

B.T.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

03-78437

21. EXPEDIENTE N°

54. TÍTULO

BIOINSECTICIDA BASADO EN UNA CEPA DE BACILLUS THURINGIENSIS

(BERLINER), LA FORMULACION Y LOS PROCEDIMIENTOS DE PRODUCCION.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

007 K 14/340

71. SOLICITANTE

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

DOMICILIO

Bogotá, D.C. Colombia.

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

Código No. 1092

22. BOGOTÁ, D. C.

1265

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



03 078437 00

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación: 82378437 00000000
Fecha (GG): 2603-09-03 17:28:01
Trámite: 102 PATENTES & 1 REGISTRO/ 111 PRESENTE
Dependencia: 2029 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE 2000-3

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Dirección: Rectoría General
Ciudad Universitaria,
Universidad Nacional de Colombia,
Bogotá, D.C. Colombia.Teléfono: 548 09 70
E-mail: clientes@camyp.com
Fax: 249 40 70

Domicilio: Bogotá, D.C. Colombia.

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Número: _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: Emilio FERRERO

Dirección: Carrera 4ª No. 72-35

Teléfono: 347 38 11
E-mail: caveller@caveller.com
Fax: 217 92 11
Domicilio: Bogotá, Colombia

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Número: 438.019 TP 31.929

4

INVENTOR(ES)
(72)1- Jairo Alonso CERÓN SALAMANCA
2- Gustavo BUITRAGO HURTADO
3- Daniel URIBE VELEZDomicilio: Instituto de Biotecnología,
Edificio Manuel Ancizar,
Ciudad Universitaria,
Universidad Nacional de Colombia,
Bogotá, D.C. Colombia.

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Número: _____

5

TITULO (54) BIOINSECTICIDA BASADO EN UNA CEPA DE BACILLUS THURINGIENSIS (BERLINER), LA FORMULACIÓN Y LOS PROCEDIMIENTOS DE PRODUCCIÓN

6

Clasificación Internacional (51) A01N 63/02

7

Prioridad

SI ☐ NO ☒

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

8

Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los

6 meses ☐12 meses ☐18 meses ☒Otro ☐

9

Comprobante de pago No 03-62.145

Fecha: 1 de septiembre de 2003

Comprobante de pago No

Fecha:

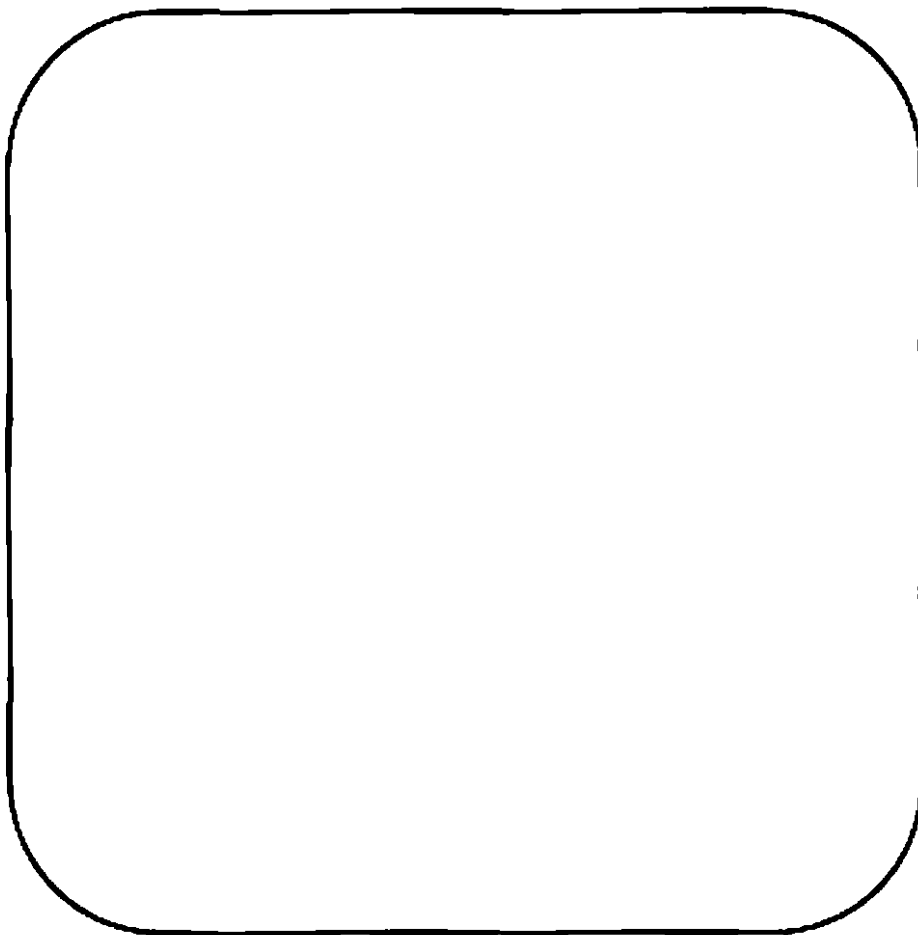
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud \$400.000.00
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☒ Descripción de la invención
- ☒ Una o más reivindicaciones
- ☐ Dibujos y/o planos necesarios
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arie final 12 x 12.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA: Emilio Ferrero

C.C. 438.019 de Usaquén T.P.A. 31.829

del R

Bioinsecticida basado en una cepa de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), la formulación y los procedimientos de producción.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención concierne a un bioinsecticida, los procedimientos para la producción del ingrediente activo consistente en delta- endotoxinas de una cepa de *Bacillus thuringiensis*, y la formulación del bioinsecticida que presenta una alta capacidad de control de larvas de insectos del orden Lepidóptera. Este producto contiene sustancias aditivas seguras y proporciona la cantidad de ingrediente activo requerida para obtener la actividad entomocida deseada.

El descubrimiento de formulados químicos para el control de plagas ha evolucionado hasta nuestros días y se ha consolidado como prácticas de defensa a corto plazo. Lo que en un principio fue considerado como positivo, ha dado como resultado la dependencia total de estos productos por parte del agricultor y un criterio erróneo de aplicación anual con unos calendarios fijos, sin ser necesarios en muchos casos tratamientos tan severos. La gran cantidad de residuos que originan, a veces muy persistentes, afectan a las distintas especies animales que ocupan el entorno de aplicación e incluso al ser humano.

El uso de insecticidas lleva consigo una serie de inconvenientes, aparte de los anteriormente mencionados, que agravan el problema de su utilización. Gran parte no son suficientemente selectivos, es decir, eliminan junto con la plaga otros insectos útiles como pueden ser sus propios enemigos naturales. Por ello el insecto plaga, al verse libre de sus enemigos, se multiplica sin problemas y con más intensidad que antes. Otro inconveniente importante es la aparición de resistencias cuando no toda la población plaga muere y algunos individuos por mecanismos de mutación y selección, son capaces de sobrevivir transfiriendo a sus descendientes esta cualidad. La cantidad de resistencias a los plaguicidas

ha pasado a ser de menos de 20 especies de insectos hace 50 años, hasta las casi 700 de hoy. Todo ello ha originado que la aplicación de plaguicidas sea cada vez más severa, aumentando dosis y potencia.

Todas estas desventajas han motivado a la búsqueda de productos alternativos que suplan las deficiencias de los plaguicidas químicos tradicionales. Es el caso de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (B.th.). Los primeros bioinsecticidas formulados a partir de B.th. se remontan a principios de siglo, siendo descubierta y publicada su actividad insecticida en 1901.

Bacillus thuringiensis es una bacteria ampliamente distribuida que habitualmente podemos encontrar en el suelo, polvo y en la superficie de numerosos sustratos vegetales. B.th. es una bacteria Gram positiva que se caracteriza por la formación, durante el ciclo de esporulación, de uno o más cristales paraesporales. Estos cristales están compuestos por proteínas llamadas δ -endotoxinas o proteínas Cry (codificadas por genes cry), las cuales poseen el ingrediente activo que confiere toxicidad específica contra distintas plagas de insectos.

El mecanismo de infección requiere de la ingestión activa del microorganismo por la larva. Las larvas poseen en su sistema digestivo una combinación de pH, sales y enzimas necesarias para activar los cristales altamente insolubles. Así que el insecto debe ingerir el complejo espora-cristal, para ser afectado y debe hacerlo en dosis suficientes para que el efecto sea mortal.

El peso molecular aproximado de esta proteína es de 130 a 135 KDa y se le denomina protoxina; la protoxina es digerida en el intestino medio del insecto por las condiciones alcalinas y las proteasas presentes, liberándose un péptido tóxico de 60 a 70 KDa haciendo que el insecto tenga parálisis en el tracto digestivo y suspenda la ingestión. La toxina reconoce y se une a sitios específicos (receptores) localizados en las micro vellosidades de las células epiteliales del intestino medio, induciendo a la formación de poros de

membrana. Tal alteración resulta en un flujo bidireccional de iones e ingreso de agua; dando como resultado que las células del intestino de la larva se inflamen y posteriormente se lisen. La histólisis se produce por el ingreso de agua en la célula inducida por la toxina, en algunos casos el ambiente creado por la delta-endotoxina puede ser suficiente para la germinación de la espora de B.th. y subsecuentemente septicemia.

Desde que se conoció que el B.th. producía una proteína cristal (δ -endotoxina), la cual es un agente efectivo de control biológico en la producción agrícola, la producción de la delta-endotoxina se hace en fermentaciones sumergidas usando medios de cultivo que contienen fuentes de carbono, nitrógeno y elementos nutritivos, para lograr el desarrollo del microorganismo, la formación de metabolitos secundarios y la formación de esporas y cristales.

Al comparar la producción de esporas y delta-endotoxina utilizando un gran número de medios complejos apropiados para la producción industrial, se ha encontrado que la actividad insecticida depende de la especie y del medio para la producción de la toxina. Se conoce la importancia de los minerales especialmente de los iones manganeso, potasio, calcio y cinc en la producción de esporas y toxinas (Nickerson, 1974).

Son numerosas las publicaciones sobre medios de cultivo para B.th., en general se acepta que para cada cepa y las condiciones ambientales imperantes, el medio de cultivo es particular (Goldberg, 1977; Smith Robert, 1982; Smith, 1982; Arcas J et al, 1984; Pearson D. et al, 1988; Avignone Rossa C.A. et al, 1989; Abarca, C. et. al 1992).

La importancia del biopesticida desarrollado radica en su alta actividad y, por lo tanto, su gran capacidad de control de larvas del insecto *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, plaga que ataca una amplia gama de cultivos, entre otros, maíz, algodón, sorgo, soya y arroz. Por ser una plaga que ataca una amplia gama de cultivos, se hace indispensable contar con un agente de control de la plaga

como el que es objeto de esta patente. La cepa y el producto desarrollado presenta una mayor actividad entomocida y, por lo tanto, una mayor capacidad de control de esta plaga en los cultivos mencionados, beneficiando a los productores agrícolas por su eficacia.

7

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El propósito principal de esta invención es proveer una formulación seca, el proceso tecnológico para la manufactura del ingrediente activo y del producto de un bioinsecticida que presenta actividad tóxica contra larvas de insectos del orden Lepidoptera.

Aislamiento de la cepa de *Bacillus thuringiensis* del suelo

El procedimiento de aislamiento de la cepa de *Bacillus thuringiensis* de la presente invención se realizó de la siguiente forma: se pesó 1.0 g de suelo y se adicionaron a 17.5 ml de caldo Luria Bertani (LB) (para 100 ml: 1 g de triptona, 0.5 g de extracto de levadura y 0.5g de cloruro de sodio) en un erlenmeyer de 125 ml. El caldo LB fue amortiguado con acetato de sodio (0.25 M, pH 6.8), la mezcla es incubada (4hr, 200rpm, 30°C), al cabo de las 4 horas la mezcla fue calentada a 60°C por 3 minutos. La mezcla tratada con calor fue cultivada sobre placas de agar T3 (triptona, triptosa, extracto de levadura, MgCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, agar-agar) fue incubado durante 16 horas a 30°C hasta completar la esporulación.

Al cabo de las 16 horas se realizó un replique de las colonias características a B.th. sobre placas de agar LB se incuban a 30°C por 24 horas, la esporulación es monitoreada utilizando tinciones de Gram y Cristal Violeta.

La cepa aislada presentó las siguientes características microscópicas: colonias opacas redondas con borde irregular, de consistencia cremosa y de color crema claro. A nivel microscopio y a través de una tinción simple con cristal violeta, la cepa aislada de la presente invención evidencia claramente formas vegetativas que corresponden a bacilos delgados que se tiñen de violeta

oscuro. Las esporas son ovaladas, refringentes a la luz y presentan cristales bipiramidales.

La cepa de la presente invención es:

Catalasa: +

Crecimiento Anaerobio: +

Prueba Voges-Proskauer: d

pH en Caldo V-P: entre 6 y 7

D-Glucosa: +

L-Arabinosa: -

D-Xilosa: -

D-Manitol: -

Producción de Gas a partir de Glucosa: -

Hidrólisis

Caseína: +

Gelatina: +

Almidón: +

Utilización de

Citrato: +

Propionato: ND

Degradación de tirosina: ND

Deaminación de Fenilalanina: -

Egg-yolk lecitinasa: d

Reducción de Nitrato a Nitrito: +

Formación de:

Indol: -

Dihidroxiketona: D

Allantoin o urea: -

Crecimiento a pH: 6.8: +; 5.7: +

Crecimiento en NaCl: 2%: +; 5%: +; 7%: +

Crecimiento a: 5°C -: 10°C d; 30°C +; 40°C +; 50°C -: 55°C -: 65°C -.

Símbolos

-:90% o más de las cepas son negativas.

+: 90% o más de las cepas son positivas.

d: 11-89% de las cepas son positivas.

ND: no hay datos disponibles.

El microorganismo.

En la presente invención la cepa de *Bacillus thuringiensis* aislada del suelo mediante la técnica descrita, ha sido depositada en el Banco de Referencia de la American Type Culture Collection (ATCC), institución que le asignó como número de registro ATCC 202194. Esta cepa produce una proteína de 130 a 135 KDa la cual presenta actividad tóxica contra *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith y otros insectos del orden Lepidóptera.

La cepa fue denominada IBUN 90.1.98 fue aislada y caracterizada en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). La cepa se conservó a 4°C en cajas de Petri con medio LB cuya composición es triptona 10g/L, extracto de levadura 5 g/l y cloruro de sodio 10 g/L.

Peso molecular de las toxinas

Se determinó por electroforesis utilizando patrones de diferentes pesos moleculares. Los reactivos utilizados para preparar los geles de acrilamida son:

REACTIVOS	GEL	GEL SEPARADOR
Agua destilada	1.210 µl	2.250 µl
Buffer Tris. HCL 0.5M pH	500 µl	-
Buffer Tris. HCL 1.5M pH	-	1.250 µl
Acrilamida-bisacrilamida	250 µl	1500 µl
SDS 10%	20 µl	-
Persulfato de amonio 10%	20 µl	30 µl

TEMED

2 μ l

3 μ l

Se dejó solidificar el gel en el molde y luego se sembró la muestra de proteína (1 μ l) tratada con mezcla lítica que contiene Tris pH 6.5 0.5M 1.2 ml; SDS 10% 2 ml; glicerol 1 ml; azul de bromofenol al 0.5% 0.5 ml; 2- mercaptoetanol 0.5 ml; agua desionizada csp 10 ml. Se corrió el gel con el buffer de corrido (Tris 0.3%, glicina 1.44%, SDS 0.1%) a 5 mA por 30 minutos y luego 10 mA por 1 hora. El gel se revela con una solución de azul de Coomassie 0.1%, 50 ml de metanol, 40 ml de ácido acético glacial y 10 ml de agua por 30 minutos, se pasó a la solución decolorante (igual a la anterior pero sin azul de Coomassie) con agitación por 30 minutos, posteriormente se secó el gel.

Se encontraron bandas de un peso molecular de aproximadamente 135 Kda banda superior y 131.4 KDa banda inferior. El perfil electroforético fue un indicativo de la pureza de la δ -endotoxina y de su posible degradación.

Caracterización mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa –PCR- de la cepa

La cepa fue cultivada durante 12 horas sobre placas de agar LB. Una asa de células de una única colonia fue transferida a 0.1 ml de agua, la mezcla fue hervida por 10 minutos para que las células se lisen. Las células lisadas se centrifugan por 10 minutos a 10.000 rpm. Un total de 15 microlitros fueron trasferidos a un tubo de microcentrifuga que contenía 0.5 a 2.5 unidades de enzima Taq polimerasa, 0.1 a 0.5 micromolar de cada uno de los "primers" que son oligonucleótidos que cumplen la función de iniciador para la amplificación del fragmento respectivo, y 2.5 mM de 4 trifosfatos deoxinucleosidos hasta completar un volumen de 50 microlitros.

La amplificación fue realizada con un termociclador de DNA (Omnigene HB-Tr3-CM; Hybaid Limited, Teddington, Middlesex, United Kingdom), se uso un único paso de desnaturalización, seguido por un programa de 25 ciclos, cada

11

ciclo de desnaturalización consistió a 92 C por 1 minuto, recalentamiento a 53 C por 1 minuto y extensión a 72 C por 1 minuto; un paso de extensión final (72 C por 10 min) fue también usado. A un total de 20 microlitros de la mezcla de PCR se le realizó un perfil electroforético sobre un gel de agarosa TBE (TRIS-borate) y teñido con bromuro de etidio.

Producción de ingrediente activo por Fermentación

Activación del microorganismo. La cepa proveniente del criovial se siembra en medio Luria Bertani (LB) sólido, a un pH de 7.2 y 29 C por un periodo de 15 a 20 días, hasta esporulación total. Las cajas se conservan a 4 C. La caja madre se replica cada mes y es cambiada por una nueva caja madre cada tres meses partiendo del mismo liofilizado.

Preparación de Preinóculos e Inóculos. Se preparan preinóculos con la misma composición del medio correspondiente al lote; se toma el bacio esporulado en el medio LB sólido, se siembra en un volumen de medio líquido de 900ml. Los preinóculos se cultivan a 30 C en cuarto atemperado, con agitación de 200 r.p.m.

Composición del Medio Utilizado:

CaCO ₃	1g/l
Jarabe o derivado del maíz	10 g/l
Melaza o derivado	20 g/l
Harina o derivado de soya	20 g/l

El microorganismo se siembra en el 10 % del volumen de fermentación y crece hasta una densidad óptica promedio de 0.65 u.a., leída a 600nm, se utiliza medio de cultivo estéril como blanco.

En la fermentación es necesario realizar preinóculo e inóculo dependiendo del volumen del fermentador en el cual se realice, de forma tal que en el inóculo final (10% del medio de cultivo depositado en el fermentador de producción) se obtenga la cantidad necesaria de células para evitar la fase de latencia en el reactor, tratando de conservar la relación de volumen de 1:10 entre el preinóculo y el inóculo precedente o suficiente densidad de células para servir de inóculo, manteniendo un riguroso control en la pureza y estado vegetativo del cultivo que se emplee como inóculo o preinóculo.

Preparación del medio de cultivo e inoculación. El pH del medio de cultivo es ajustado a 7.2 para preinóculos y 7.8 para inóculos en reactor, por adición de hidróxido de potasio o ácido clorhídrico antes de la esterilización, así el medio estéril se encontrará a $\text{pH } 7.0 \pm 0.05$. El matraz con el medio para preparar el preinóculo es sometido a esterilización a 121 C por 30 minutos para medio de cultivo y de 15 minutos para medio estándar de seguridad, el inóculo y medio en reactores son esterilizados por 1 hora a 121 C.

Dependiendo de la calidad microbiológica de las materias primas, determinada en la recepción de éstas, se utiliza una de las siguientes rutas de pretratamiento:

Ruta 1: Preparación de medio y esterilización, en autoclave para 10L y in situ para 300 l.

Ruta 2: Preparación de medio concentrado en 25% del volumen, esterilización por 30 min. a 121 C, filtrado en filtro de placas sin ayuda filtrante y esterilización por 1 hora a las mismas condiciones.

Ruta 3 : Preesterilización de materias primas independientemente, sea en autoclave por 1 hora o por calor seco (mufla 24 horas, incubación 24 horas y mufla 48 horas), preparación de medio y esterilización entre 30 – 60 min. a 121 C.

Condiciones de Operación. La producción de ingrediente activo se realiza por fermentación en lotes utilizando el medio establecido. Las condiciones de operación de los fermentadores de 10 l y 300 l se encuentran en la siguiente tabla.

Condiciones de Operación de los Fermentadores

Condiciones	10 l	300 l
Volumen de Medio (l)	8	150
Relación Volumen de Medio / Volumen del Fermentador.	0.8	0.5
Porcentaje de Inóculo	10	5.3
Densidad óptica de Inoculación	0.65	0.65
Agitación (r.p.m)	300	140
Temperatura (°C)	30	30
Aireación (v.v.m)	1	0.2 max
pH Inicial del medio	7.0	7.0
Antiespumante (mL)	por control	por control
Tiempo de Fermentación (Horas)	12-20	48 - 60

Las condiciones de aireación y agitación fueron determinadas mediante estudios de transferencia de oxígeno, evaluando K_La y así proveer al microorganismo de las mejores condiciones posibles para su crecimiento.

La fermentación en tanque agitado de la cepa IBUN 90.1.98 de *Bacillus thuringiensis* produce gran cantidad de espuma, para controlar este fenómeno se emplea como antiespumante soluciones en concentraciones entre 0.25 y 2.5 % de marcas comerciales de estos, adicionado según la etapa del proceso en una estrategia que al finalizar la fermentación no supera el 0.025% del antiespumante concentrado en el medio total.

El tiempo de fermentación del reactor de mayor volumen se establece hasta alcanzar el 95% de esporulación, que se comprueba mediante conteo en placa teñida con cristal violeta.

Preparación del medio de cultivo para la fermentación. Para el diseño y optimización del medio de cultivo para la fermentación con la cepa de *Bacillus thuringiensis*, se hizo un balance entre la fuente de carbono, fuente de nitrógeno y los elementos traza. El medio de cultivo suministra al microorganismo los nutrientes que requiere para crecer, esporular y producir la toxina.

En la presente invención la elección de los componentes del medio de cultivo para la cepa de *Bacillus thuringiensis* se fundamentó en los componentes de los medios descritos en la literatura. Los componentes y concentraciones de los medios utilizados en la producción, son producto de investigaciones individuales de los tipos de componentes: sales, fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y la interacción entre ellos, teniendo como base medios probados en el Instituto de Biotecnología, mediante matrices sometidas a diseños de experimentos y análisis estadísticos rigurosos. Como resultado de la evaluación de los componentes de los medios de cultivo, se establecieron los siguientes componentes del medio y sus correspondientes concentraciones:

Componente	Concentración g/l
Salas	
KH ₂ PO ₄	6.8
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.036
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.014
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.002 a 0.2
MnSO ₄ . H ₂ O	0.0015 a 0.015
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0.24 a 0.715
CaCO ₃	0.5 a 2
Fuentes de Carbono	



Melaza o derivados	1.5 a 30
Fuentes de Nitrógeno	
Jarabe o derivados de Maíz	5 a 27.5
Harina o derivado de Soya	3 a 32.5
Extracto de levadura	3.5 a 14
(NH₄)₂SO₄	4.2 a 8.4

Las sales se preparan individualmente en solución ácida de HCl 0.02N, y son agregadas en el orden específico que se indica en la anterior tabla. Luego se adicionan las fuentes de carbono y nitrógeno, finalmente se ajusta el pH.

En algunos casos es necesario filtrar los medios antes de la esterilización, con el fin de eliminar la mayoría de sus componentes insolubles que pueden afectar el normal desarrollo de la fermentación y la posterior recuperación del producto. En tal caso es necesario un tratamiento anterior con calor y obtener así la mayor cantidad de nutrientes de las materias primas. Estos medios se esterilizan a 121 °C por una hora, para los fermentados y de media hora para los inóculos que se emplean en la siembra del fermentador.

Fermentación. Los pre-inóculos corresponden al 10% del volumen del inóculo, son activados a partir de la cepa pura 100% esporulada y conservada en medio sólido; el tiempo de incubación no supera las 16 horas, período en el cual se debe verificar la pureza y estado vegetativo del pre-inóculo. Estos cultivos se realizan en erlenmeyers, ocupando un 10% del volumen total e incubándolos a 30 °C con agitación de 200 rpm en agitadores orbitales. De acuerdo con el número y tamaño de los fermentadores, se determina el número de inóculos necesarios.

Como resultado de este proceso productivo se tienen medios de cultivo con combinaciones de componentes para alcanzar una concentración final entre 12 - 15 g/l de ingrediente activo, con una actividad insecticida contra *Spodoptera frugiperda* entre 45 – 87.5% de mortalidad frente a un estándar de dosis letal 50.

Recuperación de delta-endotoxina y espora

Separación por filtración. El medio de cultivo se descarga de los reactores en recipientes de suficiente capacidad en los que se instala un agitador de turbina, se agrega ayuda filtrante entre 3 – 15 g/l y se pasa a través de un filtro de placas; el número de placas necesario depende de la capacidad del filtro y de la cantidad de ayuda filtrante utilizada. De ésta operación se obtiene una torta con una humedad no mayor de 70%.

Secado. En un secador de lecho fluidizado se coloca la torta y se somete a corrientes ascendentes de aire seco a una temperatura no mayor de 30 °C, para lo cual la cámara de calentamiento se encuentra a 40 °C, obteniendo así un producto con una humedad entre 5 – 10%. El tamaño de partícula del producto obtenido del secador es grande, por lo que se somete a una etapa de reducción de tamaño en un molino para posteriormente hacer la formulación final.

Formulación del bioinsecticida basado en la cepa de *Bacillus thuringiensis*.

La formulación provee una combinación eficaz de ingredientes, de tal manera que el ingrediente activo junto con otros materiales forma un producto estable, seguro, efectivo, fácil de aplicar y aceptable para su uso. La formulación emplea tres clases de componentes: 1. el principio activo responsable de la actividad insecticida, 2. disolventes o diluyentes que actúan como vehículos de la materia activa y 3. coadyuvantes que aumenten su persistencia en el medio ambiente o mejoren su propia acción.

Uno de los criterios que se tuvo en cuenta en la formulación es la compatibilidad del ingrediente activo con los ingredientes del formulado para prevenir biodegradación, interferencia en el proceso de infección y efectos

sobre la viabilidad del microorganismo. Cuando un biopesticida se aplica, el producto se asperja uniforme y rápidamente para permanecer por un periodo de tiempo razonable en el área de tratamiento. El biopesticida es fácilmente almacenado, empacado, transportado y utilizado.

La formulación es la etapa que sigue a la recuperación de la delta-endotoxina y esporas del *Bacillus thuringiensis*. El producto formulado está constituido por: a.) delta-endotoxina y spora, b.) secantes químicos c) agentes dispersantes, d.) aglutinantes / humectantes y e.) agentes protectores contra la luz solar.

La biomasa recuperada acorde con la descripción anterior, fue mezclada con los polvos químicos secos en las siguientes cantidades, para obtener un kilogramo de producto formulado:

1. 474 gramos de caolín.
2. 321.6 gramos talco micronizado calidad USP.
3. 62.4 gramos de lactosa.
4. 21 gramos de tierra diatomea.
5. 85 gramos del principio activo responsable de la actividad insecticida, constituido por el complejo spora – cristal.
6. 36 gramos de melaza deshidratada.

La secuencia de mezcla es en el orden presentado. El procedimiento de incorporación y mezclado utiliza un mezclador con agitador de paletas de tres velocidades de giro. La adición secuencial es continua hasta llegar al numeral 5, este se adiciona y se da un tiempo de mezcla de 10 minutos. Posteriormente, se adiciona el ingrediente número 6 y se mezcla por tres minutos.

La formulación del bioinsecticida esparcida como polvo tiene una actividad tóxica entre 500-1500 UIT/mg (Unidades Internacionales Tóxicas / mg). En

18

términos de Biomasa presenta una actividad toxica equivalente entre 10^5 y 10^{12} UFC (Unidades Formadoras de Colonia)/g de biomasa toxica.

En esta invención la formulación bioinsecticida esparcida como suspensión acuosa polvo tiene una actividad toxica entre 500-1500 UIT/mg (Unidades Internacionales Toxicas / mg). En términos de Biomasa presenta una actividad toxica equivalente entre 10^5 y 10^{12} UFC (Unidades Formadoras de Colonia)/g de biomasa toxica.

Bloensayo con Ingrediente activo de la cepa de *Bacillus thuringiensis* para evaluar toxicidad contra *Spodoptera frugiperda*

En la presente invención los ingredientes activos y los productos formulados fueron evaluados por bloensayos que se realizaron empleando una metodología de contaminación superficial del alimento, estandarizada en el laboratorio de entomología del IBUN. La metodología consistió en bloensayos con larvas de máximo 24 horas de nacidas (primer instar larval) de *Spodoptera frugiperda* J.E Smith (Lepidoptera: noctuidae), para determinar si la actividad de la delta-endotoxina y el producto formulado con el ingrediente activo producido por la cepa en los diferentes lotes de fermentación y con los diferentes medios de cultivo, mantenía sus características de actividad tóxica contra este insecto plaga.

Se utilizando como sustrato alimenticio una dieta artificial desarrollada en el IBUN para la cría de *S. frugiperda* en laboratorio (Rodríguez *et al.*, 2001). Se utilizaron placas de cultivo de células de 24 pozos en las cuales se dispensaba la dieta artificial. Sobre la superficie de la dieta de cada pozo se adicionaban 40µl de una suspensión del producto de fermentación a evaluar, previamente liofilizado y se deja secar en cámara de flujo laminar. Luego, cada pozo se infesta con una larva de *Spodoptera frugiperda* proveniente de la cría mantenida en el laboratorio de entomología del IBUN. Las placas se sellan y se

almacenaban por 7 días bajo las mismas condiciones ambientales en las cuales se mantiene la cría del insecto en laboratorio (25 C y 75% de humedad relativa).

El diseño experimental empleado en los bioensayos fue completamente al azar, con 24 larvas por unidad experimental y 2 a 3 repeticiones por tratamiento. La variable respuesta fue el número de larvas muertas presentes en cada tratamiento, expresado como porcentaje de mortalidad. Se empleó un testigo consistente en dieta tratada con el agua empleada en la preparación de las suspensiones del liofilizado.

Se evalúan muestras provenientes de lotes de fermentación, en ensayos realizados de acuerdo al diseño experimental implementado para la producción del ingrediente activo por fermentación. En estas está incluida una muestra patrón consistente en la cepa nativa crecida en el medio estándar LB, el cual es empleado para el crecimiento rutinario de cepas de *B. t.* para estudios en laboratorio.

Habiendo descrito las modalidades preferidas de la invención, se entenderá que las mismas no son limitativas de la presente invención y que el alcance de la misma está dado por las reivindicaciones a continuación.

REIVINDICACIONES

1. Un agente de control biológico CARACTERIZADO porque comprende una cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* depositada bajo número de registro ATCC 202194, cepa que se caracterizó empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y la cual es altamente tóxica contra el insecto del orden Lepidoptera cuyo nombre científico es *Spodoptera frugiperda*.
2. Un agente de control biológico de conformidad con la reivindicación 1 en donde dicha cepa produce una proteína de 130 a 135 kilodaltons (KDa).
3. Un agente de control biológico de conformidad con la Reivindicación 2, que emplea como ingrediente activo la proteína contenida en un cristal producido por dicha cepa.
4. Un agente de control biológico de conformidad con las reivindicaciones 1 a 3, que emplea como ingrediente activo la espora que produce dicha cepa.
5. El agente de control biológico de acuerdo con las Reivindicaciones 1 a 4, que se caracteriza por poseer una concentración letal media (CL 50) para el insecto *Spodoptera frugiperda* entre 80 y 160 nanogramos (ng) de proteína tóxica por centímetro cuadrado de dieta artificial en condiciones de laboratorio.
6. Un procedimiento para la producción industrial de un agente de control biológico de que tratan las Reivindicaciones 1 a 5, que contiene medios de cultivo con combinaciones de componentes para alcanzar una concentración final entre 12 - 15 g/l de ingrediente activo, con una actividad insecticida contra *Spodoptera frugiperda* entre 45 - 87.5% de mortalidad frente a un estándar de dosis letal 50,
el cual es una fermentación que comprende las etapas de:

- preparar un inóculo que corresponde al 10% del volumen del inóculo
- activar el inóculo a partir de una cepa pura de *Bacillus thuringiensis* esporulada y conservada en un medio sólido
- mantener el inóculo por un tiempo no mayor a 16 horas,
- separar el medio de cultivo obtenido por filtración,
- secar la torta obtenida del ingrediente activo y someterla a una etapa de reducción de tamaño en un molino,
- agregar disolventes y/o coadyuvantes de formulación.

7. El procedimiento de conformidad con la Reivindicación 6, que se caracteriza por obtener entre 12 y 15 gramos de ingrediente activo por litro de fermentación, del cual una cantidad cercana al 95% corresponde al agente de control biológico descrito en las Reivindicaciones 1 a 5.

8. El procedimiento de conformidad con la Reivindicación 8, que se caracteriza por utilizar como fuente de carbono en la fermentación melaza en concentraciones entre 10 y 20 gramos por litro y como fuentes de nitrógeno emplea jarabe de matz y harina de soya en concentraciones de 5 a 10 g/L y 10 a 20g/L respectivamente.

9. El procedimiento de conformidad con la Reivindicación 6, en donde se emplean como condiciones ambientales para la fermentación temperaturas entre 28 y 32 grados centígrados, coeficientes volumétricos de transferencia de oxígeno entre 18 y 80 minutos a la menos uno (min^{-1}), pH variando entre 6,5 y 8,8, velocidades de agitación entre 90 y 800 revoluciones por minuto y concentraciones de oxígeno disuelto entre el 10 y el 100 por ciento del valor de la concentración de saturación de oxígeno en el medio de cultivo.

10. Un agente de control biológico de conformidad con las reivindicaciones 1 a 5, que adicionalmente contiene talco como agente lubricante, melaza deshidratada como agente de granulación, caolín como agente diluyente, y polímero natural como estabilizante.

11. El agente de control biológico de conformidad con la reivindicación 10, que se caracteriza porque el talco empleado se encuentra en una concentración entre el 60 y el 80%, el caolín entre el 10 y el 30%, la melaza entre 3 y el 12 %, el polímero natural entre el 0,5 y el 1.2% y la proteína o espesa en una concentración entre el 6 y el 10%.

12. Un método de control de plagas agrícolas del género Lepidóptera caracterizado porque el agente de control biológico de que tratan las Reivindicaciones 1 a 5, se aplica en suspensión acuosa en una dosis efectiva en las áreas infestadas, logrando el control de tales plagas.

13. Un método de control de plagas agrícolas del género Lepidóptera de que trata la Reivindicación 12, que emplea dosis del agente de control biológico descrito entre 200 y 500 gramos por hm^2 .

Resumen

El propósito principal de esta invención es proveer un bioinsecticida, cuya formulación sólida seca esta basada en entomotoxinas de una cepa de *Bacillus thuringiensis*, identificada con el No. de depósito ATCC 202194, caracterizado por su alta actividad contra larvas de insectos del orden Lepidoptera, siendo elevada la capacidad de control de larvas del Insecto *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith. Su uso es práctico, económico y eficaz, con la ventaja adicional de ser ecológicamente seguro. La segunda cobertura de esta invención se relaciona con los procedimientos para la obtención del ingrediente activo constituido por entomotoxinas contenidas en un cristal y las esporas del microorganismo, abarcando los siguientes pasos: Fase 1: Fermentación con la cepa de *Bacillus thuringiensis* en un medio de cultivo desarrollado para este microorganismo. Fase 2: La recuperación del ingrediente activo constituido por la biomasa, o las esporas del microorganismo o las entomotoxinas producidas en la fase 1. Fase 3. Formulación del bioinsecticida, que abarca los siguientes pasos: adición secuencial de sustancias químicas secas y otros aditivos al ingrediente activo constituido por la biomasa, o a las esporas o a las entomotoxinas recuperadas y mencionadas en la fase 2. Fase 4: Adición de aditivos opcionales como dispersantes, adherentes y agentes protectores del material resultante de la fase 3.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SECRETARÍA GENERAL

24
Nº 9862

EL SECRETARIO GENERAL DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

HACE CONSTAR:

Que por Ley 66 de 1867 se creó la Universidad Nacional de Colombia.

Que la Ley 30 de 1992, otorgó facultades extraordinarias al Presidente de la República para reestructurar la Universidad Nacional de Colombia.

Que en virtud de esas facultades, se expidió el Decreto Número 1210 de 1993, "Por la cual se reestructura el régimen orgánico de la Universidad Nacional de Colombia".

Que según el Artículo 1º del Decreto 1210 de 1993, la Universidad Nacional de Colombia es un ente universitario autónomo del orden nacional vinculado al Ministerio de Educación Nacional, con régimen especial, de carácter docente e investigativo.

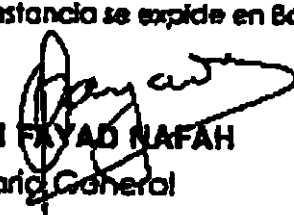
Que según el Artículo 3º del mismo Decreto la Universidad Nacional de Colombia es una persona jurídica autónoma, con gobierno, patrimonio y rentas propias.

Que de conformidad con el Artículo 13 del mismo Decreto el Rector es el representante legal de la Universidad y el responsable de su dirección académica y administrativa.

Que la Universidad Nacional de Colombia tiene su domicilio en la ciudad de Bogotá, Distrito Capital.

Que según Resolución No. 006 del 1º de abril de 2003 y Acta de Posesión No. 001 del 10 de abril de 2003, del Consejo Superior Universitario, el doctor MARCO ANTONIO PALACIOS ROZO, identificado con la cédula de ciudadanía número 17.107.936 de Bogotá, ejerce las funciones de Rector General de la Universidad Nacional de Colombia.

Esta constancia se expide en Bogotá, a los. 03 JUN. 2003



RAMÓN FAJAD NAFAH
Secretario General



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
CONSEJO SUPERIOR UNIVERSITARIO

RESOLUCIÓN NÚMERO 006 DE 2003
(Acta N°. 05 del 1°. de abril)

25
Nº 9862

"Por la cual se nombra al Rector General de la Universidad Nacional de Colombia para el periodo 2003-2006"

EL CONSEJO SUPERIOR UNIVERSITARIO

en uso de sus atribuciones legales, en particular las establecidas en el literal c) del artículo 12 del Decreto 1210 de 1993

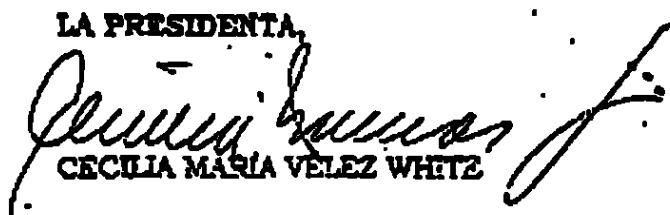
RESUELVE:

ARTÍCULO 1o. Nombrar al Doctor MARCO ANTONIO PALACIOS ROZO, identificado con la Cédula de Ciudadanía No. 17.107.936 de Bogotá, como Rector General de la Universidad Nacional de Colombia, para el periodo institucional comprendido entre el 10 de abril de 2003 y el 9 de abril de 2006.

ARTÍCULO 2o.- La presente resolución rige a partir de la fecha de su expedición.

Dada en Bogotá, a un (1) día del mes de abril de dos mil tres (2003).

LA PRESIDENTA,


CECILIA MARÍA VELEZ WHITE

LA SECRETARIA,


CONSUELO GOMEZ SERRANO

GUATEMALA Y COMPANIA

Radicación : 12074172 - 12074172

Folios: 2

Fecha RECIBO: 2003-09-01 17:26:01

Trámite : 12074172 > 1 REGISTRAR 411 PRESENTA

Dependencia: 12074172 DIVISION DE BIENES NACIONALES

RECIBO: 000174089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 62,145
FECHA : SEPTIEMBRE 1 DE 2003

RECIBO DE CONSERVACION DE BIENES

DEPOSITANTE	TIPO PAGOS	NOMBRE	CUENTA	NO. PAGOS	FECHA PAGOS	Vr. PAGOS
CAVELIER AMIGANO	CONSERVACION	RECIBO OFICIAL	650-00110-4	15/04/2003	01/09/2003	56.125,000.00

RECIBO DE CONCEPTO DE BIENES

CANT. REGISTRADA	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
------------------	----------	----------------

1 30005-01-01 SOLICITUDES

2 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN

400,000.00

TOTAL :

0

400,000.00



NOVA: CIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

[Handwritten signature]

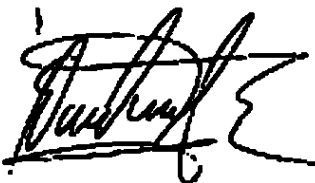
RECIBO DE CAJA OFICIAL AL EXPEDIENTE No. _____

Cdo. 12726-001-001-3

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION		
MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable:



SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Fecha: Radicación: 83878437 00382000 Folios: 1
 Fecha USDO: 2023-09-06 17:28:01
 Trámite: 002 PATENTES y REGISTRO/ 411 PRESEN
 Dependencia: 8520 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folio 28

2020
Bogotá DC

Doctor(a)
EMILIO FERRERO
Apoderado(a)

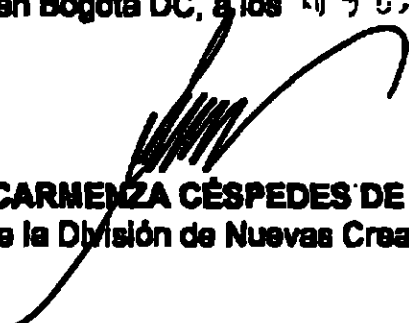
REFERENCIA:	Radicación No.	03-78437
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	416
	Oficio No.	1265
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

De acuerdo con lo previsto por el artículo 40 de la Decisión 486/00, la publicación en este caso se hará a partir del día 8 de marzo de 2005.

Cúmplase

Dado en Bogotá DC, a los 3 de marzo de 2005


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

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia