sano cultivo microbiano al menos que el compuesto resulte tóxico para el cultivo sujeto a ensayo. En este caso, sólo la condición N° 5 resultaría en crecimiento sano.

El grado crecimiento bacteriano observado en las condiciones de ensayo 1, 2 y 3, comparado con el grado de crecimiento observado en las condiciones de ensayo 4, 5 y 6 indica la habilidad de los cultivos de usar el compuesto de prueba de organonitrógeno como fuente de carbono y/o de nitrógeno.

Los cultivos que muestran mejor crecimiento en las condiciones de ensayo N° que en las de los ensayos 1 y 2 puede que utilicen preferencialmente el compuesto de organonitrógeno como fuente de nitrógeno solamente.

Identificación de Metabolitos

Para identificar metabolitos se realiza Cromatografía de Capa Fina (TLC) en platos de Silica C-18 mediante el método descrito por G. K. Watson.

R.B. Cain en "Metabolismo Microbiano en Anillo de Piridina", Biochem. J. 146-172. Los disolventes de fase corriente serán por ejemplo, el hexano, ácido acético y xileno en la proporción de 5:1:2. Supernadantes de cultivos bacterianos en crecimiento con quinolina como fuente exclusiva de nitrógeno son extraídos con acetato de etilo y pasados por platos de TLC.

Alternativamente, se pueden usar células en reposo, utilizando gránulos de células de cultivos de la fase de prueba registrada con quinolina o con amoníaco como fuentes de nitrógeno. Se incuban las suspensiones de células concentradas con 20mM de quinolina durante periodos desde 15 minutos hasta 16 horas.

La extracción de los supernadantes de células en reposo y de células en crecimiento puede ser llevada a cabo con disolvente de acetato de etilo o con cartuchos de fase sólida C18 y los extractos se analizan por TLC.

Derivación de los metabolitos

Se puede efectuar la derivación de los metabolitos añadiendo semicarbazida HCl y 2,4 dinitrofenil hidrazina (2,4-DNPH) a algunos experimentos, seguido de la subsiguiente extracción y análisis de TLC. Una mezcla típica que usa derivación de metabolitos consistirá de 200 ml de medio A (con fuente de carbono) que contiene 2g de peso seco de células, 2mM semicarbazida-HCl, y 3 mM a 20 mM de quinolina como fuente de nitrógeno. La mezcla es incubada durante 2 horas y las células son

centrifugadas. Se añade 2,4 DNPH al supernadantes, se deja la mezcla reposar durante la noche y se extrae con acetato de etilo, separándola en un plato de TLC e identificando los puntos.

Cromatografía de gas/espectrometría de masa

Se realiza el análisis GC/MS en extractos derivados de cultivos de células en reposo y en crecimiento expuestas a la quinolina, y en compuestos eluidos de puntos observados en los platos TLC.

La extracción de los supernadantes de las células en reposo y también los de las células en crecimiento puede ser llevada a cabo con disolvente de acetato de etilo o con cartuchos de extracción de fase sólida C-18. Se analizan los puntos TLC de posibles metabolitos por GC/MS.

Los espectrográficos de masa son entonces comparados con las diversas librerías de datos de espectrografía de masa preparadas de los resultados con compuestos estándar conocidos.

Evaluación de la habilidad del *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 en la segmentación de enlaces orgánicos de C-N

Para evaluar la habilidad de segmentación de enlaces orgánicos de C-N del *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806, se hace crecer este organismo en un medio ModA que usa la quinolina como única fuente de nitrógeno. Se produce una camada de cultivo $OD_{600}=1.67$, que es recogida y se vuelve a suspender en un medio ModA de 100mls. Se divide el cultivo en dos porciones de 50 ml y 3 ml de petróleo de esquisto (1,7 de porcentaje de peso de nitrógeno) es añadido a cada una. A continuación los cultivos son incubados sometidos a agitación a temperatura ambiente durante la noche (16 horas), y se separa y analiza el petróleo. La cantidad de quinolina presente en las muestras tomadas es determinada por GC, correspondiendo al área bajo el punto cumbre a un tiempo de retención de quinolina.

Preparación de un cultivo puro de cepa de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806

La preparación de un cultivo puro de un microorganismo capaz de segmentación orgánica del enlace C-N mientras se mantiene el valor calorífico de la molécula orgánica de acuerdo con la presente invención incluye la recogida de muestras del ambiente obtenidas de emplazamientos contaminados con petróleo, la inoculación de

quimiostatos y experimentos con matraces vibratorios en los que se proveen 3mM a 20mM de quinolina como fuente exclusiva de nitrógeno. Pasado el periodo inicial de toxicidad de la quinolina, se mezclan la cosechas de crecimiento bacteriano y se prueban los cultivos puros por sistema de Ensayo de Biodisponibilidad de Nitrógeno para detectar los cultivos capaces de utilizar quinolina como fuente de nitrógeno, pero no como fuente de carbono.

Se observa que los cultivos inicialmente obtenidos de los quimiostatos que utilizan quinolina la degradan totalmente, usándola como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno. Entonces se incrementan los caudales de quimiostatos para disminuir los tiempos de retención hidráulica desde 96 horas a 4 horas. Las células del efluente de quimiostato son mutagenizadas y restituidas al quimiostato. Eventualmente se obtiene un cultivo puro con resultados de Ensayo de Biodisponibilidad de Nitrógeno que indican que la quinolina fué utilizada como fuente de nitrógeno pero no como fuente de carbono. Una secuencia parcial del gene 16S-rRNA de estas bacteria Gram negativa con aspecto de vástago fué identificada como *Pseudomonas ayucida*, la cual fué depositada en el ATCC bajo el N° PTA-806. *P. monteliii*, que muestra 99% de homología, y *Pseudomonas nitroreducens* y *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, mostrando ambas 98,3% de homología, se encuentran estrechamente relacionadas, pero no son idénticas a la *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806.

Naturalmente se desconoce si las cepas ocurrentes de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 son capaces de segmentación selectiva de enlaces de C-N en quinolina utilizando la quinolina como fuente de nitrógeno pero no de carbono. Por lo tanto, el cultivo aquí aislado y sujeto de esta patente es único y es un mutante de *Pseudomonas ayucida* que fué intencionalmente producido en el laboratorio por experimentos de cultivo enriquecido/evolución dirigida llevados a cabo por el Solicitante.

Pseudomonas ayucida ATCC N° PTA-806 tiene un tiempo de doblaje de célula de 4,25 horas cuando se hace crecer en un medio de sales definidas a 30°C con quinolina como fuente exclusiva de nitrógeno.

También se llevaron a cabo pruebas de gama de sustratos y especificidad para el microorganismo de la invención, utilizando inoculaciones derivadas de todos

esos compuestos organonitrogenados mencionados que fueron crecidos en un previo Ensayo de Biodisponibilidad de Nitrógeno..

Se encuentra *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 creciendo en urea, triptofan, lisina, guanina, ácido nicotínico, quinolina, 3,4-dihidro-(1H)-quinolinona,

2,4-quinolinediol, 8-hidroxiquinolina, y quinoxalina como fuentes exclusivas de nitrógeno, pero ninguna de éstas sirven de fuentes de carbono.

Debe observarse que el crecimiento con urea, triptofan, lisina, guanina y ácido nicotínico como fuentes de nitrógeno es una habilidad común poseída por un gran número de bacterias aeróbicas y muy probablemente no tenga relación con las vías metabólicas pertinentes a la utilización de quinolina.

El cultivo creció en la presencia de todos los compuestos de ensayo, excepto 1-butilpirrolidina y 2-metileno-1,3,3-trimetil indolina cuando la quinolina se encontraba simultáneamente presente como fuente alternativa de nitrógeno.

Se llevó a cabo TLC en los extractos derivados de los supernadantes de cultivo de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 cultivada en crecimiento con quinolina como fuente exclusiva de nitrógeno, además de células pre-crecidas incubadas durante periodos diferentes en presencia de quinolina en la forma descrita anteriormente. En todos los experimentos se incluyeron controles del cultivo crecido utilizando amoníaco en lugar de quinolina como fuente de nitrógeno. Adicionalmente, se incluyeron como controles productos químicos puros posibles metabolitos de quinolina, tales como protocatachuate, catechol, ácido pirúvico y ácido p-hidroxibenzoico, formamida, 8-hidroxiquinolina y ácido succínico dimetil éster, como norma estándar en experimentos de TLC para observar si estos compuestos se formaron durante la degradación microbiana de la quinolina. Se identificaron dos puntos con factores de valor de Retardo (Rf) de 0,73 y 0,88 como posibles metabolitos de quinolina por *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 ya que estos compuestos sólo fueron observados en muestras derivadas de la incubación de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 con quinolina. Células del mismo cultivo incubadas con amoníaco no produjeron estos compuestos. TLC de por sí no identificó estos dos compuestos, de forma que se retiraron los puntos en los platos de TLC, fueron eluidos con acetato de etilo y sometidos a análisis de GC/MS.

El análisis de Cromatografía/Espectroscopia de Masa (GC/MS) puede ser también efectuado en extractos derivados de la célula en crecimiento, además de las células en reposo de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806, permitiendo la posible detección de metabolitos que no presentan puntos detectables en TLC. Dos compuestos pueden ser identificados como metabolitos de quinolina producidos por *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806: 2-quinolinona y 8-hidroxycoumarina. Los

datos de MS de comparación de estos metabolitos con 2-quinolina auténtica y 7 hidroxycoumarina (7-hidrox-2H-1benzopiran-2-uno) son ilustrados en FIGS. 1 y 2, respectivamente.

Se puede usar GM/MS para seguir analizando los metabolitos de quinolina producidos por *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806, siendo cuantificada la relativa abundancia de estos dos metabolitos con las células en reposo expuestas a quinolina durante diferentes periodos. Los resultados son mostrados en la TABLA 1 a continuación.

TABLA 1

Metabolito	15 minutos	60 minutos	4 horas
2-quinolinona	47,8%	37,3%	17,2%
8-hidroxycoumarina	8,4%	17,3%	16,7%

Los datos indicados en la Tabla 1 son expresados como porcentaje del área total de todos los picos presentes en la cromatografía (con la excepción de quinolina). Estos datos muestran insistentemente que la quinolina es primero convertida a 2-quinolinona y entonces a 8-hidroxycoumarina, con otros metabolitos intermedios también. FIG. 3 anexa ilustra las estructuras de 2-quinolinona y 8-hidroxycoumarina, cuyos dos compuestos constituyen una vía

parcial para la biotransformación de quinolina por el *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806.

La oxigenación del átomo de carbono adyacente al átomo de nitrógeno en la quinolina para formar 2-quinolinona es consistente con la segmentación selectiva de enlaces C-N en la quinolina por el *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806.

Aún más, los resultados de las pruebas de gama de sustratos, que muestran que *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 puede utilizar quinolina, 3-4dihidro2(1H)quinolinona, 2,4-quinolinediol, 8-hidroxiquinolina y quinoxalina, también son consistentes con la vía parcial ilustrada en FIG 3.

El hecho de que 8-hidroxycoumarina no contiene nitrógeno demuestra que *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 es capaz de retiro selectivo del nitrógeno de la quinolina.

Pseudomonas ayucida ATCC N° PTA-806 no utiliza 8-hidroxycoumarina como fuente de carbono, lo cual indica que este compuesto no sigue siendo degradado por este cultivo. Se cree que la decrecida abundancia de 8-hidrocoumarina tras prolongados periodos de incubación es el resultado del creciente enlace a biomasa haciendo decrecer la eficiencia de recuperación de este compuesto en los procesos analíticos.

Al contrario de lo que sucede con muchos microorganismos degradantes de la quinolina que producen metabolitos rosados, verdes y marrones, el *Pseudomonas ayucidad* ATCC N°PTA-806 no produce metabolitos coloreados.

Por ello, las investigaciones llevadas a cabo por el Solicitante demuestran que el cultivo puro del *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 de la invención tiene dos características únicas, patentemente distintivas:

- La incapacidad de usar la quinolina como fuente de carbono.
- La segmentación selectiva de enlaces de C-N en la quinolina y compuestos organonitrogenados relacionados.

La presente invención será ahora ilustrada con un ejemplo específico, el cual no deberá ser interpretado como limitador de la invención.

EJEMPLO

Una prueba de bidenitrogenación de petróleo según los principios de la invención demuestra la habilidad del *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 de retirar nitrógeno del petróleo de esquisto. *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 fué cultivado creciendo de la forma descrita anteriormente, utilizando quinolina como fuente exclusiva de

18

18
nitrógeno. Entonces, las suspensiones de célula concentradas de lavado de duplicado fueron incubadas con muestras de petróleo de esquisto durante 16 horas a 30°C. La muestra de control consistió de petróleo de esquisto añadido a un medio esteril ModA que fué incubado durante 16 horas a 30°C. Después de la incubación, las muestras de petróleo fueron recuperadas y analizadas. Los resultados han sido alistados en la TABLA 2 a continuación, indicando que las células pre-cultivadas de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 son capaces de retirar aproximadamente un 5% del nitrógeno orgánico total y aproximadamente un 68% de quinolina del petróleo de esquisto durante una incubación (de 16 horas) de una noche a otra. Los resultados en la Tabla 2 son reportados como un porcentaje del petróleo limpio, excepto por la cantidad de quinolina que se expresa como el área bajo el pico correspondiente al tiempo de retención de quinolina en cromatógrafos de gas.

TABLA 2

Elemento	Petróleo Control	Biotratado Petróleo N° 1	Biotratado Petróleo N° 2
Carbono - % peso	85,01	85,21	84,87
Hidrógeno - % peso	9,69	9,81	9,81
Nitrógeno - % peso	1,71	1,63	1,62
Sulfuro - % peso	1,41	1,34	1,36
Quinolina - % peso (Área pico GC)	177.495	58.502	57.415

Los datos en la Tabla 2 demuestran por lo tanto que el total de nitrógeno en el petróleo puede ser reducido en un 5% como resultado de la exposición del petróleo al cultivo puro de la invención. Aún más, aproximadamente un 68% de la quinolina presente en el petróleo puede ser retirado como consecuencia del biotratamiento y por ello se pueden lograr procesos de biorefinería para el retiro selectivo de nitrógeno

del petróleo, en presencia de biocatalizadores tales como *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 de la invención.

Derivados de *Pseudomonas ayucida* de N° ATCC han sido seleccionados habiendo mejorado la habilidad de utilizar quinoxolina como fuente exclusiva de nitrógeno. Este cultivo derivativo retiene su habilidad de segmentación selectiva de enlaces de C-N en la quinolina y posee una gama incrementada de sustratos para el metabolismo de compuestos organonitrogenados adicionales tales como la quinazolina y la isoquinolina. De forma similar, derivados de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 que son resistentes a antibióticos, ya sea mediante aislamiento de mutaciones cromosómicas o por la introducción de plásmidas apropiados, retienen la habilidad de segmentación selectiva de enlaces C-N en la quinolina y en otros compuestos organonitrogenados. Esta propiedad hace que el *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 y sus derivados sean un agente específico de uso en síntesis química orgánica para la segmentación de enlaces de C-N que puede ser utilizada en diversos sistemas de procesos orgánicos. De la misma manera, las características únicas del *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 y sus derivados que poseen la habilidad de segmentación selectiva de enlaces C-N pueden servir para la degradación de desnitrogenación de una gran variedad de materiales orgánicos.

Aunque en la especificación antedicha, esta invención ha sido descrita en relación a ciertas aplicaciones en medios preferidos y se han provisto muchos detalles a efectos de ilustración, resultará aparente a los expertos en la materia, que la invención es susceptible de aplicaciones adicionales y que ciertos detalles aquí descritos pueden variarse considerablemente sin apartarse de los principios básicos de la invención.

I REIVINDICACIONES:

1. Un cultivo de cepa de microorganismo mutante *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806.
2. Un cultivo del microorganismo mutante *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 que posee la habilidad de reducir selectivamente el contenido de nitrógeno de material carbonáceo orgánico conteniendo nitrógeno mediante segmentación de enlaces orgánicos de C-N y produciendo 8-hidroxycoumarina cuando en un medio de crecimiento que comprende nutrientes minerales y una fuente asimilable de carbón en substancial ausencia de compuesto contenedor de nitrógeno excepto dicho material orgánico carbonáceo que contiene nitrógeno, y en la presencia de oxígeno a temperaturas de unos 25°C a 35°C.
3. Un cultivo de microorganismo mutante *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 que tiene la habilidad de reducir selectivamente el contenido de nitrógeno de material carbonáceo orgánico conteniendo nitrógeno mediante segmentación de enlaces orgánicos de C-N, exponiendo las citadas células bacteriales intactas, extractos de célula o enzimas purificados de la segmentación de enlace de C-N a materia orgánica carbonácea contenedora de nitrógeno a temperaturas de desde 15 a 40°C en la presencia de oxígeno.
4. Un cultivo de microorganismos derivados de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 que posee la habilidad de reducir selectivamente el contenido de nitrógeno material orgánico carbonáceo contenedor de nitrógeno mediante segmentación de los enlaces orgánicos de C-N y producir 8-hidroxycoumarina cuando crece en un medio que contiene nutrientes minerales y una fuente asimilable de carbono en la substancial ausencia de compuesto conteniendo nitrógeno excepto dicho material carbonáceo contenedor de nitrógeno y en presencia de oxígeno a temperaturas de unos 25°C a 35°C.
5. Un cultivo de microorganismos derivados de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 que tiene la habilidad de reducir selectivamente el contenido de nitrógeno de material carbonáceo orgánico contenedor de nitrógeno mediante segmentación de enlaces orgánicos de C-N exponiendo las citadas células bacterianas intactas, extractos de célula o enzimas purificadas de

segmentación de enlace C-N a materia carbonácea orgánica a temperaturas de 15°C a 40°C en la presencia de oxígeno.

EXTRACTO

Se describe una cepa mutante de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 que es capaz de segmentar selectivamente enlaces orgánicos de C-N y reduce el contenido de nitrógeno de material orgánico carbonáceo.

CAVELIER
ABOGADOS

OFICINA SUEY
CARRERA 4ª N° 73-35
BOGOTÁ, S. COLOMBIA

REPRESENTACION Y PODER

Yo (nosotros), abajo firmado(s) Petróleo
Brasileiro S.A. - PETROBRAS

domiciliado(s) en Avenida República do
Chile, 65, Rio de Janeiro RJ, BRASIL

por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; ERNESTO CAVELIER, tpa. 11819; y EMILIO FERRERO, tpa. 31929; domiciliados en la Carrera 4ª N° 73-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 843 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como nuestros representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplente, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, y bajo las mismas reglas, conferimos poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de tal (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizamos (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades: o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas y de servicios; el depósito de nombres comerciales y enseñas; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de oposición, cancelación, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, desistír, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos hechos por agentes oficiosos.

Dado y firmado hoy 30 Agosto 1995

en Rio de Janeiro

Para patentes, modelos, diseños, marcas de fábrica o servicios; nombres comerciales e insignias.

Para patentes, modelos, dibujos; marcas de fábrica y de servicio; nombres comerciales y enseñas.

REPRESENTAÇÃO E PODER

Eu (nós) abaixo assinado(s) Petróleo
Brasileiro S.A. - PETROBRAS

domiciliado(s) em Avenida Republica do
Chile, 65, Rio de Janeiro,
RJ, BRASIL

pelo presente nomeamos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; ERNESTO CAVELIER, tpa. 11819 e EMILIO FERRERO, tpa. 31929, domiciliados na Carrera 4ª N° 73-35, Bogotá, Colombia, em sujeição ao disposto no parágrafo 1º do Artigo 843 do Código de Comércio, o primeiro como o principal e os outros como substitutos, nessa ordem, como nossos representantes em todos os assuntos da propriedade industrial, com a faculdade para receber notificações e nomear procuradores judiciais ou extra-judiciais. No caso de ausência ou impedimento temporal ou definitivo do principal, o primeiro representante substituto substituirá aquele. Será aplicada a mesma regra quando o segundo representante substituto tenha que substituir ao primeiro, ou o terceiro ao segundo. Em tais ocasiões, o representante principal, ou o primeiro ou o segundo substituto em sua ocasião ou as dois, declararão sua intenção em não exercer a representação mediante declaração atestada por Tabelião Público na Colômbia, ou por Tabelião ou outro Funcionário Público, ou Consul da Colômbia no exterior; e se for impedimento, com o certificado competente. Se algum dos nomeados faltasse definitivamente, o seguinte tomará o seu lugar. Quando a ausência ou impedimento do representante principal cessar, ou em tal caso a de seu primeiro, segundo ou terceiro substituto, poderão exercer a representação nessa ordem, uns ou outros, segundo o caso, assumindo-a pelo o só fato de exercê-la, cessando nesse momento o exercício da representação pelo primeiro, o segundo ou o terceiro substituto em seu caso. Além disso, e sob as mesmas regras, conferimos procação aos advogados acima nomeados, para obter a proteção de minha (nossa) propriedade industrial e contra a concorrência desleal, a cujo efeito autorizo (amos) aos dits mandatários para que nos representem diante de, quaisquer entidades ou pessoas, exerçam ou não jurisdição, especialmente ante as do orden administrativo, contencioso-administrativo e judicial, com relação aos seguintes assuntos: a) Obtenção das patentes de invenção, modelos e desenhos industriais; ou registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas ou de serviços; ou depósito de nomes comerciais e enseñas; sua renovação, transigência, troca de nome, ou domicilio; cancelação voluntária; e o registro de licenças para ou uso desses direitos; b) Ações de oposição, cancelação, nulidade, medidas cautelares, concessão de licenças e em geral, os pleitos civis, penais, administrativos ou contencioso-administrativos relativos a esses direitos, ações e pleitos que entabulamos ou se nos entabularem; e c) para que em todos os assuntos já determinados possam substituir esse mandato, transigir, desistir, cancelar, receber renunciar, e ratificar os atos dos agentes oficiosos.

30 de agosto de 1995

Dado e assinado hoje Rio de Janeiro

em

Firma
ALOÍSIO FÉLIX DA NÓBREGA

ALOÍSIO FÉLIX DA NÓBREGA
Technology Marketing Manager
Research & Development Center
Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

CONSULADO DE COLOMBIA
No.71/95.

El Suscrito Cónsul General de Colombia en Rio de Janeiro, visto los documentos presentados por los interesados, CERTIFICA: Que la Señora CRISTINA MAMBRINI SANTOS MOREIRA PINTO, quien como Escribiente Autorizada de la Notaría 23o. de Rio de Janeiro, Brasil, autenticó la firma del signatario del poder precedente, ejercía en la fecha las funciones indicadas y su firma corresponde a la registrada en este Consulado.

Que la Compañía PETRÓLEO BRASILEIRO S/A - PETROBRÁS es una sociedad constituida de acuerdo con las leyes del Brasil y cumple su objetivo conforme a las mismas.

Que el Señor ALOÍSIO FÉLIX DA NÓBREGA, quien en su caracter de Jefe del Sector de Comercialización de Tecnología de la citada Compañía, confiere el poder precedente y cuya firma fué autenticada ante la Notaría 23o. de Rio de Janeiro, Brasil, es su representante legal en este país.

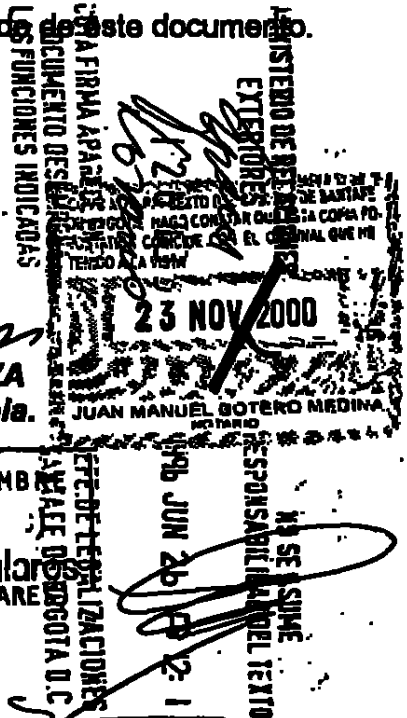
El Cónsul no asume responsabilidad por el contenido de este documento.

Rio de Janeiro, septiembre 25 de 1995.



Efraim Lozano Galarza
EFRAIN LOZANO GALARZA
Cónsul General de Colombia.

PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE
US\$ 6,00 (Seis dólares)
Pagado Derechos Consular
US\$ 50,00 (CINCUENTA DOLÁRESE)



15013
MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SAN
DE BOGOTA, SAGO CONSTAR QUE ESTA C
INSTANCIA CONCIERNE CON EL BANGHAN QUE HA
JERENDO A LA LISTA

23 NOV 2000

JUAN MANUEL GONZALEZ MORALES

Notario

Resolución 8085

Tratado de Libre Comercio

Ministerio de Justicia

Secretaría de Justicia

[illegible]

Consuelo Salazar Santa María
Traductora Oficial Juramentada
Resolución 8085
Ministerio de Justicia - Colombia
Consuelo Salazar Santa María

Traducción Oficial No. 2019.

TRADUCCION OFICIAL N° 2019 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN PORTUGUES EFECTUADA EL 1° DE JULIO DE 1998 POR CONSUELO S. DE SANTA MARIA, C.C.20.165.248 DE BOGOTA, INTERPRETE Y TRADUCTORA OFICIAL JURAMENTADA SEGUN RESOLUCION N°8085 DEL MINISTERIO DE JUSTICIA - SANTAFE DE BOGOTA - COLOMBIA.-

Sellos en portugués que aparecen a continuación de un documento escrito en español y portugués: "REPRESENTACION Y PODER" - otorgado por Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS - de Rio de Janeiro, RJ, Brasil, - a GERMAN CAVELIER, tpa. 832, GONZALO PERDOMO, tpa. 831, ERNESTO CAVELIER, tpa. 11519 y EMILIO FERRERO, tpa. 31929, domiciliados en Bogotá, Colombia, firmado en Rio de Janeiro, el 30 de agosto de 1995. Firmado por Aloísio Félix da Nóbrega.

COLOMBIA - SANTAFE DE BOGOTA
NOTARIA 23ª
23 NOV 2000
MAQUILANUELA INHO

Sello: Notaría 23ª. - Principal - Notario: GUIDO MACIELANUELA INHO Pecanha, 26, 3er. piso/RJ. - Teléfono: 533-5500 - N° 731141 -

Reconozco por semejanza la(s) firma(s): ALOISIO FELIX DA NOBREGA. - Rio de Janeiro, 13 de Septiembre de 1995 a las 11:22:10. - En testimonio de la verdad. (fdo): firma ilegible. - CRISTINA MAMBRINI SANTOS MOREIRA PINTO - RFO - UFERJ. - 33,40 P/Firma 0.0040 P/Proc. Datos 0.04. - (ilegible) - R\$ 1,46. - Notaría 23ª. - (fdo): assinatura ilegível. Cristina Mambrini S.M. Pinto. Empleada Autorizada.- MTPS-97760 (ilegible) RJ.

26

Traducción Oficial N° 2019. _____

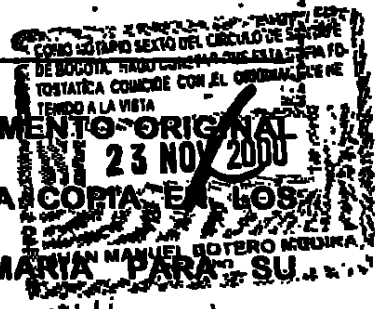
Un (1) certificado en español del Consulado General de Colombia en
Ri de Janeiro, N° 71/95, con fecha del 25 de septiembre de 1995,
firmado por Efraín Lozano Galarza, Cónsul General, certificando la
firma y cargo de Cristina Mambrini Santos Moreira Pinto, y la
existencia legal de la Compañía Petróleo Brasileiro S/A - PETROBRAS.

Pagado Impuesto de Timbre US\$ 6,00 (US seis dólares).

Pagados Derechos Consulares US\$50,00 (cincuenta US dólares).

Un (1) sello en español del Ministerio de Relaciones Exteriores, N°
126733, con fecha del 26 de Junio de 1996 P 12:11, firmado por el
Jefe de Legalizaciones, certificando la firma y cargo de Efraín
Lozano.

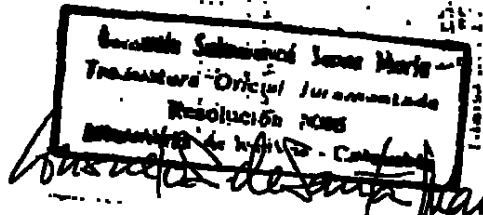
ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA DEL DOCUMENTO ORIGINAL
QUE TENGO A LA VISTA DE LA CUAL QUEDA COPIA EN LOS
ARCHIVOS DE CONSUELO S. DE SANTA MARIA PARA SU
CONFRONTACION.....



COMO NOTARIO SEXTO DE SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA DE

[Signature]
[Signature]

C. C. _____
COINCIDE CON LA REGISTRADA POR EL (ELLOS)
EN ESTA NOTARIA. 05 JUL. 1996



C.C. 20.165.246 Bgt.

SANTAFE DE BOGOTA, D. C.



RESPONSARILIDADE

700' 500'

DEFECCIONES
SANTAFE DE BOGOTA

5380183 R3
C74710Y 13330 0:53151818

0.5-1.5

33

10. **10.000**

35

APPENDIX

ACHD=530

Introduction

1

■

1

100

2

23 NOV 2000

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

EN ESTA HOTEL
CONCIERGE POR LA
02 JUL 1952

244141 0.0.41000 0.0.41000

TELEFAX (57) (1) 2358990
TEL. 43479 CAVE CO
(23) 710 7379 CAVE UC

CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 49, No. 72-35
BOGOTA 8, COLOMBIA

27.
CORREO ELECTRONICO MUNDIAL: CAVE
TELEFONO (57) (1) 2120100
CABLES: CAVELEYES

Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Poderdante: PETROLEO BRASILEIRO S.A. - PETROBRAS

Poder conferido el: 30-08-95

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento.

Señor Jefe,


GERMAN CAVELIER

T.P.A. No. 832

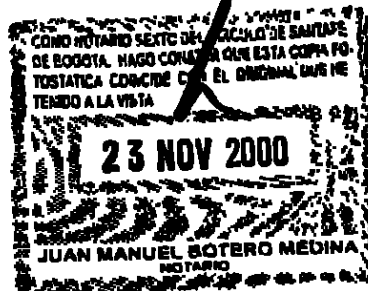
C.C. No. 2.877.924 de Bogotá

Acepto:


EMILIO FERRERO

T.P.A. No 31.929

C.C. No. 438.019 de Usaquén



2e-780-2

NOTARIA CENTA DE BOGOTÁ
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACIÓN PERSONAL
Santafé de Bogotá D. C. 02 JUL 1988
Ante mí JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO TITULO DE FIDUCIARIO DE LA ESCALA
Comparación(aron) y presentación de

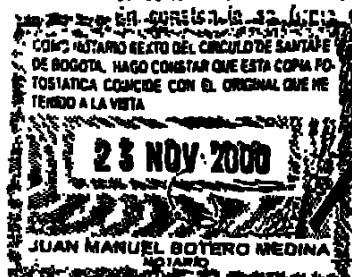
[Handwritten signature]

quienes exhibieron el documento 2877924
438019

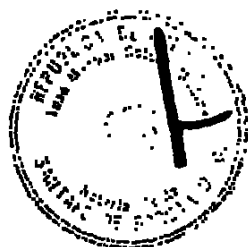
y legalización y firma de 832 832 =
31929

de los cuales en virtud y fe de lo cual que
aparece en el presente documento es(son) la(s) copia(s) y que
el contenido del mismo es cierto.

En consecuencia se otorga esta diligencia.



[Handwritten signature]



Se extraen folios 30
extracto. Angelmy
tarjetas folios 28, 29
[Handwritten mark]



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

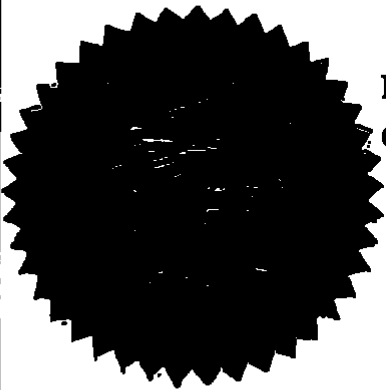
United States Patent and Trademark Office

February 11, 2000

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: 09/449,615

FILING DATE: November 30, 1999



By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

P. SWAIN
Certifying Officer

LAW OFFICES
SUGHRUE, MION, ZINN, MACPEAK & SEAS, PLLC

2100 PENNSYLVANIA AVENUE, N.W.
WASHINGTON, D.C. 20037-3202
TELEPHONE (202) 293-7060
FACSIMILE (202) 293-7860

10525 U.S. PTO
09/449615
11/30/99

32
29

CALIFORNIA OFFICE

18 EL CAMINO REAL
SUITE 200 PARK, CA 94025
TELEPHONE (650) 325-5800
FACSIMILE (650) 325-6606

BOX: PATENT APPLICATION

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

November 30, 1999

JAPAN OFFICE

TOEI NEWS SHIMBASHI BLDG. 4F
13-6 NISHI SHIMBASHI 1-CHOME
MINATO-KU, TOKYO 105, JAPAN
TELEPHONE (03) 3503-3760
FACSIMILE (03) 3503-3766

Re: Application of John J. KILBANE II, Claudia Maria Soares RIBEIRO and Monica Moraes LINHARES
MICROORGANISMS USEFUL FOR CLEAVAGE OF ORGANIC C-N BONDS
Our Reference: Q56963

Dear Sir:

Attached hereto is the application identified above including the specification, claims, executed Declaration and Power of Attorney, three (3) sheets of drawings, Preliminary Amendment, Information Disclosure Statement and PTO Form 1449 with references, executed Assignment and PTO Form 1595.

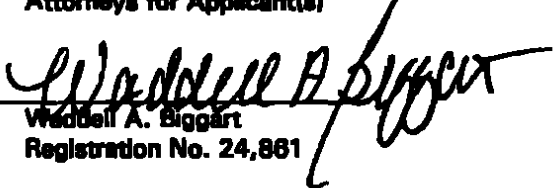
The Government filing fee is calculated as follows:

Total Claims	5 - 20 =	0 x \$18 =	\$ 000.00
Independent Claims	5 - 3 =	2 x \$78 =	\$ 156.00
Base Filing Fee	(\$780.00)		\$ 780.00
Multiple Dep. Claim Fee	(\$260.00)		\$ 000.00
TOTAL FILING FEE			\$ 916.00
Recordation of Assignment Fee			\$ 40.00
TOTAL U.S. GOVERNMENT FEE			\$ 956.00

Checks for the statutory filing fee of \$ 916.00 and Assignment recordation fee of \$ 40.00 are attached. You are also directed and authorized to charge or credit any difference or overpayment to Deposit Account No. 19-4880. The Commissioner is hereby authorized to charge any fees under 37 C.F.R. 1.16 and 1.17 and any petitions for extension of time under 37 C.F.R. 1.136 which may be required during the entire pendency of the application to Deposit Account No. 19-4880. A duplicate copy of this transmittal letter is attached.

The Office is invited to contact the above firm on any question which might arise on the above-named application. Any contact that the Office might need to make should be directed to Brett S. Sylvester, Registration No. 32,765, at (202)293-7060.

Respectfully submitted,
SUGHRUE, MION, ZINN, MACPEAK & SEAS
Attorneys for Applicant(s)

By 
Waddell A. Biggart
Registration No. 24,861

WAB:sfb

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of

John J. KILBANE II, Claudia Maria Soares RIBEIRO and Monica Moraes LINHARES

Serial No.: NOT YET ASSIGNED

Filed: November 30, 1999

For: MICROORGANISMS USEFUL FOR CLEAVAGE OF ORGANIC C-N BONDS

PRELIMINARY AMENDMENT

Assistant Commissioner for Patents

Washington, DC 20231

Sir:

Prior to examination of the above-identified application, please amend the above-mentioned application as follows:

IN THE SPECIFICATION:

- Page 4, lines 26 and 27, please delete "ATCC"; and
lines 26 and 27, please delete "PTA-806" (second occurrence).
Page 6, lines 1, 5, 8, 13, 14, 21, 27, 30 and 33, please delete "ATCC".
Page 11, line 33, please delete "ATCC".
Page 12, lines 1, 12, and 31, please delete "ATCC".
Page 13, lines 7, 14 and 28, please delete "ATCC".
Page 14, lines 2, 4 and 17, please delete "ATCC"; and
lines 1 and 4 from the bottom of the page, please delete "ATCC".
Page 15, lines 2, 6, 7, 14, 17, 26, 27 and 34, please delete "ATCC".
Page 16, lines 3, 7, 12 and 13 from the bottom of the page, please delete "ATCC".
Page 17, line 1, please delete "ATCC".

IN THE CLAIMS:

- Claim 1, line 1, please delete "ATCC".
Claim 2, line 1, please delete "ATCC".
Claim 3, line 1, please delete "ATCC".
Claim 4, line 1, please delete "ATCC".
Claim 5, line 1, please delete "ATCC".

IN THE ABSTRACT:

- Page 20, line 1, please delete "ATCC".

REMARKS

Applicants submit no questions of new matter should arise and entry is requested.

Respectfully submitted,

Waddell A. Biggart
Waddell A. Biggart
Registration No. 24,861

SUGHRUE, MION, ZINN, MACPEAK & SEAS

2100 Pennsylvania Avenue, N.W.

Washington, D.C. 20037-3202

Tel: (202) 293-7060

WAB:alb

Date: November 30, 1999

SECRET - CONFIDENTIAL

33
30

MICROORGANISMS USEFUL FOR CLEAVAGE OF ORGANIC C-N BONDS

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to a mutant culture of *Pseudomonas ayucida* capable of selective removal of organically bound nitrogen from carbonaceous materials while maintaining the calorific value of the carbonaceous materials. The microorganisms of this invention are particularly useful in removal of organic nitrogen from fossil fuels such as nitrogen-containing coal and oils.

BACKGROUND INFORMATION

The quality of petroleum is progressively deteriorating as the highest quality petroleum deposits are preferentially produced. Consequently, the concern about the concentration of compounds/contaminants such as sulfur, nitrogen, and metals in petroleum will intensify. These contaminants are not only contributors to environmental pollution resulting from the combustion of petroleum, but also interfere with the processing of petroleum by poisoning catalysts and contributing to corrosion. Further, the presence of these contaminants lowers the price of the oil and related products. The selective removal of contaminants from petroleum while retaining the fuel value is a difficult technical challenge.

The selective removal of sulfur from dibenzothlophene with the aid of a bacterium useful for cleaving C-S bonds is taught in US patent 5,002,888.

US patent 5,297,625 teaches a method for preparing, isolating and utilizing a microorganism which can metabolize crude oils and other high molecular weight hydrocarbons as a source of energy, and emulsify heavy crudes under the extreme conditions existing in oil reservoirs.

Biorefining of petroleum is therefore a technology soon being commercialized and which may be very promising.

The removal of nitrogen and metals from petroleum is a further potential use of biocatalysts, but so far this area of research has received very little attention.

03443615-113033

32

Quinoline is perhaps the most widely studied organonitrogen compound as regards biodegradation, and quinoline is considered to be representative of many organonitrogen compounds typically found in petroleum. Many aerobic and anaerobic microbial cultures have been found that can degrade quinoline. The majority, if not the entirety, of microbial cultures described in the literature that metabolize quinoline do so by fully degrading it, and can therefore utilize quinoline as a sole source of carbon, energy, and nitrogen.

Shukla, Onkar P., In "Microbial Transformation of Quinoline by a *Pseudomonas* sp.", Applied and Environmental Microbiology, vol 51, June 1986, p. 1332-1342, reports that a *Pseudomonas* sp isolated from sewage by enrichment culture on quinoline metabolized this substrate by a novel pathway involving 8-hydroxycoumarin. Such microorganism utilizes quinoline as the sole source of carbon, nitrogen, and energy.

Schwarz, G. et al, In "Microbial Metabolism of Quinoline and Related Compounds. I. Isolation and Characterization of Quinoline-Degrading Bacteria", System. Appl. Microbiol. 10, 185-190 (1988) report that from soil, water and activated sludge 16 bacterial strains were isolated which are able to use quinoline as sole source of carbon and nitrogen. Of the 16 bacterial strains investigated, 13 could be allocated to the genus *Pseudomonas*. These bacteria are Gram-negative, straight to slightly curved, motile rods, which on HNB-agar form yellowish to cream-colored, circular, smooth or partially rough colonies. The species were identified as *Pseudomonas putida* Biovars A and B, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas testosteroni*. It is reported that growth on 2-hydroxyquinoline is common to all strains, which were investigated. With several *Pseudomonas* species the degradation of quinoline has been studied and 2-hydroxyquinoline was found to be the first intermediate in the degradation pathway.

Grant, D.J.W. et al. In "Degradation of quinoline by a soil bacterium", Microbios 1976, 15, p. 177-189, report that from garden soil a bacterium was isolated which grew aerobically in mineral salts medium with quinoline as sole C source and NH_4^+ as N source. During growth with quinoline, 2-hydroxyquinoline accumulated in the culture fluid and later disappeared. 2,6-Dihydroxyquinoline is probably the next intermediate since whole cells oxidize it rapidly and completely. Aromatic ring cleavage under aerobic conditions almost invariably

SECRET - 113030

follows the formation of a compound with two hydroxyl groups attached to a ring in positions *o*- or *p*- to each other.

O'Loughlin, E.J. et al. In "Isolation, Characterization and Substrate Utilization of a Quinoline-Degrading Bacterium", International Biodegradation and Biodegradation (1996), 107-118 report a Gram (+) rod-shaped organism identified as a *Rhodococcus* sp. capable of growth utilizing quinoline as the dominant carbon, energy, and nitrogen source. The isolate, designated as *Rhodococcus* sp. Q1 was also capable of growth on 2-hydroxyquinoline, pyridine, 2,3-dimethyl pyridine, catechol, benzoate, and protocatecholic acid, suggesting a diverse capacity for aromatic ring degradation. Although ring nitrogen was released into the growth medium as ammonium, quinoline degradation was not limited by the availability of inorganic N. A degradation product identified as 2-hydroxyquinoline was identified on the basis of several spectroscopic analyses.

Thus, although the cited literature mentions microbial cultures able to metabolize quinoline by fully degrading it, the use of such cultures in a petroleum biodegradation application would require that nitrogen be selectively removed from quinoline leaving the carbon and the calorific value of the molecule intact.

As related in the literature, the metabolic pathways utilized by various aerobic quinoline-degrading microorganisms were shown to initiate the degradation of quinoline by oxidizing and removing nitrogen from quinoline. As no other source of carbon was provided, the metabolism of such species would proceed by cleaving C-C bonds.

While the biodegradation of quinoline has been reasonably well studied there is very little information concerning the use of quinoline-degrading microorganisms to remove nitrogen from petroleum. On the other hand, several quinoline-degrading *Pseudomonas* were found to have no ability to remove significant levels of nitrogen from crude oil or asphaltene fractions of petroleum. (Aislabie et al. 1990, "Microbial Degradation of Quinoline and Methyquinoline", Appl. Environ. Microbiol. 56: 345-351).

Therefore there is the need to isolate aerobic microbial cultures capable of utilizing quinoline as a nitrogen source, but incapable of utilizing quinoline as a carbon source, then examining the metabolic pathway of quinoline

660511-5796460

degradation as well as the ability of such cultures to selectively remove nitrogen from petroleum, these goals being achieved by the present invention.

SUMMARY OF THE INVENTION

It is an object of this invention to provide a microorganism and a process for removal of organically bound nitrogen from nitrogen-containing organic carbonaceous materials.

It is another object of this invention to provide a microorganism and process for selective nitrogen removal from organic nitrogen-containing fossil and fossil derived fuels.

It is yet another object of the present invention to provide a microorganism and process capable of specific cleavage or formation of C-N bonds in reactions of organic carbonaceous materials, such as in organic synthesis.

It is yet another object of this invention to provide a microorganism, which is stable and retains its nitrogen specific characteristics under process conditions using the microorganism for cleavage of organic C-N bonding.

It is another object of this invention to provide a microorganism and process for specific nitrogen removal from quinoline resulting in substantially sole products of 2-quinolinone and 8-hydroxycoumarin.

The above and other objects and other advantages, as will become evident from reading of this description, have been achieved by the pure culture of a microorganism which has been isolated and subjected to processes as set forth in further detail in the present specification and identified as *Pseudomonas ayucida*. The culture has been deposited with American Type Culture Collection, 10801 University Blvd Manassas, VA 20110-2209, U.S.A and assigned ATCC N° PTA-806 PTA-806.

Pseudomonas ayucida ATCC N° PTA-806 PTA-806 may be prepared by inoculating samples derived from sites having present materials of C-N bonding desired to be cleaved, a growth medium comprising mineral nutrients, an assimilable source of carbon, and in substantial absence of a nitrogen-containing compound, except compounds having nitrogen present only in C-N bonding of the type desired to be cleaved; growing the bacterial culture in the presence of oxygen at temperatures about 30°C for sufficient time to selectively

00449515-113003

37
34

produce *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 which has the property of selective cleavage of C-N bonds in organic carbonaceous materials.

Nitrogen content of nitrogen-containing organic carbonaceous materials may be reduced by contacting such nitrogen-containing organic carbonaceous material with the microorganism *Pseudomonas ayucida* strain ATCC N° PTA-806. The process is especially suitable for use where the nitrogen-containing carbonaceous material is shale oil or hydrocarbon oil. Continuous growth of *Pseudomonas ayucida* strain ATCC N° PTA-806 in the presence of nitrogen-containing shale oil results in the removal of more than 5% total nitrogen and preferably more than 68% of the total quinoline. The process for reducing the nitrogen content of the nitrogen-containing organic carbonaceous material occurs by cleavage of organic C-N bonds by the microorganism *Pseudomonas ayucida* strain ATCC N° PTA-806. The organic nitrogen selective pure culture of *Pseudomonas ayucida* strain ATCC N° PTA-806 has the ability to selectively reduce the nitrogen content of nitrogen-containing organic carbonaceous material by cleavage of organic C-N bonds by production of 2-hydroxyquinoline and 8-hydroxycoumarin when grown in a growth medium comprising mineral nutrients and an assimilable source of carbon in the substantial absence of a nitrogen-containing compound except the nitrogen-containing organic carbonaceous material, and in the presence of oxygen at temperatures about 35°C to about 30°C. Derivatives of *Pseudomonas ayucida* strain ATCC N° PTA-806 retain the ability to selectively reduce the nitrogen content of nitrogen-containing organic carbonaceous materials by cleavage of organic C-N bonds in the same fashion.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIGURE 1 is a graph which illustrates a comparison of MS data of a metabolite of quinoline produced by *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 with 2-quinollnone.

FIGURE 2 is a graph which illustrates a comparison of MS data of a metabolite of quinoline produced by *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 with 7-hydroxy-2H-1-benzopyran-2-one (7-hydroxycoumarin).

FIGURE 3 is a schematic representation of the partial pathway for the degradation of quinoline by *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806.

06045615-113093

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED MODES

Environmental cultures having a known history of exposure to organonitrogen compounds as well as enrichment cultures using as carbon sources acetate, benzene, benzoic acid, ethanol, glucose, glycerol, nutrient broth, succinate, and toluene and organic nitrogen compounds such as quinoline, carbazole and pyridine produce bacterial cultures capable of metabolizing each of the organic nitrogen compounds used. All of the environmental isolates and enrichment cultures tested are reported in the literature to metabolize organonitrogen compounds by initiating biodegradation of the carbon-carbon bond and/or by utilizing the organonitrogen compound as a carbon and energy source.

According to the technical literature, the most widely-known microorganisms for nitrogen utilization from organonitrogen compounds are *Pseudomonas* isolated from enrichment cultures employing quinoline as the sole source of nitrogen. These *Pseudomonas* species while capable of utilizing organically bound nitrogen fails to show specificity for the oxidation of carbon-nitrogen bonds. This shows the failure of enrichment culture development of a naturally occurring microorganism showing specificity for oxidation of organic C-N bonds. Thus, an unnatural, selective mutation process must be utilized to develop a microorganism having such selective nitrogen metabolism.

Microorganisms having nitrogen-specific metabolic abilities with respect to organic substrates may be developed by selection through chemostat inoculation and shake flask enrichment culture experiments in which nutrients and organically bound nitrogen not normally found in living tissue may be supplied in the substantial absence of other available nitrogen source such as inorganic nitrogen as $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

The growth media should supply organic and inorganic nutrients for good microorganism growth, but be devoid of inorganic and other organic nitrogen-containing compounds desired to be metabolized by the microorganism. A suitable media for growth of microorganisms under organonitrogen conditions may suitably be a composition of mineral nutrients, such as 0.37g KH_2PO_4 , 0.25g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.07g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02g FeCl_3 and 20.0g of glucose/glycerol/succinate per liter of distilled, deionized water. Such medium is known as ModA. Any assimilable carbon source devoid of nitrogen may be

09443515-113033

used in amounts to support desired microbial growth. Suitable assimilable carbon sources include glucose, glycerol, sodium acetate, sodium benzoate, sodium succinate, and sucrose at concentrations of from 1 to 20 mM.

The preferred organonitrogen compound having organic C-N bonds is quinoline. Other suitable compounds having organic C-N bonds are listed hereinbelow.

Environmental samples of soil and/or water may be obtained from petroleum and coal processing sites, compost and other sites where contamination with petroleum hydrocarbons exists.

The environmental samples are used to inoculate chemostat and shake flask enrichment culture experiments to obtain cultures capable of using quinoline as a sole source of nitrogen. In the present invention, all experiments employed the above-defined mineral salt media:

0.37g KH_2PO_4

0.25g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.07g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0.02g FeCl_3

and 20.0g of glucose/glycerol/succinate per liter of distilled, deionized water.

This media is adjusted to a pH of 6.5 to 7.0 and nitrogen is supplied in the form of quinoline which is present at concentrations ranging from 1 to 20 mM, or for control experiments $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ is used at a concentration of 1.3g per liter.

Chemostats and shake flasks are operated at room temperature (25°C) or 30°C . The working volume of chemostats is one liter and shake flask experiments generally utilize 50 or 100 ml of liquid media. Flow rates of the chemostats are adjusted to achieve hydraulic retention times ranging from two days to as long as a month and the flow rates as well as the organonitrogen test compound are altered as needed to ensure that the chemostats create an environment suitable for the selection of cultures with improved abilities to selectively cleave C-N bonds. The bacterial cell density in the chemostats/shake flasks ranges from 10^2 to 10^8 cells/ml, with average cell densities of 10^4 to 10^5 cells/ml being maintained. The bacteria isolated from the effluent of chemostats and/or from shake flasks are subjected to chemical mutagenesis and/or physical mutagenesis using nitrosoguanidine (NTG) and

05443615.13033

Nitrogen Bioavailability Assay

Thus, the Nitrogen Availability Assay utilizes defined mineral salts medium in growth tests in which organonitrogen model compounds such as quinoline, pyridine, carbazole, and porphyrin serve as sources of carbon and/or nitrogen. Growth tests are performed using six conditions:

1. Test compound as sole source of carbon and nitrogen;
2. Test compound as sole source of carbon (alternative nitrogen source, ammonia, is available);
3. Test compound as sole source of nitrogen (alternative carbon source, glucose/glycerol/succinate, is available);
4. Test compound present as well as alternative sources of carbon and nitrogen;
5. Only alternative nitrogen (ammonia) and carbon (glucose/glycerol/succinate) sources are available. The test compound is not present.

6. No nitrogen compounds of any kind are present, but alternative carbon (glucose/glycerol/succinate) sources are available.

These six growth conditions constitute a bioassay for the ability of a culture to metabolize organonitrogen compounds. When carbon and nitrogen sources other than the test compounds are needed, they are supplied in the form of a glucose/glycerol/succinate mixture (20g/L) and as ammonia (20mM) respectively.

The NBA test may be performed with any organonitrogen test compound which is ordinarily used at a concentration of from 3mM to 20 mM.

In order to determine the range of organonitrogen compounds that could serve as sole sources of nitrogen for growth for the various pure cultures of the invention various organonitrogen compounds and control compounds are tested according to the Nitrogen Bioavailability Assay procedure. All compounds are highly pure, analytical grade compounds.

These compounds included:

2-Methyl-beta-Naphthothiazole;
 2-Methyl Benzothiazole;
 2(Methylmercapto)Benzimidazole;
 1,1-Methylene Bis (3-Methyl Pipridine);
 Thiazole;
 1-Butylpyrrolidine;
 2-Methylene-1,3,3-Trimethyl Indoline;
 2-Methyl-3-Propylpyrazine;
 2-Phenylbenzothiazole;
 2-Methyl Quinoxaline;
 2-Methyl Indoline;
 Carbazole;
 Quinoline;
 Quinazoline;
 Quinoxaline;
 2,4-Quinolindiol;
 Isoquinoline;
 3-Methyl Isoquinoline;
 Isocarbostyrl;

660511-51964460

12
39

23
40

Protoporphyrin;
Pyridine;
Phenyl Benzothiazole;
Nicotinic Acid;
Imidazole;
Indole;
HEPES Buffer;
Urea;
Guanine;
Lysine;
Tryptophan;
Ammonium Chloride.

The various cultures are inoculated into test tubes or shake flasks containing media components appropriate for the six test conditions.

The cultures are then incubated aerobically for 2 to 4 days, at room temperature or at 30°C.

The growth of the cultures is monitored by measuring the turbidity/optical density of the cultures in the various test conditions, or by determining colony forming units.

Test condition n°6 (nitrogen-free sample) is a negative control.

Test conditions n° 4 and 5 are positive controls since the samples are amended with both a carbon and nitrogen source and therefore should produce healthy microbial growth unless the test compound is toxic to the culture being tested. In this event only condition n° 5 should result in healthy growth.

The amount of bacterial growth observed in test conditions 1, 2 and 3 as compared with the amount of growth observed in test conditions 4, 5 and 6 indicate the ability of cultures to use the organonitrogen test compound as a source of carbon and/or nitrogen.

Cultures which show better growth in test condition n° 3 than in test conditions 1 and 2 may be preferentially utilizing the organonitrogen compound as a nitrogen source only.

Identification of Metabolites

In order to identify metabolites, Thin Layer Chromatography (TLC) is performed on Silica C-18 plates by the method described by G.K. Watson and

UNIVERSITY OF ST. LOUIS

R.B. Cain In "Microbial metabolism of the Pyridine Ring", Biochem. J. 146:146-172. Running phase solvents are for example hexane, acetic acid and xylene in the ratio of 5:1:2. Supernatants from bacterial cultures grown with quinoline as the sole source of nitrogen are extracted with ethyl acetate and run on TLC plates:

Alternatively, resting cells may be used, employing washed cell pellets derived from log phase cultures grown with either quinoline or ammonia as nitrogen sources. Concentrated cell suspensions are incubated with 20mM quinoline for periods ranging from 15 minutes to 16 hours.

Extraction of the supernatants from resting cells as well as growing cells may be carried out either by ethyl acetate solvent extraction or with C18 solid phase extraction cartridges and the extracts analyzed by TLC.

Derivation of Metabolites

Derivation of metabolites may be effected by adding semicarbazide-HCl and 2,4 dinitrophenyl hydrazine (2,4-DNPH) to some experiments followed by subsequent extraction and TLC analysis. A typical incubation mixture which utilizes metabolite derivation consists of 200 ml of Medium A (with carbon source) which contains 2g of cells dry weight, 2 mM semicarbazide-HCl, and 3 mM to 20 mM quinoline as the nitrogen source. The mixture is incubated for 2 hours and the cells are centrifuged. To the supernatant 2,4 DNPH is added, the mixture is left overnight and extracted with ethyl acetate, then separated on a TLC plate and the spots identified.

Gas Chromatography/Mass Spectrometry

GC/MS analysis is performed on extracts derived from growing and resting cell cultures exposed to quinoline, and on compounds eluted from spots observed on TLC plates.

Extraction of the supernatants from resting cells as well as growing cells may be carried out either by ethyl acetate solvent extraction or with C-18 solid phase extraction cartridges. TLC spots of possible metabolites are analyzed by GC/MS.

Mass spectrographs are compared with various libraries of mass spectrograph data prepared from known standard compounds.

Assessment of the ability of *Pseudomonas syucida* ATCC N° PTA-806 in the cleavage of organic C-N bonds

~~42~~
42

In order to assess the ability of *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 of cleaving organic C-N bonds, this microorganism is made to grow in ModA medium using quinoline as the sole nitrogen source. One liter of culture OD600=1.67 is produced, which is harvested and the cell pellet is resuspended in 100 ml of ModA medium. The culture is divided into two 50 ml portions and 3 ml of shale oil (1.7 weight % nitrogen) is added to each. Then, the cultures are incubated under agitation at room temperature overnight (16 hours), the oil is separated and analyzed. The amount of quinoline present in oil samples is determined by GC, the area under the peak being corresponding to a retention time for quinoline.

Preparation of a pure culture of mutant *Pseudomonas ayucida* strain ATCC N° PTA-806.

The preparation of a pure culture of a microorganism capable of organic C-N cleavage while maintaining the calorific value of the organic molecule according to the present invention comprises collecting environmental samples obtained from petroleum-contaminated locations, inoculating chemostats and effecting shake flask enrichment culture experiments in which 3mM to 20 mM quinoline is supplied as the sole source of nitrogen. After the initial period of toxicity of quinoline, bacterial growth yields mixed and pure cultures which are tested using the Nitrogen Bioavailability Assay to detect cultures capable of using quinoline as a nitrogen source, but not as a carbon source.

Quinoline-utilizing cultures initially obtained from the chemostats are found to fully degrade quinoline, utilizing it as a carbon as well as a nitrogen source. Then, the flow rates of the chemostats are increased so as to decrease the hydraulic retention times from 96 hours to 4 hours. Cells from the chemostat effluent are mutagenized and returned to the chemostat. Eventually a pure culture is obtained that yielded Nitrogen Bioavailability Assay results that indicated that quinoline was used as a nitrogen, but not as a carbon source. A partial sequence of the 16S-rRNA gene of this gram negative, rod-shaped bacteria was determined identifying it as *Pseudomonas ayucida* which was deposited in the ATCC under N° PTA-806. *P. montellii*, which shows 99% homology, and *Pseudomonas nitroreducens* and *Pseudomonas pseudoalcaligenes pseudoalcaligenes*, which both show 98.3% homology, are closely related, but not identical to *Pseudomonas ayucida* PTA-806. Naturally

SECRET

occurring strains of *Pseudomonas ayucda* are not known to be capable of selectively cleaving C-N bonds in quinoline utilizing quinoline as a nitrogen but not a carbon source. Therefore the culture isolated here and the subject of this patent is unique and is a mutant of *Pseudomonas ayucda* that was intentionally produced in the laboratory by the enrichment culture/directed evolution experiments performed by the Applicant.

Pseudomonas ayucda ATCC N° PTA-806 has a cell doubling time of 4.25 hours when grown in defined salts medium at 30°C with quinoline serving as the sole nitrogen source.

Substrate range and specificity tests are also carried out for the microorganism of the invention, using inocula derived from all of those organonitrogen compounds cited hereinbefore that did yield growth in a previous Nitrogen Bioavailability Assay.

Pseudomonas ayucda ATCC N° PTA-806 is found to grow on urea, tryptophan, lysine, guanine, nicotinic acid, quinoline, 3,4-dihydro-(1H)-quinolinone, 2,4-quinolinediol, 8-hydroxyquinoline, and quinoxaline as sole nitrogen sources, but none of these compounds serve as carbon sources.

It should be noted that growth with urea, tryptophan, lysine, guanine and nicotinic acid as nitrogen sources is a common ability possessed by a large number of aerobic bacteria and most likely has no relationship to metabolic pathways relevant to the utilization of quinoline.

The culture grew in the presence of all of the test compounds except 1-butylpyrrolidine and 2-methylene-1,3,3-trimethyl indoline when quinoline was simultaneously present as an alternate nitrogen source.

TLC was performed on the extracts derived from the culture supernatants of *Pseudomonas ayucda* ATCC N° PTA-806 grown with quinoline as sole nitrogen source, as well as pre-grown cells incubated for various times in the presence of quinoline as described hereinbefore. Controls of the culture grown using ammonia rather than quinoline as a nitrogen source were included in all experiments. Additionally, pure chemicals that are possible metabolites of quinoline such as protocatechuic acid, catechol, pyruvic acid and p-hydroxy benzoic acid, formamide, 8-hydroxyquinoline and succinic acid dimethyl ester were included as standards in TLC experiments to see if these compounds were formed during the microbial degradation of quinoline. Two spots having

US 4,340,000

46
43

Retardation factors (Rf) values of 0.73 and 0.88 were identified as possible metabolites of quinoline by *Pseudomonas ayucda* ATCC N° PTA-806 as these compounds were found only in samples derived from the incubation of *Pseudomonas ayucda* ATCC N° PTA-806 with quinoline. Cells of the same culture incubated with ammonia did not produce these compounds. TLC alone could not accurately identify these two compounds so the spots were scraped from TLC plates, eluted with ethyl acetate and subjected to GC/MS analysis.

Gas Chromatography/Mass Spectroscopy (GC/MS) analysis may be further performed on extracts derived from growing cell as well as resting cells of *Pseudomonas ayucda* PTA-806, allowing for the possible detection of metabolites that do not yield detectable spots in TLC. Two compounds may be identified as metabolites of quinoline produced by *Pseudomonas ayucda* PTA-806: 2-quinolinone and 8-hydroxycoumarin. MS data comparing these metabolites with authentic 2-quinolinone and 7-hydroxycoumarin (7-hydroxy-2H-1-benzopyran-2-one) are shown in FIGURES 1 and 2 respectively.

GC/MS may be used to further analyze the metabolites of quinoline produced by *Pseudomonas ayucda* ATCC N° PTA-806, the relative abundance of these two metabolites being quantified with resting cells exposed to quinoline for various times. The results are shown in TABLE 1 below.

TABLE 1

Metabolite	15 min.	60 min.	4 hours
2-quinolinone	47.8%	37.3%	17.2%
8-hydroxycoumarin	8.4%	17.3%	16.7%

The data set forth in Table 1 are expressed as a percentage of the total area of all peaks present in the chromatograph (with the exception of quinoline). These data strongly indicate that quinoline is first converted to 2-quinolinone and then to 8-hydroxycoumarin, with other intermediate metabolites as well. FIGURE 3 attached illustrates the structures of 2-quinolinone and 8-hydroxycoumarin, these two compounds constituting a partial pathway for the biotransformation of quinoline by *Pseudomonas ayucda* ATCC N° PTA-806.

The oxygenation of the carbon atom adjacent to the nitrogen atom in quinoline to form 2-quinolinone is consistent with the selective cleavage of C-N bonds in quinoline by *Pseudomonas ayucda* ATCC N° PTA-806.

45

Moreover, the results of the substrate range tests which indicate that *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 can utilize quinoline, 3,4-dihydro-2(1H)-quinolinone, 2,4-quinolinediol, 8-hydroxyquinoline and quinoxaline are also consistent with the partial pathway depicted in FIGURE 3.

The fact that 8-hydroxycoumarin contains no nitrogen demonstrates that *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 is capable of selective removal of nitrogen from quinoline. *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 does not utilize 8-hydroxycoumarin as a carbon source indicating that this compound is not degraded further by this culture. It is believed that the decreased abundance of 8-hydroxycoumarin after longer incubation times is the result of increasing binding to biomass decreasing the recovery efficiency for this compound in analytical procedures.

Contrary to many quinoline-degrading microorganisms which produce pink, green and brown metabolites, *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 produces no colored metabolites.

Therefore, the researches conducted by the Applicant demonstrate that the pure culture of the *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 of the invention has two unique, patentably distinguishing features:

- The inability to use quinoline as a carbon source;
- The selective cleavage of C-N bonds in quinoline and related organonitrogen compounds.

The present invention will now be illustrated by a specific example, which should not be construed as limiting the invention.

EXAMPLE

A petroleum biodegradation test according to the principles of the invention demonstrates the ability of *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 to remove nitrogen from shale oil. *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 was grown as described hereinbefore, using quinoline as a sole nitrogen source. Then duplicate washed concentrated cell suspensions were incubated with shale oil samples for 16 hours at 30°C. The control sample consisted of shale oil added to sterile ModA medium which was incubated for 16 hours at 30°C. After incubation the petroleum samples were recovered and analyzed. The results are listed in TABLE 2 below which indicate that pre-grown *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 cells are capable of removing about

5% of the total organic nitrogen and about 68% of quinoline from shale oil during an overnight (16 hour) incubation. Results in Table 2 are reported as a percentage of the neat oil, except for the amount of quinoline which is reported as the area under the peak corresponding to the retention time of quinoline in gas chromatographs.

TABLE 2

Element	Control Oil	Biotreated Oil n° 1	Biotreated Oil n° 2
Carbon, wt %	85.01	85.21	84.87
Hydrogen, wt%	9.69	9.81	9.81
Nitrogen, wt %	1.71	1.63	1.62
Sulfur, wt %	1.41	1.34	1.38
Quinoline (GC peak area)	177,495	58,502	57,415

Data in Table 2 demonstrate therefore that total nitrogen in petroleum may be reduced in 5% as a result of the exposure of the petroleum oil to the pure culture of the invention. Moreover, about 68% of the quinoline present in petroleum may be removed as a consequence of the biotreatment and therefore biorefining processes for the selective removal of nitrogen from petroleum may be achieved in the presence of biocatalysts such as the *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 of the invention.

Derivatives of *Pseudomonas ayucida* ATCC No. have been selected which have improved ability to utilize quinoxaline as a sole nitrogen source. This derivative culture retains its ability to selectively cleave C-N bonds in quinoline and has an increased substrate range for the metabolism of additional organonitrogen compounds such as quinazoline and isoquinoline. Similarly, derivatives of *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 that are resistant to antibiotics, either by the isolation of chromosomal mutations or by the introduction of suitable plasmids, retain the ability to selectively cleave C-N bonds in quinoline and other organonitrogen compounds. Such property renders *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 and its derivatives a specific agent for use in organic chemical synthesis for cleavage of organic C-N bonding which may be used in various organic process synthesis systems. Likewise, the

unique properties of *Pseudomonas ayuckia* ATCC N° PTA-806 and its derivatives that possess the ability to selectively cleave C-N bonds may be utilized in denitrogenating degradation of a wide variety of organic materials.

While in the foregoing specification this invention has been described in relation to certain preferred embodiments thereof, and many details have been set forth for purpose of illustration it will be apparent to those skilled in the art that the invention is susceptible to additional embodiments and that certain of the details described herein can be varied considerably without departing from the basic principles of the invention.

05445615-113099

50
47

ST
48**I CLAIM:**

1. A culture of mutant microorganism *Pseudomonas ayucida* strain ATCC N° PTA-806.
2. A culture of mutant microorganism *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 which has the ability to selectively reduce the nitrogen content of nitrogen-containing organic carbonaceous material by cleavage of organic C-N bonds and production of 8-hydroxycoumarin when grown in a growth medium comprising mineral nutrients and an assimilable source of carbon in the substantial absence of a nitrogen-containing compound except said nitrogen-containing organic carbonaceous material, and in the presence of oxygen at temperatures about 25°C to 35°C.
3. A culture of mutant microorganism *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 which has the ability to selectively reduce the nitrogen content of nitrogen-containing organic carbonaceous material by cleavage of organic C-N bonds by exposing said intact bacterial cells, cell extracts, or purified C-N bond cleaving enzymes to carbonaceous nitrogen-containing organic mater at temperatures of from 15 to 40°C in the presence of oxygen.
4. A culture of derivative microorganisms of *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 which has the ability to selectively reduce the nitrogen content of nitrogen-containing organic carbonaceous material by cleavage of organic C-N bonds and production of 8-hydroxycoumarin when grown in a growth medium comprising mineral nutrients and an assimilable source of carbon in the substantial absence of a nitrogen-containing compound except said nitrogen-containing organic carbonaceous material, and in the presence of oxygen at temperatures about 25°C to 35°C.
5. A culture of derivative microorganisms of *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 which has the ability to selectively reduce the nitrogen content of nitrogen-containing organic carbonaceous material by cleavage of organic C-N bonds by exposing said intact bacterial cells, cell extracts, or purified C-

RECEIVED
 11-10-63

JZ
49

N bond cleaving enzymes to carbonaceous nitrogen-containing organic mater at temperatures of from 15 to 40°C in the presence of oxygen.

660511-51964460

ABSTRACT

A mutant *Pseudomonas ayucida* strain ATCC N° PTA-806 which is able to selectively cleave organic C-N bonds and reduce the nitrogen content of organic carbonaceous materials is described.

09449615-113099

DECLARATION AND POWER OF ATTORNEY

As a below named inventor, I hereby declare that my residence, post office address and citizenship are as stated below next to my name; that I verily believe I am the original, first and sole inventor (if only one name is listed below) or a joint inventor (if plural names are listed below) of the subject matter claimed and for which a patent is sought in the application entitled:

MICROORGANISMS USEFUL FOR CLEAVAGE OF ORGANIC C-N BONDS

which application is:

(X) the attached application

() application Serial No.

(for original application)

filed _____, and amended on

(for declaration not accompanying application)

that I have reviewed and understand the contents of the specification of the above-identified application, including the claims, as amended by any amendment referred to above; that I acknowledge my duty to disclose information of which I am aware which is material to the patentability of this application under 37 C.F.R. 1.56, that I hereby claim foreign priority benefits under Title 35, United States Code §119, §172 or §365 of any foreign application(s) for patent or inventor's certificate listed below and have also identified on said list any foreign application for patent or inventor's certificate on this invention having a filing date before that of the application on which priority is claimed:

☐ Application Number	Country	Filing Date	Priority Claimed (yes or no)
---	---------	-------------	---------------------------------

I hereby claim the benefit of Title 35 United States Code §120 of any United States application(s) listed below and, insofar as the subject matter of each of the claims of this application is not disclosed in a listed prior United States application in the manner provided by the first paragraph of Title 35, United States Code, §112, I acknowledge my duty to disclose any information material to the patentability of this application under 37 C.F.R. 1.56 which occurred between the filing date of the prior application and the national or PCT international filing date of this application:

☐ Application Serial No.	Filing Date	Status (patented, pending, abandoned)
---	-------------	--

I hereby appoint John H. Mion, Reg. No. 18,879; Donald E. Zinn, Reg. No. 19,046; Thomas J. Macpeak, Reg. No. 19,292; Robert J. Seas, Jr., Reg. No. 21,092; Darryl Mexic, Reg. No. 23,063; Robert V. Sloan, Reg. No. 22,775; Peter D. Olery, Reg. No. 24,513; J. Frank Oaha, Reg. No. 24,625; Waddell A. Biggart, Reg. No. 24,861; Robert G. McMorro, Reg. No. 19,093; Louis Gubinsky, Reg. No. 24,835; Neil B. Siegel, Reg. No. 25,200; David I. Cushing, Reg. No. 28,703; John R. Inge, Reg. No. 26,916; Joseph J. Roch, Jr., Reg. No. 26,577; Sheldon I. Landman, Reg. No. 25,430; Richard C. Turner, Reg. No. 29,710; Howard L. Bernstein, Reg. No. 25,665; Alan J. Kasper, Reg. No. 25,426; Kenneth J. Burchfiel, Reg. No. 31,333; Gordon Kit, Reg. No. 30,764; Stann J. Mack, Reg. No. 30,951; Frank L. Bernstein, Reg. No. 31,484; Mark Boland, Reg. No. 32,197; William H. Mandir, Reg. No. 32,156; Scott M. Daniels, Reg. No. 32,562; and Brian W. Harmon, Reg. No. 32,778 and Abraham J. Roher, Reg. No. 33,276, my attorneys to prosecute this application and to transact all business in the Patent and Trademark Office connected therewith, and request that all correspondence about the application be addressed to SUGHRUE, MION, ZINN, MACPEAK & SEAS, 2100 Pennsylvania Avenue, N.W., Washington, D.C. 20037.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

First Inventor

First Name	Middle Initial	Last Name
JOHN	J.	KILBANE II

Date September 28, 1999Residence 14706, Dagwood Lane, Woodstock, IL 60096 USACitizenship: AmericanPost Office Address : Institute of Gas Technology (IGT), 1700 South Mount Prospect Road,
Des Plaines, IL 60018, USA

52

Second Inventor

First Name	Middle Initial	Last Name
CLAUDIA MARIA	SOARES	RIBEIRO

Claudia Soares Ribeiro

Date September 28, 1999

Residence: Rua Inhangá, 42 ap. 501, Copacabana,
Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Citizenship Brazilian

Post Office Address: PETROBRAS R & D CENTER, CIDADE UNIVERSITÁRIA, Q7,
ILHA DO FUNDÃO, RIO DE JANEIRO, RJ, BRAZIL

Third Inventor

First Name	Middle Initial	Last Name
MÔNICA	MOREIRA	LOHARES

Mônica Almeida Lohares

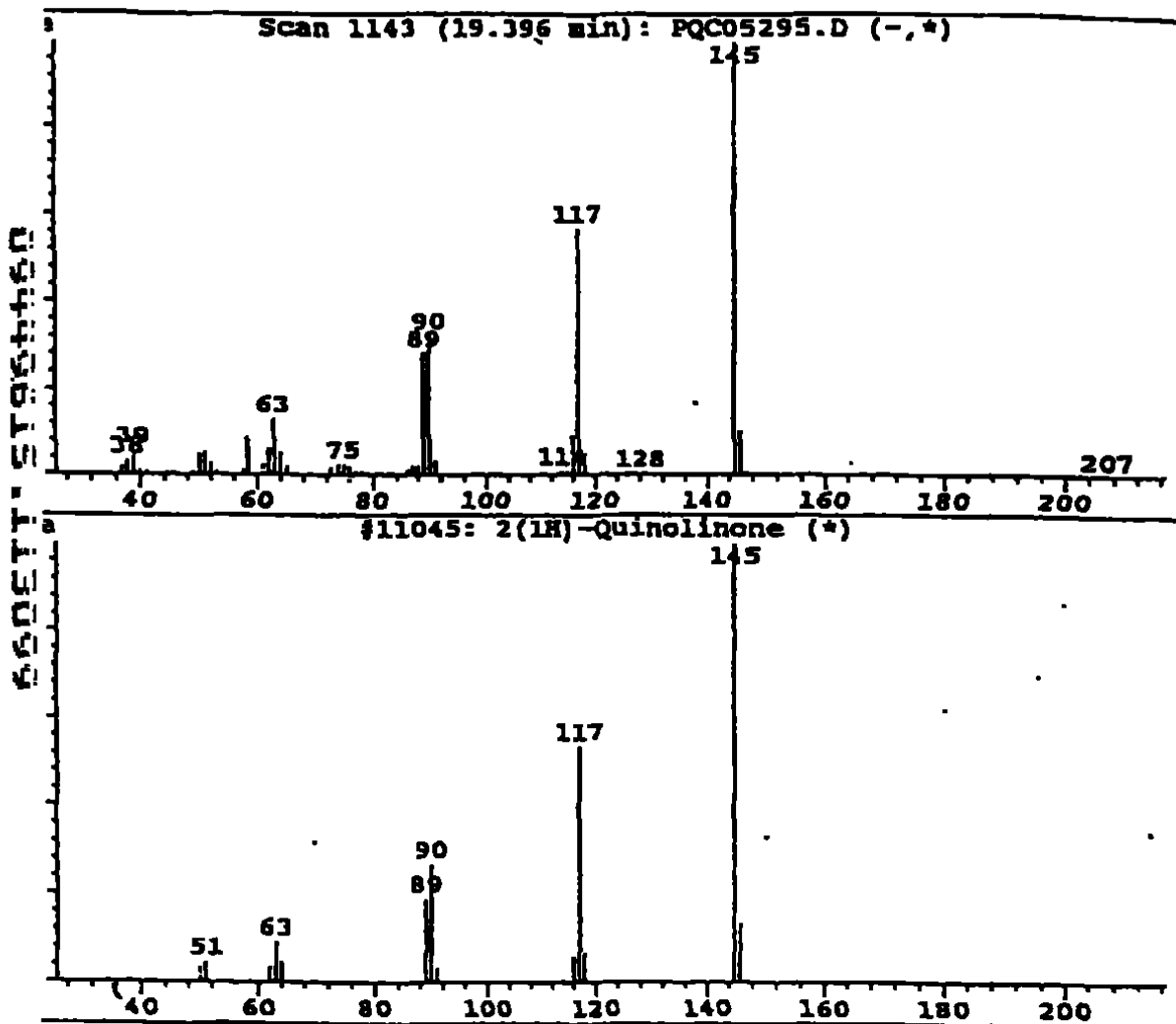
Date September 28, 1999

Residence: Rua Marquês de Olinda, 64 ap. 907-B, Botafogo,
Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Citizenship Brazilian

Post Office Address: PETROBRAS R & D CENTER, CIDADE UNIVERSITÁRIA, Q7,
ILHA DO FUNDÃO, RIO DE JANEIRO, RJ, BRAZIL

SECRET

FIG. 1



54

FIG. 2

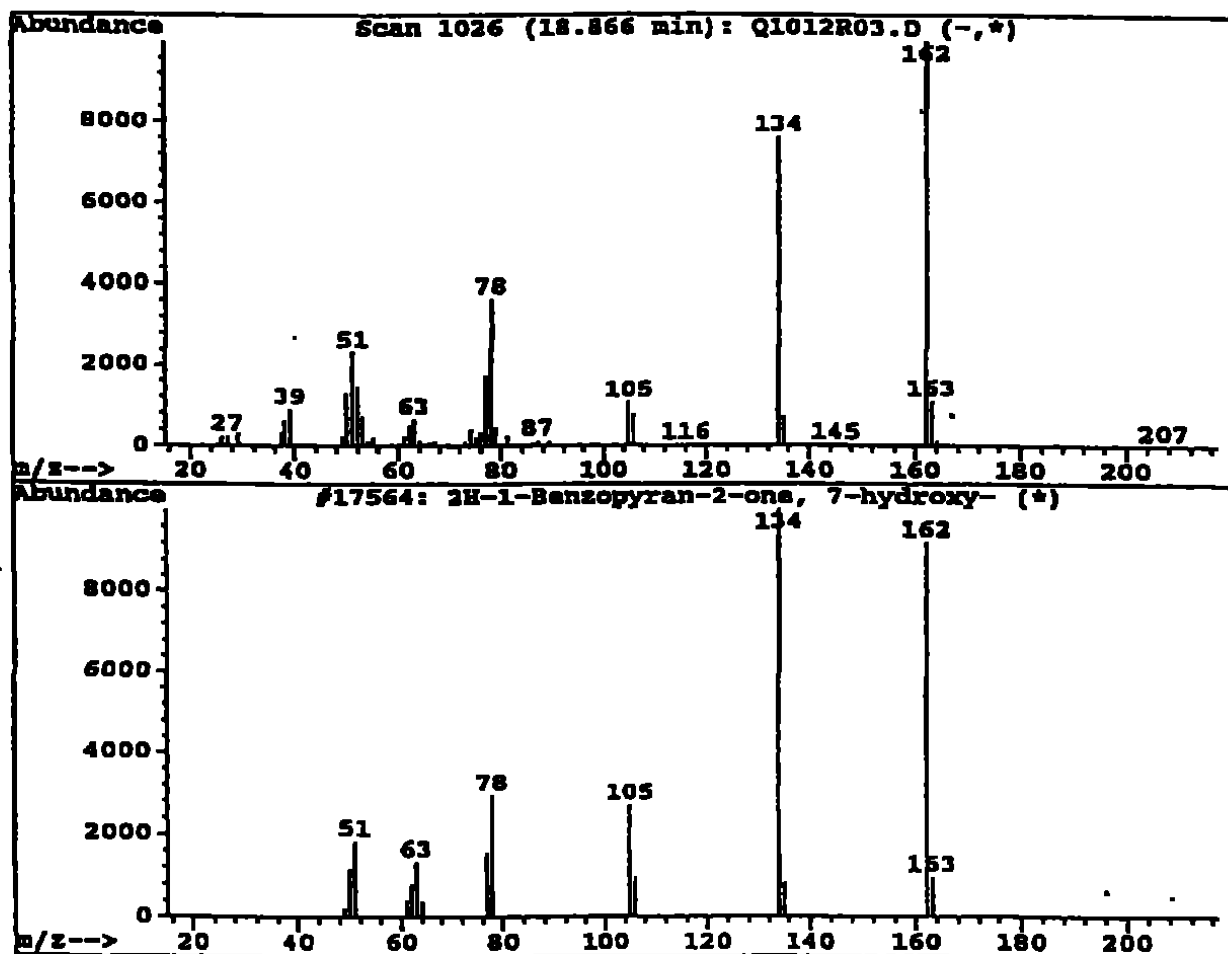
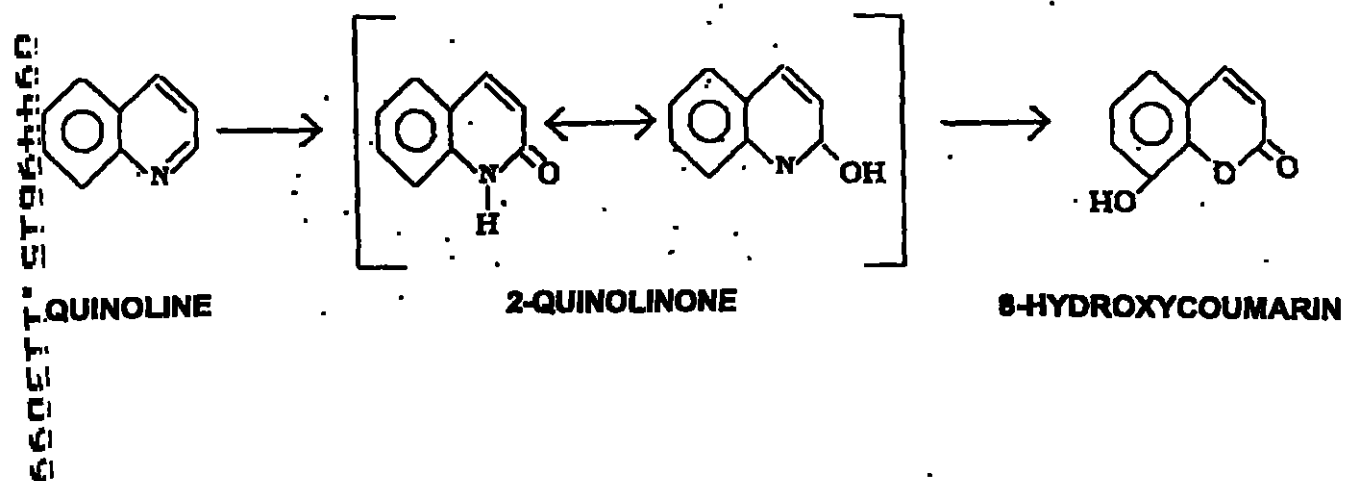


FIG. 3



B

57
56

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

A TODOS LOS QUE CONCIERNA ESTE DOCUMENTO

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

Oficina de Patentes y Marcas Registradas de los Estados Unidos de América

11 de February, 2000

POR EL PRESENTE SE CERTIFICA QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES COPIA FIEL Y VERÍDICA DE LOS ARCHIVOS DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS REGISTRADAS DE LOS ESTADOS UNIDOS CORRESPONDIENTE A LOS DOCUMENTOS DE LA SOLICITUD DE PATENTE IDENTIFICADA A CONTINUACIÓN QUE SATISFACEN LOS REQUISITOS PARA QUE SE OTORQUE UNA FECHA DE REGISTRO SEGÚN LO ESTIPULADO EN 35 USC 111.

NÚMERO DE SOLICITUD: 09/449/615 ✓
FECHA DE REGISTRO: 30 de Noviembre, 1999 ✓

(Sello
Oficial)

**Por autoridad del
COMISIONARIO DE PATENTES Y MARCAS REGISTRADAS**

**P. SWAIN
Oficial Certificador**

MICROORGANISMOS ÚTILES PARA LA SEGMENTACIÓN DE ENLACES ORGÁNICOS DE C-N

CAMPO DE INVENCION

Esta invención está relacionada con un cultivo mutante de *Pseudomonas ayucida* capaz de retirar selectivamente el nitrógeno orgánicamente enlazado de materiales carbonáceos mientras que se retiene el valor calorífico de dichos materiales carbonáceos. Los microorganismos de esta invención son particularmente útiles para retirar nitrógeno orgánico de combustibles fósiles tales como el carbón y petróleos conteniendo nitrógeno.

INFORMACIÓN SOBRE ANTECEDENTES

La calidad del petróleo deteriora progresivamente según se ponen en producción preferencial los depósitos de la mejor calidad de petróleo. Como consecuencia es cada vez más preocupante la concentración de compuestos/contaminantes tales como sulfuro, nitrógeno y metales en el petróleo. Estos contaminantes no sólo contribuyen a la polución ambiental como resultado de la combustión de petróleo, sino que también interfieren con el procesamiento del petróleo, envenenando catalizadores y contribuyendo a la corrosión. El retiro selectivo de contaminantes del petróleo mientras que se retienen los valores de combustibilidad supone un difícil desafío técnico.

El retiro selectivo de sulfuro del dibenzotiofeno con la ayuda de una bacteria útil para la segmentación de enlaces C-S es instruido en la patente US 5,002.888.

La patente US 5,297,625 enseña un método de preparación, aislamiento y uso de un microorganismo que pueda metabolizar petróleos crudos y otros hidrocarburos de elevado peso molecular, como fuente de energía, y la emulsificación de crudos pesados bajo las condiciones extremas existentes en depósitos de petróleo.

La biorefinería del petróleo es por ello una tecnología que pronto será comercializada y puede resultar muy prometedora.

El retiro de nitrógeno y de metales del petróleo es otro de los usos potenciales de biocatalizadores, aunque hasta la fecha este área de investigación ha recibido muy poca atención.

La quinolina es quizás el compuesto de organonitrógeno más estudiado en lo que respecta a biodegradación, y es considerada como representante de muchos compuestos de organonitrógeno comúnmente hallados en el petróleo. Se ha observado que muchos cultivos aeróbicos y anaeróbicos microbianos pueden degradar la quinolina. La mayoría, si no todos, los cultivos microbianos descritos que metabolizan la quinolina lo hacen degradándola totalmente, y por lo tanto pueden utilizar quinolina como fuente exclusiva de carbono, energía y nitrógeno.

Shukla, Onkar P., en "La Transformación Microbiana de Quinolina por un *Pseudomonas sp.*", *Microbiología Aplicada y Ambiental*. Tomo 51, Junio 1986, págs. 1332-1342, señala que un *Pseudomonas sp* aislado de efluentes por un cultivo de enriquecimiento en quinolina, metabolizó este sustrato por una nueva vía de 8-hidroxycoumarin. Este microorganismo usa quinolina como fuente exclusiva de carbono, nitrógeno y energía.

Schwarz, G. et al, in "Metabolismo Microbiano de Quinolina y Compuestos Relacionados". "I. Aislamiento y Caracterización de Bacteria Degradante de Quinolina", en "System Appl. Microbiol. 10, 185-190 (1988)", reporta que se aislaron 16 estirpes de bacterias de suelo, aguas y lodos activados que pueden utilizar la quinolina como fuente única de carbono y nitrógeno. De estas 16 cepas de bacterias investigados, 13 podrían ser asignadas al género *Pseudomonas*. Estas bacterias son Gram-negativas, con aspecto de vástagos, de movimiento espontáneo, derechos a ligeramente curvados, que en Agar HNB forman colonias suaves o parcialmente rugosas, circulares y de color amarillento a crema. Las especies identificadas son las de *Pseudomonas putida* Biovar A y B, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas testosteroni*. Se reporta que el crecimiento en 2-hidroxiquinolina es común en todas las cepas investigadas. Se ha estudiado la degradación de quinolina en diversas especies de *Pseudomonas* y se observó que 2-hidroxiquinolina fué el primer intermediario en la vía de degradación.

Grant, D.J.W. et al, en "Degradación de la quinolina por una bacteria del suelo", *Microbios* 1976, 15, págs. 177-189, reporta que se aisló una bacteria del suelo de un jardín, la cual creció aeróbicamente en un medio de sales minerales con la quinolina como fuente exclusiva de Carbono y NH_4^+ como fuente de Nitrógeno.

Durante el crecimiento con quinolina, se acumuló 2-hidroxiquinolina en el fluido de cultivo y más tarde desapareció. 2,6-Dihidroxiquinolina es probablemente el próximo

intermedio ya que las células completas lo oxidan totalmente y con rapidez. La segmentación de anillos aromáticos bajo condiciones aeróbicas sigue casi invariablemente la formación de un compuesto con dos estirpes de hidroxilos anexos a un anillo en las posiciones o- ó p- entre sí.

O'Loughlin, E.J. et al. En "Aislamiento, Caracterización y Uso de Substratos de una Bacteria de Quinolina en Degradación", " Biodeterioro y Biodegradación Internacional (1996), págs. 107-118, reporta un organismo con aspecto de vástago Gram (+), identificado como un *Rhodococcus* sp, capaz de crecer usando la quinolina como la fuente dominante de carbono, energía y nitrógeno. Este elemento aislado, designado *Rhodococcus* sp. Q1 también es capaz de crecer en 2-hidroxiquinolina, piridina, 2-3 dimetil piridina, catechol, benzoato y ácido protocatechuico, sugiriendo una capacidad diversa para degradación de anillo aromático. Aunque el nitrógeno de anillo fué aplicado al medio de crecimiento en forma de amoníaco, la degradación de quinolina no se vió limitada por la disponibilidad del producto inorgánico de degradación N.A. identificado y la 2-hidroxiquinolina fué identificada a base de varios análisis espectroscópicos.

De forma que, aunque las publicaciones citadas mencionan cultivos microbianos que pueden metabolizar la quinolina degradándola totalmente, el uso de tales cultivos en una aplicación de biorefinería de petróleo requeriría que el nitrógeno sea selectivamente retirado de la quinolina, dejando intacto el valor carbónico y calorífico de la molécula.

Según señalado en dichas publicaciones, las vías metabólicas utilizadas por diversos microorganismos aeróbicos degradantes de quinolina parecieron iniciar la degradación de quinolina, oxidando selectivamente y retirando nitrógeno de la quinolina. Como no se provveyó ninguna otra fuente de carbono, el metabolismo de tales especies continuaría segmentando enlaces de C-C.

Aunque la biodegradación de la quinolina ha sido razonablemente bien estudiada, hay muy poca información relativa al uso de microorganismos degradantes de quinolina para retirar nitrógeno del petróleo. Por otra parte, se observó que varios *Pseudomonas* degradantes de quinolina no tenían la capacidad de retirar niveles significativos de nitrógeno del petróleo crudo o de fracciones de asfalteno (Aislabie et al. 1990, "Degradación Microbiana de la Quinolina y la Methilquinolina", Apl. Environ. Microbiol. 56: págs. 345-351).

Por lo tanto, hay necesidad de aislar cultivos aeróbicos capaces de utilizar quinolina como una fuente de nitrógeno, pero incapaces de utilizar la quinolina como una fuente de carbono, examinando a continuación la vía metabólica de la degradación de la quinolina, así como la habilidad de tales cultivos de retirar selectivamente nitrógeno del petróleo, lográndose estos objetivos mediante la presente invención.

RESUMEN DE LA INVENCION

Un objeto de la presente invención es proveer un microorganismo y un proceso para el retiro de nitrógeno orgánicamente ligado, de materias carbonáceas orgánicas contenedoras de nitrógeno.

Otro objeto de la presente invención es proveer un proceso microbiano para el retiro selectivo de nitrógeno de combustibles orgánicos fósiles contenedores de nitrógeno y combustibles de derivados de fósiles.

Aún otro objeto de la presente invención es proveer un microorganismo y proceso capaces de segmentación específica o formación de enlaces C-N en reacciones de materias orgánicas carbonáceas, tales como en síntesis orgánica.

Aún otro objeto de la presente invención es proveer un microorganismo que sea estable y retenga sus características específicas de nitrógeno bajo condiciones de proceso que se valgan del microorganismos para la segmentación del enlace de C-N.

Y aún otro objeto de la presente invención es proveer un microorganismo y proceso para retiro específico de nitrógeno de la quinolina que resulte en productos substancialmente exclusivos de 2-quinolina y 8-hidroxycoumarina.

Estos y otros objetos y ventajas, que resultarán aparentes al leer esta descripción, han sido logrados logrados con el puro cultivo de un microorganismo que ha sido aislado y sujeto a procesos en la forma especificada a continuación en más detalle en esta invención e identificado como *Pseudomonas ayucida* El cultivo ha sido depositado con la Colección de Cultivos de Tipo Americano, 10801 University Blvd, Manassas, VA 20110-2209, USA, y ha sido asignado el ATCC N°PTA-806 PTA-806.

Pseudomonas ayucida ATCC N° PTA-806 PTA-806 puede ser preparado inyectando muestras del medio ambiente obtenidas de emplazamientos que tengan presentes materias de enlace C-N que se desee segmentar, un medio de crecimiento que comprenda nutrientes

minerales, una fuente asimilable de carbono, y encontrándose en substancial ausencia de un compuesto conteniendo nitrógeno, excepto compuestos que sólo tengan nitrógeno presente en enlace C-N del tipo que se desee segmentar; creciendo el cultivo bacterial en presencia de oxígeno a temperaturas de unos 30°C durante tiempo suficiente para producir selectivamente *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 que tiene la propiedad de segmentación selectiva de enlaces de C-N en materiales carbonáceos orgánicos.

El contenido de nitrógeno de materia carbonácea orgánica contenedora de nitrógeno puede ser reducido poniendo en contacto dicha materia carbonácea orgánica conteniendo nitrógeno con el microorganismo *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806. El proceso es especialmente apto para uso cuando el material conteniendo nitrógeno es carbón, petróleo de esquisto bituminoso o petróleo de hidrocarburos. El continuo crecimiento de la cepa de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 en la presencia de petróleo de esquisto bituminoso conteniendo nitrógeno resulta en el retiro de más del 5% del total de nitrógeno y preferiblemente más del 68% del total de quinolina.

El proceso para reducir el contenido de nitrógeno del material carbonáceo orgánico conteniendo nitrógeno ocurre por segmentación de los enlaces C-N orgánicos del microorganismo *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806. El cultivo puro de nitrógeno orgánico selectivo de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 tiene la capacidad de reducir selectivamente el contenido de nitrógeno del material carbonáceo orgánico mediante segmentación de los enlaces orgánicos de C-N produciendo 2-hidroxiquinolina y 8-hidroxicoumarina cuando se cultiva en un medio de crecimiento que incluye nutrientes minerales y una fuente asimilable de carbono en substancial ausencia de un compuesto que contenga nitrógeno, excepto el material carbonáceo orgánico conteniendo nitrógeno, y en la presencia de oxígeno a temperaturas de unos 35°C a 30°C. Los derivados de la cepa de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 retienen la habilidad de reducir selectivamente el contenido de nitrógeno de materiales orgánicos carbonáceos por segmentación de enlaces C-N de la misma forma.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS ESQUEMAS

FIG 1 es un gráfico que ilustra una comparación de datos MS de un metabolito de quinolina producido por *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 con 2-quinolinona.

FIG 2 es un gráfico que ilustra una comparación de datos MS de un metabolito de quinolina producido por *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 con 7-hidroxi-2H-1-benzopiran-2-uno(7-hidroxicoumarina).

FIG 3 es una representación esquemática de la vía parcial para la degradación de quinolina por *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES PREFERIDAS DE LA INVENCION

Cultivos ambientales con un conocido historial de exposición a compuestos organonitrogenados, así como cultivos de enriquecimiento utilizando fuentes de carbono, acetato, benceno, ácido benzoico, etanol, glucosa, glicerol, caldo nutriente, succinato y tolueno, y compuestos de nitrógeno orgánicos tales como quinolina, carbazol y piridina produciendo cultivos bacteriales capaces de metabolizar cada uno de los compuestos de nitrógeno utilizados.

Según el material técnico provisto, los microorganismos más conocidos para utilización del nitrógeno de compuestos organonitrogenados son los *Pseudomonas* aislados de cultivos de enriquecimiento empleando quinolina como fuente exclusiva de nitrógeno. Mientras que las especies de *Pseudomonas* son capaces de utilizar nitrógeno orgánicamente enlazado, no muestran especificidad para la oxidación de enlaces de carbono-nitrógeno. Esto muestra la falta de desarrollo de cultivo de enriquecimiento de un microorganismo de ocurrencia natural que muestre especificidad para oxidación de enlaces orgánicos de C-N. De aquí que se deba utilizar un proceso no natural de mutación selectiva para desarrollar un microorganismo que posea dicho metabolismo selectivo de nitrógeno.

Los microorganismos con capacidad metabólica no específica al nitrógeno con respecto a substratos orgánicos pueden ser desarrollados por selección a través de experimentos con enriquecimiento por inoculación quimiostática y de matraz vibrador en los que los nutrientes y el nitrógeno orgánicamente enlazado que normalmente no se encuentran en el tejido vivo, puedan ser suministrados en substancial ausencia de otra fuente de nitrógeno disponible tal como nitrógeno inorgánico en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

El medio de crecimiento deberá proveer nutrientes orgánicos e inorgánicos para un buen crecimiento del microorganismo, pero estará desprovisto de compuestos inorgánicos y orgánicos que contengan nitrógeno que se desee metabolizar por el microorganismo. Un medio adecuado para el crecimiento de microorganismos bajo condiciones de

organonitrógeno puede que sea una composición apropiada de nutrientes minerales, tales como 0,37g KH_2PO_4 , 0,25g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,07g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,02g de FeCl_3 y 20,0g de glucosa/glicero/sucinato por litro de agua destilada ionizada. Dicho medio es conocido como ModA. Cualquier fuente asimilable de carbono desprovista de nitrógeno puede ser utilizada en cantidades de apoyo del crecimiento microbiano deseado. Entre las fuentes

adecuadas de carbono asimilable se encuentran la glucosa, el glicerol, acetato de sodio, benzoato de sodio, succinato de sodio y sucrosa, en concentraciones de 1 a 20mM..

El compuesto organonitrogenado preferido con enlaces orgánicos C-N es la quinolina. A continuación se enumeran otros compuestos adecuados con enlaces de C-N.

Las muestras ambientales de tierra de suelo y de agua pueden obtenerse de emplazamientos de elaboración de carbones, de turba y otros en los que existan hidrocarburos de petróleo.

Las muestras tomadas del medio ambiental son utilizadas para experimentos de cultivo de enriquecimiento por inoculación de quimiostato y matraz vibratorio para obtener cultivos capaces de utilizar quinolina como fuente exclusiva de nitrógeno. En la presente invención, todos los experimentos utilizaron los medios minerales definidos a continuación:

0,37g KH_2PO_4

0,25g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,07g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,02g g FeCl_3

y 20,0g de glucosa/glicero/sucinato por litro de agua destilada ionizada.

Estos medios van ajustados a un pH de 6,5 a 7,0 y el nitrógeno es suministrado en la forma de quinolina que se encuentra presente en concentraciones de 1 a 20mM, o para experimentos de control se utiliza $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ a una concentración de 1,3g por litro.

Los quimiostatos y matraces vibratorios son operados a temperatura ambiente (25°C) ó 30°C. El volumen de trabajo de los quimiostatos es de 1 litro y los experimentos con matraz vibrador normalmente usan 50 ó 100ml de medio líquido. Se ajustan los grados de flujo de los quimiostatos para obtener tiempos de retención hidráulica de dos días de duración hasta un mes, y se alteran los caudales y también el compuesto organonitrogenado de ensayo en la forma requerida para asegurarse de que los quimiostatos crean un ambiente adecuado

para la selección de cultivos con capacidad mejorada de segmentar selectivamente los enlaces C-N. La densidad de célula bacterial en los quimiostatos/matrices vibratorios varía de 10^2 a 10^8 células/ml, con densidades promedio de células de 10^4 a 10^5 células/ml mantenidas. Las bacterias aisladas del efluente de quimiostatos y/o de matrices vibratorios son sujetas a mutagenesis química y/o física utilizando nitrosoguanidina (NTG) y corta irradiación ultravioleta respectivamente. Las poblaciones de células son mutagenizadas bajo condiciones

que resultan en la muerte de aproximadamente un 99% de la población. Las células mutagenizadas son entonces usadas para reinocular quimiostatos, iniciar experimentos adicionales con matrices vibratorios, y para platos de agar que contienen compuestos de organonitrógeno de prueba. Se debe llevar cuidado de que la cantidad de biomasa añadida de nuevo a los quimiostatos en forma inoculada sea suficiente para proveer una cantidad considerable de nitrógeno en forma de células de biomasa muertas de los efluentes de los quimiostatos, matrices vibratorios y platos de agar y sean comprobados con regularidad usando el Ensayo de Prueba de Biodisponibilidad de Nitrógeno descrito a continuación.

La determinación de las secuencias de gene 16S-rRNA para la determinación de las especies de aislados bacteriales fué llevada a cabo por MIDI Labs (Newark, DE).

Ensayo de Biodisponibilidad de Nitrógeno

La capacidad de las bacterias de utilizar compuestos de nitrógeno orgánicos para crecimiento puede ser medida mediante el Ensayo de Biodisponibilidad de Nitrógeno (NBA). Este ensayo se basa en el hecho de que todo proceso de vida requiere nitrógeno para el crecimiento y por lo tanto se puede crear una situación en la que la cuantificación del crecimiento bacteriano provea una medida del grado de utilización de cualquier compuesto orgánico o inorgánico como fuente de nitrógeno.

De aquí que, el Ensayo de Biodisponibilidad de Nitrógeno utilice un medio de sales minerales definidas en las pruebas de crecimiento en las que los compuestos modelos de organonitrógeno tales como quinolina, piridina, carbazol y porfirina sirven como fuentes de carbono y/o de nitrógeno. Las pruebas de crecimiento se hacen usando seis condiciones:

1. Compuesto de prueba como fuente exclusiva de carbono y nitrógeno.
2. Compuesto de prueba como fuente exclusiva de carbono (se encuentra disponible amoníaco como fuente alternativa de nitrógeno).

3. Compuesto de prueba como fuente exclusiva de nitrógeno (como fuente alternativa disponible de carbono: glucosa/glicerol/sucinato).
4. Compuesto de prueba presente, además de fuentes alternativas de carbono y de nitrógeno.
5. Con sólo fuentes alternativas de nitrógeno (amoníaco) y de carbono (glucosa/glicerol/sucinato). No se encuentra presente el compuesto de prueba.
6. Sin compuestos de nitrógeno de clase alguna presentes, pero con fuentes alternativas de carbono (glucosa/glicerol/sucinato).

Estas seis condiciones para crecimiento constituyen un bioensayo para comprobar la habilidad de un cultivo particular de metabolizar compuestos organonitrogenados. Cuando se requieren fuentes de carbono y de nitrógeno en adición a los compuestos de prueba, son provistas en forma de una mezcla de glucosa/glicerol/sucinato (20g/L) y de amoníaco (20mM) respectivamente.

La prueba NBA puede ser realizada con cualquier compuesto de organonitrógeno de prueba que sea ordinariamente usado a una concentración de desde 3mM a 20mM.

Para determinar la gama de compuestos de organonitrógeno que podrían servir como fuentes exclusivas de nitrógeno para crecimiento de los diversos cultivos puros de la invención, se han probado varios compuestos de organonitrógeno y de control, siguiendo el proceso de Ensayo de Biodisponibilidad de Nitrógeno. Todos los compuestos son muy puros y de grado analítico.

Entre estos compuestos figuran:

2-Metil-beta-Naftotiazol

2-Metil-Benzotiazol

2(Metilmercapto)Benzimidazol

1,1-Metileno Bis(3-Metil Pipridina)

Tiazol

1-Butilpirrolidina

2-Metileno-1,3,3-Trimetil Indolina

2-Metil-3-Propilpirazina

2-Fenilbenzotiazol

2-Metil Quinoxalina

2-Metil Indolina

Carbazol

Quinolina

Quinazolina

Quinoxolina

2,4-Quinolindiol

Isoquinolina

3-Metil Isoquinolina

Isocarbostiril

Protoporfirin

Piridina

Fenil Benzotiazol

Ácido Nicotínico

Imidazol

Indole

Solución Tampón HEPES

Urea

Guanina

Lisina

Tritofan

Cloruro de Amonio.

Los diversos cultivos son inoculados en tubos de ensayo o matraces que contienen componentes de medios apropiados para las seis condiciones antedichas de prueba.

Los cultivos son incubados a continuación aeróbicamente durante 2 a 4 días a temperatura ambiental de 30°C.

Se monitorea el crecimiento de los cultivos midiendo densidad óptica/de turbulencia de los cultivos en las diferentes condiciones de ensayo, o determinando las unidades que forman colonias.

La condición de ensayo N°6(muestra libre de nitrógeno) es de control negativo.

~~20~~
67

Las condiciones N° 4 y 5 son controles positivos porque las muestras son alteradas con fuente de carbono y de nitrógeno y por lo tanto debieran producir un sano cultivo microbiano al menos que el compuesto resulte tóxico para el cultivo sujeto a ensayo. En este caso, sólo la condición N° 5 resultaría en crecimiento sano.

El grado crecimiento bacteriano observado en las condiciones de ensayo 1, 2 y 3, comparado con el grado de crecimiento observado en las condiciones de ensayo 4, 5 y 6 indica la habilidad de los cultivos de usar el compuesto de prueba de organonitrógeno como fuente de carbono y/o de nitrógeno.

Los cultivos que muestran mejor crecimiento en las condiciones de ensayo N° que en las de los ensayos 1 y 2 puede que utilicen preferencialmente el compuesto de organonitrógeno como fuente de nitrógeno solamente.

Identificación de Metabolitos

Para identificar metabolitos se realiza Cromatografía de Capa Fina (TLC) en platos de Silica C-18 mediante el método descrito por G. K. Watson.

R.B. Cain en "Metabolismo Microbiano en Anillo de Piridina", Biochem. J. 146-172. Los disolventes de fase corriente serán por ejemplo, el hexano, ácido acético y xileno en la proporción de 5:1:2. Supernadantes de cultivos bacterianos en crecimiento con quinolina como fuente exclusiva de nitrógeno son extraídos con acetato de etilo y pasados por platos de TLC.

Alternativamente, se pueden usar células en reposo, utilizando gránulos de células de cultivos de la fase de prueba registrada con quinolina o con amoníaco como fuentes de nitrógeno. Se incuban las suspensiones de células concentradas con 20mM de quinolina durante periodos desde 15 minutos hasta 16 horas.

La extracción de los supernadantes de células en reposo y de células en crecimiento puede ser llevada a cabo con disolvente de acetato de etilo o con cartuchos de fase sólida C18 y los extractos se analizan por TLC.

Derivación de los metabolitos

Se puede efectuar la derivación de los metabolitos añadiendo semicarbazida HCl y 2,4 dinitrofenil hidrazina (2,4-DNPH) a algunos experimentos, seguido de la subsiguiente extracción y análisis de TLC. Una mezcla típica que usa derivación de metabolitos consistirá de 200 mls de medio A (con fuente de carbono) que contiene 2g de peso seco de células, 2mM semicarbazida-HCl, y 3 mM a 20 mM de quinolina como fuente de nitrógeno. La mezcla es incubada durante 2 horas y las células son

centrifugadas. Se añade 2,4 DNPH al supernadantes, se deja la mezcla reposar durante la noche y se extrae con acetato de etilo, separándola en un plato de TLC e identificando los puntos.

Cromatografía de gas/espectrometría de masa

Se realiza el análisis GC/MS en extractos derivados de cultivos de células en reposo y en crecimiento expuestas a la quinolina, y en compuestos eluidos de puntos observados en los platos TLC.

La extracción de los supernadantes de las células en reposo y también los de las células en crecimiento puede ser llevada a cabo con disolvente de acetato de etilo o con cartuchos de extracción de fase sólida C-18. Se analizan los puntos TLC de posibles metabolitos por GC/MS.

Los espectrográficos de masa son entonces comparados con las diversas librerías de datos de espectrografía de masa preparadas de los resultados con compuestos estándar conocidos.

Evaluación de la habilidad del *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 en la segmentación de enlaces orgánicos de C-N

Para evaluar la habilidad de segmentación de enlaces orgánicos de C-N del *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806, se hace crecer este organismo en un medio ModA que usa la quinolina como única fuente de nitrógeno. Se produce una camada de cultivo OD₆₀₀=1.67, que es recogida y se vuelve a suspender en un medio ModA de 100mls. Se divide el cultivo en dos porciones de 50 ml y 3 ml de petróleo de esquisto (1,7 de porcentaje de peso de nitrógeno) es añadido a cada una. A continuación los cultivos son incubados sometidos a agitación a temperatura ambiente durante la noche (16 horas), y se separa y analiza el petróleo. La cantidad de quinolina presente en las muestras tomadas es determinada por GC, correspondiendo al área bajo el punto cumbre a un tiempo de retención de quinolina.

Preparación de un cultivo puro de cepa de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806

La preparación de un cultivo puro de un microorganismo capaz de segmentación orgánica del enlace C-N mientras se mantiene el valor calorífico de la molécula orgánica de acuerdo con la presente invención incluye la recogida de muestras del ambiente obtenidas de emplazamientos contaminados con petróleo, la inoculación de

quimiostatos y experimentos con matraces vibratorios en los que se proveen 3mM a 20mM de quinolina como fuente exclusiva de nitrógeno. Pasado el periodo inicial de toxicidad de la quinolina, se mezclan la cosechas de crecimiento bacteriano y se prueban los cultivos puros por sistema de Ensayo de Biodisponibilidad de Nitrógeno para detectar los cultivos capaces de utilizar quinolina como fuente de nitrógeno, pero no como fuente de carbono.

Se observa que los cultivos inicialmente obtenidos de los quimiostatos que utilizan quinolina la degradan totalmente, usándola como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno. Entonces se incrementan los caudales de quimiostatos para disminuir los tiempos de retención hidráulica desde 96 horas a 4 horas. Las células del efluente de quimiostato son mutagenizadas y restituidas al quimiostato. Eventualmente se obtiene un cultivo puro con resultados de Ensayo de Biodisponibilidad de Nitrógeno que indican que la quinolina fué utilizada como fuente de nitrógeno pero no como fuente de carbono. Una secuencia parcial del gene 16S-rRNA de estas bacteria Gram negativa con aspecto de vástago fué identificada como *Pseudomonas ayucida*, la cual fué depositada en el ATCC bajo el N° PTA-806. *P monteliii*, que muestra 99% de homología, y *Pseudomonas nitroreducens* y *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, mostrando ambas 98,3% de homología, se encuentran estrechamente relacionadas, pero no son idénticas a la *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806.

Naturalmente se desconoce si las cepas ocurrentes de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 son capaces de segmentación selectiva de enlaces de C-N en quinolina utilizando la quinolina como fuente de nitrógeno pero no de carbono. Por lo tanto, el cultivo aquí aislado y sujeto de esta patente es único y es un mutante de *Pseudomonas ayucida* que fué intencionalmente producido en el laboratorio por experimentos de cultivo enriquecido/evolución dirigida llevados a cabo por el Solicitante.

Pseudomonas ayucida ATCC N° PTA-806 tiene un tiempo de doblaje de célula de 4,25 horas cuando se hace crecer en un medio de sales definidas a 30°C con quinolina como fuente exclusiva de nitrógeno.

También se llevaron a cabo pruebas de gama de sustratos y especificidad para el microorganismo de la invención, utilizando inoculaciones derivadas de todos

73
70

esos compuestos organonitrogenados mencionados que fueron crecidos en un previo Ensayo de Biodisponibilidad de Nitrógeno..

Se encuentra *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 creciendo en urea, triptofan, lisina, guanina, ácido nicotínico, quinolina, 3,4-dihidro-(1H)-quinolinona,

2,4-quinolinediol, 8-hidroxiquinolina, y quinoxalina como fuentes exclusivas de nitrógeno, pero ninguna de éstas sirven de fuentes de carbono.

Debe observarse que el crecimiento con urea, triptofan, lisina, guanina y ácido nicotínico como fuentes de nitrógeno es una habilidad común poseída por un gran número de bacterias aeróbicas y muy probablemente no tenga relación con las vías metabólicas pertinentes a la utilización de quinolina.

El cultivo creció en la presencia de todos los compuestos de ensayo, excepto 1-butilpirrolidina y 2-metileno-1,3,3-trimetil indolina cuando la quinolina se encontraba simultáneamente presente como fuente alternativa de nitrógeno. Se llevó a cabo TLC en los extractos derivados de los supernadantes de cultivo de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 cultivada en crecimiento con quinolina como fuente exclusiva de nitrógeno, además de células pre-crecidas incubadas durante periodos diferentes en presencia de quinolina en la forma descrita anteriormente. En todos los experimentos se incluyeron controles del cultivo crecido utilizando amoníaco en lugar de quinolina como fuente de nitrógeno. Adicionalmente, se incluyeron como controles productos químicos puros posibles metabolitos de quinolina, tales como protocatachuato, catechol, ácido pirúvico y ácido p-hidroxibenzoico, formamida, 8-hidroxiquinolina y ácido succínico dimetil éster, como norma estándar en experimentos de TLC para observar si estos compuestos se formaron durante la degradación microbiana de la quinolina. Se identificaron dos puntos con factores de valor de Retardo (Rf) de 0,73 y 0,88 como posibles metabolitos de quinolina por *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 ya que estos compuestos sólo fueron observados en muestras derivadas de la incubación de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 con quinolina. Células del mismo cultivo incubadas con amoníaco no produjeron estos compuestos. TLC de por sí no identificó estos dos compuestos, de forma que se retiraron los puntos en los platos de TLC, fueron eluidos con acetato de etilo y sometidos a análisis de GC/MS.

28
71

El análisis de Cromatografía/Espectroscopia de Masa (GC/MS) puede ser también efectuado en extractos derivados de la célula en crecimiento, además de las células en reposo de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806, permitiendo la posible detección de metabolitos que no presentan puntos detectables en TLC. Dos compuestos pueden ser identificados como metabolitos de quinolina producidos por *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806: 2-quinolinona y 8-hidroxicoumarina. Los

datos de MS de comparación de estos metabolitos con 2-quinolina auténtica y 7 hidroxycoumarina (7-hidroxi-2H-1benzopiran-2-uno) son ilustrados en FIGS. 1 y 2, respectivamente.

Se puede usar GM/MS para seguir analizando los metabolitos de quinolina producidos por *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806, siendo cuantificada la relativa abundancia de estos dos metabolitos con las células en reposo expuestas a quinolina durante diferentes periodos. Los resultados son mostrados en la TABLA 1 a continuación.

TABLA 1

Metabolito	15 minutos	60 minutos	4 horas
2-quinolinona	47,8%	37,3%	17,2%
8-hidroxicoumarina	8,4%	17,3%	16,7%

Los datos indicados en la Tabla 1 son expresados como porcentaje del área total de todos los picos presentes en la cromatografía (con la excepción de quinolina). Estos datos muestran insistentemente que la quinolina es primero convertida a 2-quinolinona y entonces a 8-hidroxicoumarina, con otros metabolitos intermedios también. FIG. 3 anexa ilustra las estructuras de 2-quinolinona y 8-hidroxicoumarina, cuyos dos compuestos constituyen una vía

parcial para la biotransformación de quinolina por el *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806.

La oxigenación del átomo de carbono adyacente al átomo de nitrógeno en la quinolina para formar 2-quinolinona es consistente con la segmentación selectiva de enlaces C-N en la quinolina por el *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806.

Aún más, los resultados de las pruebas de gama de sustratos, que muestran que *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 puede utilizar quinolina, 3-4dihidro2(1H)quinolinona, 2,4-quinolinediol, 8-hidroxiquinolina y quinoxalina, también son consistentes con la vía parcial ilustrada en FIG 3.

El hecho de que 8-hidroxycoumarina no contiene nitrógeno demuestra que *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 es capaz de retiro selectivo del nitrógeno de la quinolina.

Pseudomonas ayucida ATCC N° PTA-806 no utiliza 8-hidroxycoumarina como fuente de carbono, lo cual indica que este compuesto no sigue siendo degradado por este cultivo. Se cree que la decrecida abundancia de 8-hidrocoumarina tras prolongados periodos de incubación es el resultado del creciente enlace a biomasa haciendo decrecer la eficiencia de recuperación de este compuesto en los procesos analíticos.

Al contrario de lo que sucede con muchos microorganismos degradantes de la quinolina que producen metabolitos rosados, verdes y marrones, el *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 no produce metabolitos coloreados.

Por ello, las investigaciones llevadas a cabo por el Solicitante demuestran que el cultivo puro del *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 de la invención tiene dos características únicas, patentemente distintivas:

- La incapacidad de usar la quinolina como fuente de carbono.
- La segmentación selectiva de enlaces de C-N en la quinolina y compuestos organonitrogenados relacionados.

La presente invención será ahora ilustrada con un ejemplo específico, el cual no deberá ser interpretado como limitador de la invención.

EJEMPLO

Una prueba de bionitrógeno de petróleo según los principios de la invención demuestra la habilidad del *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 de retirar nitrógeno del petróleo de esquisto. *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 fué cultivado creciendo de la forma descrita anteriormente, utilizando quinolina como fuente exclusiva de

26
73

nitrógeno. Entonces, las suspensiones de célula concentradas de lavado de duplicado fueron incubadas con muestras de petróleo de esquisto durante 16 horas a 30°C. La muestra de control consistió de petróleo de esquisto añadido a un medio estéril ModA que fué incubado durante 16 horas a 30°C. Después de la incubación, las muestras de petróleo fueron recuperadas y analizadas. Los resultados han sido alistados en la TABLA 2 a continuación, indicando que las células pre-cultivadas de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 son capaces de retirar aproximadamente un 5% del nitrógeno orgánico total y aproximadamente un 68% de quinolina del petróleo de esquisto durante una incubación (de 16 horas) de una noche a otra. Los resultados en la Tabla 2 son reportados como un porcentaje del petróleo limpio, excepto por la cantidad de quinolina que se expresa como el área bajo el pico correspondiente al tiempo de retención de quinolina en cromatógrafos de gas.

TABLA 2

Elemento	Petróleo Control	Biotratado	
		Petróleo N° 1	Petróleo N° 2
Carbono - % peso	85,01	85,21	84,87
Hidrógeno - % peso	9,69	9,81	9,81
Nitrógeno - % peso	1,71	1,63	1,62
Sulfuro - % peso	1,41	1,34	1,36
Quinolina - % peso (Área pico GC)	177.495	58.502	57.415

Los datos en la Tabla 2 demuestran por lo tanto que el total de nitrógeno en el petróleo puede ser reducido en un 5% como resultado de la exposición del petróleo al cultivo puro de la invención. Aún más, aproximadamente un 68% de la quinolina presente en el petróleo puede ser retirado como consecuencia del biotratamiento y por ello se pueden lograr procesos de biorefinería para el retiro selectivo de nitrógeno

del petróleo, en presencia de biocatalizadores tales como *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 de la invención.

Derivados de *Pseudomonas ayucida* de N° ATCC han sido seleccionados habiendo mejorado la habilidad de utilizar quinoxolina como fuente exclusiva de nitrógeno. Este cultivo derivativo retiene su habilidad de segmentación selectiva de enlaces de C-N en la quinolina y posee una gama incrementada de sustratos para el metabolismo de compuestos organonitrogenados adicionales tales como la quinazolina y la isoquinolina. De forma similar, derivados de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 que son resistentes a antibióticos, ya sea mediante aislamiento de mutaciones cromosómicas o por la introducción de plásmidas apropiados, retienen la habilidad de segmentación selectiva de enlaces C-N en la quinolina y en otros compuestos organonitrogenados. Esta propiedad hace que el *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 y sus derivados sean un agente específico de uso en síntesis química orgánica para la segmentación de enlaces de C-N que puede ser utilizada en diversos sistemas de procesos orgánicos. De la misma manera, las características únicas del *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 y sus derivados que poseen la habilidad de segmentación selectiva de enlaces C-N pueden servir para la degradación de desnitrogenación de una gran variedad de materiales orgánicos.

Aunque en la especificación antedicha, esta invención ha sido descrita en relación a ciertas aplicaciones en medios preferidos y se han provisto muchos detalles a efectos de ilustración, resultará aparente a los expertos en la materia, que la invención es susceptible de aplicaciones adicionales y que ciertos detalles aquí descritos pueden variarse considerablemente sin apartarse de los principios básicos de la invención.

I REIVINDICACIÓN

1. Un cultivo de cepa de microorganismo mutante *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806.
2. Un cultivo del microorganismo mutante *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 que posee la habilidad de reducir selectivamente el contenido de nitrógeno de material carbonáceo orgánico conteniendo nitrógeno mediante segmentación de enlaces orgánicos de C-N y produciendo 8-hidroxycoumarina cuando en un medio de crecimiento que comprende nutrientes minerales y una fuente asimilable de carbón en substancial ausencia de compuesto contenedor de nitrógeno excepto dicho material orgánico carbonáceo que contiene nitrógeno, y en la presencia de oxígeno a temperaturas de unos 25°C a 35°C.
3. Un cultivo de microorganismo mutante *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 que tiene la habilidad de reducir selectivamente el contenido de nitrógeno de material carbonáceo orgánico conteniendo nitrógeno mediante segmentación de enlaces orgánicos de C-N, exponiendo las citadas células bacteriales intactas, extractos de célula o enzimas purificados de la segmentación de enlace de C-N a materia orgánica carbonácea contenedora de nitrógeno a temperaturas de desde 15 a 40°C en la presencia de oxígeno.
4. Un cultivo de microorganismos derivados de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 que posee la habilidad de reducir selectivamente el contenido de nitrógeno material orgánico carbonáceo contenedor de nitrógeno mediante segmentación de los enlaces orgánicos de C-N y producir 8-hidroxycoumarina cuando crece en un medio que contiene nutrientes minerales y una fuente asimilable de carbono en la substancial ausencia de compuesto conteniendo nitrógeno excepto dicho material carbonáceo contenedor de nitrógeno y en presencia de oxígeno a temperaturas de unos 25°C a 35°C.
5. Un cultivo de microorganismos derivados de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 que tiene la habilidad de reducir selectivamente el contenido de nitrógeno de material carbonáceo orgánico contenedor de nitrógeno mediante segmentación de enlaces orgánicos de C-N exponiendo las citadas células bacterianas intactas, extractos de célula o enzimas purificadas de

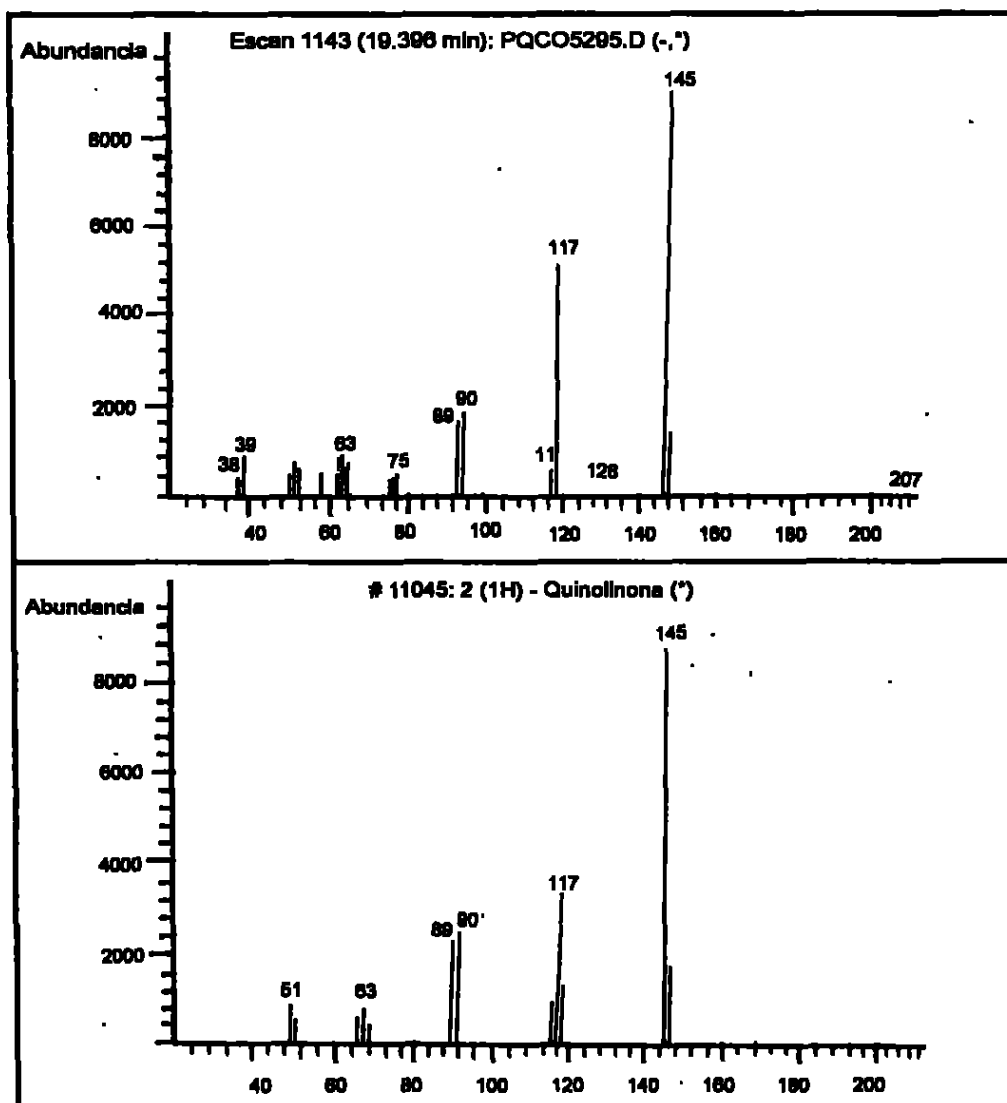
segmentación de enlace C-N a materia carbonácea orgánica a temperaturas de 15°C a 40°C en la presencia de oxígeno.

EXTRACTO

Se describe una cepa mutante de *Pseudomonas ayucida* ATCC N° PTA-806 que es capaz de segmentar selectivamente enlaces orgánicos de C-N y reduce el contenido de nitrógeno de material orgánico carbonáceo.

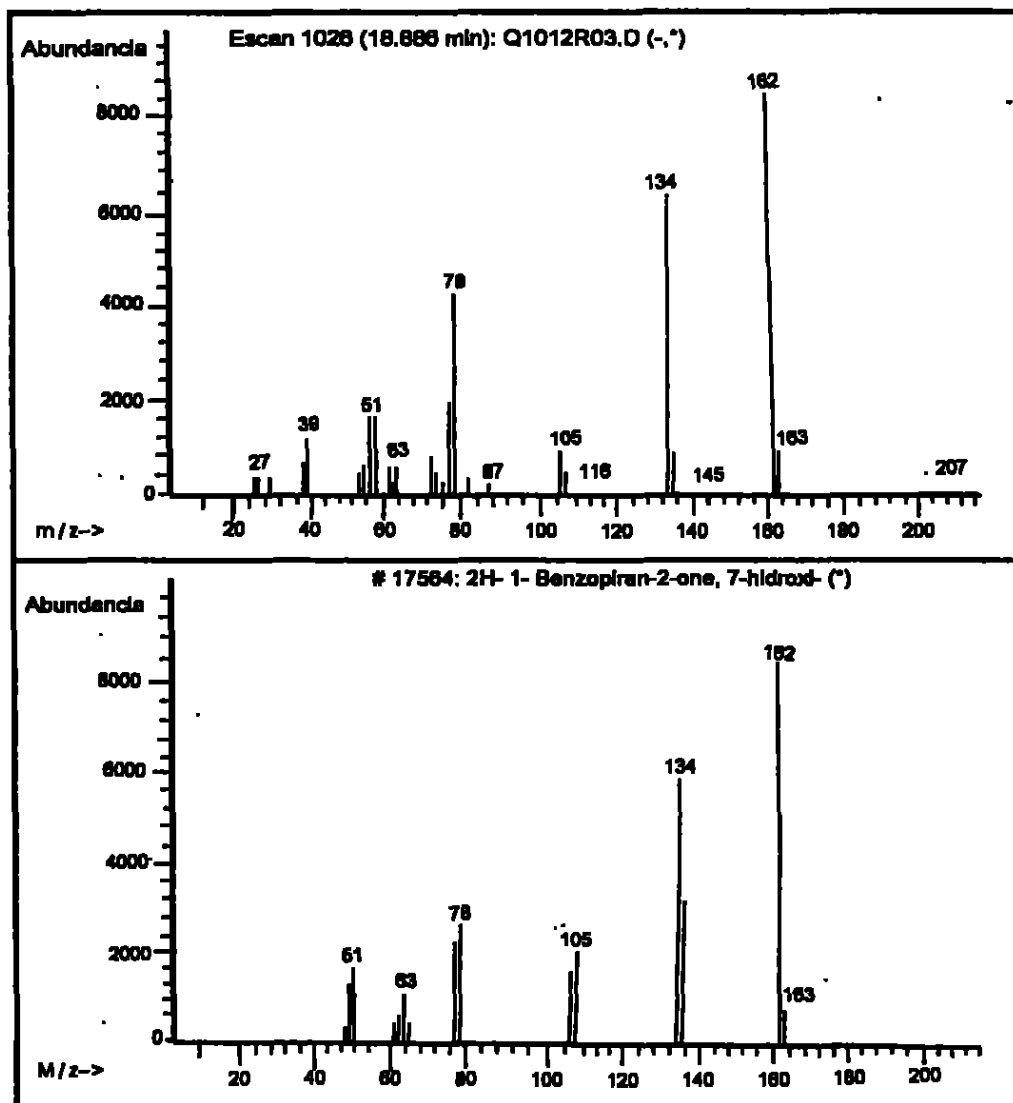
81
78

FIG. 1



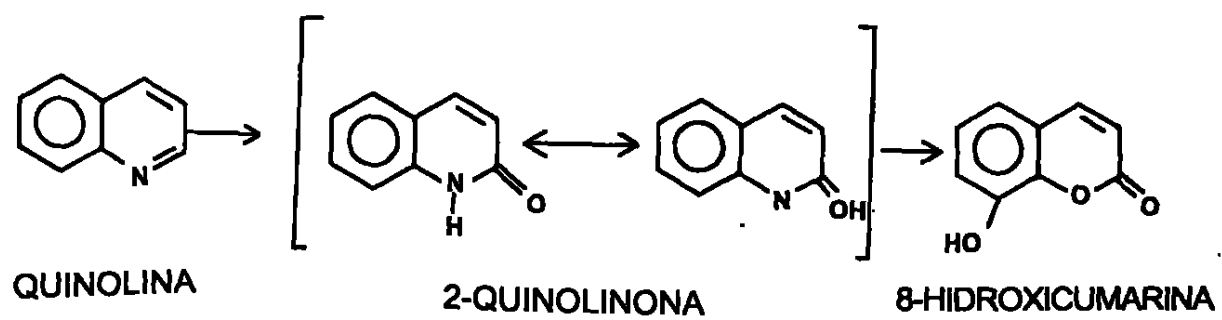
82
79

FIG. 2



83
80

FIG. 3



84
81

SUPERINDUSTRIA Y CIGENCIO
Radicacion : 00091A32 00000000 Folios: 64
Fecha (AMD): 2000-11-30 18:04:48
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRA/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2629 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 71,568
FECHA : NOVIEMBRE 20 DE 2000

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No. PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00110-6	2825220	16,327,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608,000.00
	TOTAL :	\$ 608,000.00

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Col adeis - 401 - 110 5

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

PATENTE DE INVENCION ☒

Radicacion : 00091832 00000000

Folios: 34

Fecha (AÑO): 2000-11-30 18:04:40

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

☒ Nombre e identificación del Solicitante

PAG 1

[]

☒ Nombre e identificación del Inventor

- PAG 1

[]

☒ Título o nombre de la Invención

[]

☒ Descripción

PAG 2

[]

☒ Reivindicaciones

PAG 20

[]

☒ Resumen

PAG. 5.

[]

☒ Comprobante de Pago

Pag 84.

[]

☐ Poder, cuando proceda

[]

☐ Copia de la primera solicitud de patente, si reivindica prioridad, señalándola expresamente

[]

☒ Firma del solicitante o apoderado

[]

COMPLETA ☒

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

☐ Nombre e identificación del peticionario

[]

☐ Nombre e identificación del inventor o diseñador

[]

☐ Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse

[]

☐ Representación gráfica

[]

☐ Comprobante de pago

[]

☐ Poder, cuando proceda

[]

☐ Firma del solicitante o apoderado

[]

COMPLETA ☐

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha: _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

2020
Bogotá, D.C.

Doctor
EMILIO FERRERO
Apoderado

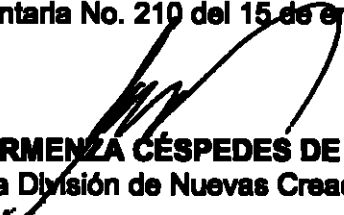
REFERENCIA:	Radicación No.	00-91832
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio No.	0537
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante (art. 28-k, Dec 486/2000).

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución Reglamentaria No. 210 del 15 de enero del 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 08 MAR. 2021

202027/202022

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 382 2695
E-mail: Info@slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia