



No. 07-069903- -00000-0000

Fecha: 2007-07-10 16:18:01 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 77

FÓRMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1) SOLICITUD DE:

☒ Patente de invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2) SOLICITANTE
(71)

Nombre: WESTINGHOUSE
SAVANNAH RIVER COMPANY,
L.L.C.

Dirección: Savannah River Site,
Aiken, SC 29808 USA

Nacionalidad o domicilio: Aiken,
SC, Estados Unidos

Lugar de constitución: South
Carolina, USA

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT: ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

NÚMERO Cual

Teléfono: Fax:
E. Mail:

3) REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN

Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6
Bogotá D.C.

Teléfono: 6181088 Fax: 6350824
E. Mail: info@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT: ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

NÚMERO: 41.654.882
TP: 20824 CSJ

4) INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: 1. BRIGMON, Robin, L.; 2. STORY, Sandra; 3.
ALTMAN, Denis; 4. BERRY, Christopher, J.

Dirección: 1. 512 San Salvador Drive, North Augusta, SC 29841,
USA; 2. 8 Duchess Court, Travelers Rest, SC 29690 USA; 3.
4579 Mulberry Road Evans, GA 30809, USA; 4. 1724 Alpine
Drive, Aiken, SC 29803 USA

Nacionalidad o Domicilio: Todos los anteriores,
estadounidenses

5) PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/003405 Fecha: Enero 28, 2005

Publicación Internacional No. WO2006/085848 A1 Fecha: Agosto 17 de 2006

**6) Título (54) BIOCATALIZADOR DE AGENTE TENSIOACTIVO PARA CORRECCIÓN
DE ORGÁNICOS Y METALES PESADOS RESISTENTES**

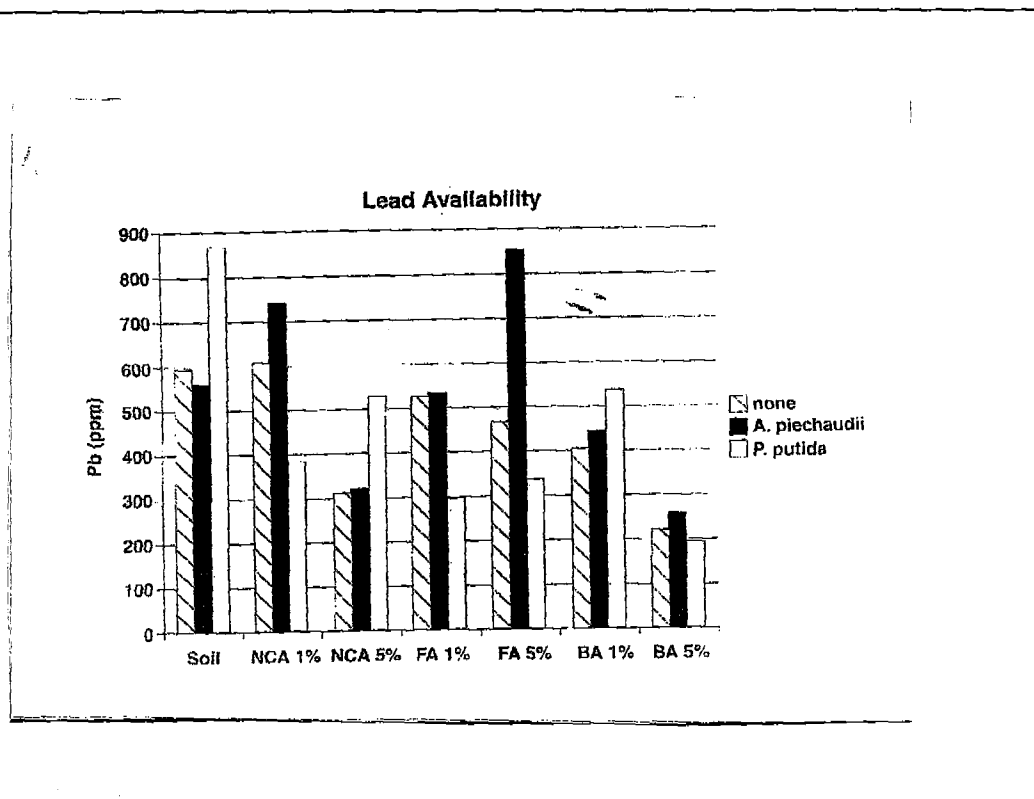
**7) Clasificación Internacional: C12N 1/20 C12S 1/00 B09C 1/10 C02F 3/34 C12R 1/01
A62D 3/00**

10)

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- ☐ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ 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
- ☒ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros:
 1. Reporte internacional de búsqueda

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:



12) Solicitud concesión de la patente.

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

[Handwritten signature]

P. 960

25/3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 54,744
FECHA : JULIO 5 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-069903-00000-0000

Fecha: 2007-07-10 16:18:01 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 77

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	66413818	05/07/2007	13,899,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
17 August 2006 (17.08.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/085848 A1

(51) International Patent Classification:

C12N 1/20 (2006.01) C02F 3/34 (2006.01)
C12S 1/00 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)
B09C 1/10 (2006.01) A62D 3/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2005/003405

(22) International Filing Date: 28 January 2005 (28.01.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(71) Applicant (for all designated States except US): WEST-
INGHOUSE SAVANNAH RIVER COMPANY, L.L.C.
[US/US]; Savannah River Site, Aiken, SC 29808 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BRIGMON, Robin,
L. [US/US]; 512 San Salvador Drive, North Augusta,
SC 29841 (US). STORY, Sandra [US/US]; 8 Duchess
Court, Travelers Rest, SC 29690 (US). ALTMAN, Denis
[US/US]; 4579 Mulberry Road, Evans, GA 30809 (US).
BERRY, Christopher, J. [US/US]; 1724 Alpine Drive,
Aiken, SC 29803-5743 (US).

(74) Agent: MULLINAX, J., Bennett; J. Bennett Mullinax,
LLC, P.O. Box 26029, Greenville, SC 29616-1029 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HN, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI, SM, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

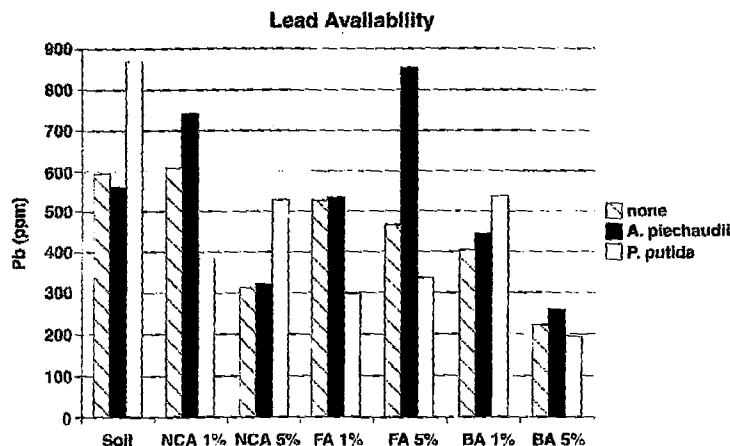
- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a
patent (Rule 4.17(ii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: SURFACTANT BIOCATALYST FOR REMEDIATION OF RECALCITRANT ORGANICS AND HEAVY METALS



(57) Abstract: Novel strains of isolated and purified bacteria have been identified which have the ability to degrade petroleum hydrocarbons including a variety of PAHs. Several isolates also exhibit the ability to produce a biosurfactant. The combination of the biosurfactant-producing ability along with the ability to degrade PAHs enhances the efficiency with which PAHs may be degraded. Additionally, the biosurfactant also provides an additional ability to bind heavy metal ions for removal from a soil or aquatic environment.

WO 2006/085848 A1

SURFACTANT BIOCATALYST FOR REMEDIATION
OF RECALCITRANT ORGANICS AND HEAVY METALS

STATEMENT AS TO RIGHTS TO INVENTIONS MADE UNDER FEDERALLY
SPONSORED RESEARCH AND DEVELOPMENT

This invention was made with Government support under Contract No. DE-AC09-96SR18500 awarded by the United States Department of Energy. The Government has certain rights in the invention.

FIELD OF THE INVENTION

This invention is directed towards bacterial strains useful for bioremediation and processes for using the bacterial strains. In particular, it relates to unique bacterial isolates that can degrade polyaromatic hydrocarbons (PAHs) and methods to use these novel bacterial strains for bioremediation. Remediation of lead by reducing bioavailability has also been demonstrated by one of the strains indicating dual use for organic and inorganic remediation.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Various scientific articles and patents are referred to throughout the specification. These publications are incorporated herein by reference to describe the state of the art to which this invention pertains and to provide details on standard methodologies and apparatuses which may be useful in practicing various embodiments of the present invention.

Polyaromatic hydrocarbons (PAHs) are widespread, common pollutants particularly found in association with oil refineries, certain refined petroleum products, petroleum storage locations, and petroleum spill sites. High levels of PAHs are associated with mutagenic and carcinogenic effects in humans and pose a high risk for migration to and pollution of soil and ground water sources. As a result, there has been considerable interest in techniques and processes which will degrade PAHs and related petroleum products to remediate the environment. The uses of biological agents to treat PAHs are well known within

the art. US Pat. No. 6,503,746 to Daane describes bacterial strains in the family *Bacillaceae* which are used in PAH remediation efforts.

US Pat. No. 3,616,204 to Linn discloses inoculating contaminated soil with cultures of microorganisms known to degrade the unwanted contaminants. The procedure described in Linn additionally involves introducing nutritional supplements to increase the soil remediation efficiency.

US Pat. No. 5,100,455 to Pickard discloses using indigenous microflora and fauna in combination with humic substrates to biologically treat soil contaminants including petroleum associated hydrocarbons.

US Pat. No. 4,849,360 to Norris discloses a bioreactor for treating petroleum contaminated soil in which air is forced through the contaminated soil to facilitate the bioremediation. The bioreactor uses indigenous microflora which are supplemented with phosphorus and nitrogen nutrients.

While a variety of PAH-degrading bacteria are known and have been utilized in various applications for remediation, there remains a need for improvement in the art in terms of identifying new and useful species having novel properties which are effective for the rapid degradation of petroleum pollutants. Further, there remains a need for improvements directed to the field of metal remediation such as by reducing the bioavailability of metal present within contaminated soils, metal-containing waste streams, and industrial process materials.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to methods for the degradation of petroleum pollutants including polyaromatic hydrocarbons (PAHs). Additionally, the present invention relates to a biotreatment process which enhances the removal of heavy metals from soil. The present invention uses isolated and purified bacterial strains of bacterial isolates from an oil refinery field. Certain of the isolates having a further ability to produce useful biosurfactants.

It is one aspect of at least one of the present embodiments of the present invention to provide isolated bacterial strains that produce biosurfactants under *in situ* and *ex situ* remediation conditions. The innate ability of the isolated and

X

purified bacterial strains to produce biosurfactants contributes to the remediation properties of the bacteria. The biosurfactant provides increased solubility of PAHs and access of the bacteria to the PAHs, thereby increasing the efficiency of the bioremediation by the bacteria strains. The biosurfactant can also reduce soil
5 Pb bioavailability and is believed to have utility in bioremediation of other metal contaminants which also respond to surfactant treatments.

An additional aspect of at least one of the embodiments of the present invention is related to isolated and purified strains of bacteria in which the surfactant producing properties contribute to enhanced solubilization of petroleum
10 and petroleum-derived products. The biosurfactants increase the solubilization of the petroleum products which promotes the aqueous flushing or removal of petroleum products associated with biosurfactant aggregates such as micelles and related structures. Further, the biosurfactants also increase the bioavailability of petroleum products that enhance the microbial ability to degrade
15 contaminants. The enhanced bioavailability is beneficial to the isolated and purified strains as well as other beneficial microorganisms present in the contaminated substrate.

It is yet another aspect of at least one of the embodiments of the present invention to provide for strains of isolated and purified bacteria which degrade 2-
20 to 3-ringed low molecular weight PAHs such as naphthalene, phenanthrene, and fluoranthene along with PAH degradation intermediates.

It is yet a further aspect of at least one of the embodiments of the present invention to provide for a strain of isolated, purified bacteria which degrades 4-
ring and higher molecular weight PAHs including pyrene and fluoranthene.
25 Typically, the 4-ring and higher PAHs are much more persistent in the environment and resistant to degradation compared to low molecular weight PAHs. Accordingly, the ability to provide strains of bacteria which degrade 4-ring and higher high molecular weight PAHs is significant.

The PAH degradation intermediates may further function as metal
30 chelators. This chelating activity or metal complexation may assist remediation in waste containing both PAHs and metals. Additionally, at least some of the bacterial strains identified herein have an ability to degrade several different

X

8

types of PAHs (including 2-, 3-, and 4-ring PAHs) in addition to the ability to degrade phenanthrene.

It is yet another aspect of at least one of the embodiments of the present invention to provide strains of isolated and purified bacteria having surfactant
5 properties useful in the removal of metals from contaminated soil and substrates. The isolated and purified strains of bacteria produce biosurfactant monomers. The biosurfactant monomers are produced in sufficient quantity that the monomers aggregate into three-dimensional structures including micelles. The biosurfactant micelles define polar head groups which bind with metal ions in the
10 soil. The micelles, containing the metal ions, can be removed by aqueous suspensions or flushing, thereby lowering the metal ion content of the substrate. The resulting removed metals, contained within the biosurfactant micelles, are then more easily separated and concentrated for efficient disposal or storage.

It is yet another aspect of at least one of the present embodiments of the invention to provide for isolated and purified cultures of bacteria which produce
15 biosurfactants under constitutive conditions, the isolated strains being further able to degrade PAHs during bioremediation conditions.

It is yet another aspect of at least one of the present embodiments of the invention to provide for isolated and purified strains of bacteria having the ability
20 to degrade a broad range of different types of PAHs under bioremediation conditions.

It is yet another aspect at least one of the present embodiments of the invention to provide for isolated and purified strains of bacteria having an ability to bring about a general reduction of total petroleum hydrocarbons (TPH). In
25 addition, the ability of certain of the isolates to produce a biosurfactant during bioremediation conditions increases the bioavailability of petroleum hydrocarbons to other microorganisms that may be present within the contaminated soil or other waste product.

It is yet another aspect of at least one of the present embodiments of the invention to provide for isolated and purified strains of bacteria having the ability
30 to degrade PAHs along with an ability to produce a biosurfactant during bioremediation conditions.

8

9

It is yet another aspect of at least one of the present embodiments of the invention to allow for isolated and purified strands of bacteria having the ability to bring about a general reduction of lead availability which may be present within soil or lead containing waste streams. The biosurfactant produced by one or
5 more of the isolates may be used in combination with inorganic phosphates to reduce the bioavailability of lead within a contaminated substrate such as soil.

Other aspects of at least one embodiment of this invention include a process of bioremediation of petroleum pollutants from a contaminated environment comprising the steps of providing a supply of a substrate
10 contaminated with a petroleum pollutant; introducing into the supply of contaminated substrate at least one bacteria isolate which metabolizes constituents of the petroleum pollutant and which further produces a biosurfactant; and, providing adequate nutrients for a treatment time sufficient for the petroleum pollutant utilizing isolate to degrade the petroleum pollution to a
15 target concentration of 100 ppm TPH or less.

These and other aspects of the invention are provided by biologically pure bacterial strains for bioremediation of petroleum products and PAHs comprising isolates selected from the isolates identified in Table 2.

These and other features, aspects, and advantages of the present
20 invention will become better understood with reference to the following description and appended claims.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 sets forth a graph showing the bioavailability of lead with respect
25 to various additives and biological isolates with respect to highly contaminated soil (900mg Pb/Kg soil).

Figure 2 is a graph setting forth the changes in total organic matter within soil samples following a treatment protocol.

30

DESCRIPTION OF PREFERRED EMBODIMENT

A fully and enabling disclosure of the present invention, including the best mode thereof, to one of ordinary skill in the art, is set forth more particularly in the

a

remainder of the specification. Reference now will be made in detail to the embodiments of the invention, one or more examples of which are set forth below. Each example is provided by way of explanation of the invention, not limitation of the invention. In fact, it will be apparent to those skilled in the art that various modifications and variations can be made in the present invention without departing from the scope or spirit of the invention. For instance, features described as part of one embodiment can be used on another embodiment to yield a still further embodiment. Thus, it is intended that the present invention cover such modifications and variations as come within the scope of the appended claims and their equivalents. Other objects, features, and aspects of the present invention are disclosed in the following detailed description. It is to be understood by one of ordinary skill in the art that the present discussion is a description of exemplary embodiments only and is not intended as limiting the broader aspects of the present invention, which broader aspects are embodied in the exemplary constructions.

The present invention is directed to bacterial isolates obtained from a century-old Czechowice oil refinery in Poland. The aged sludge from the oil refinery is characterized by its acidic (pH 2) properties and contains high concentrations of PAHs along with heavy metals. Additionally, the sludge is characterized by the presence of spent catalysts, asphaltics, diatomaceous earth, silica gel, and coal fly ash, all containing high background levels of heavy metals (Pb/Cd/Zn) which have been previously deposited at the site. The collection site is from an area having approximately 120,000 tons of waste material deposited in unlined lagoons 3 meters deep covering an area of 3.8 hectares. A total of 45 bacteria, 68 fungi, and 7 yeast species were isolated from the sludge on an acidic minimum medium (pH 4) exposed to naphthalene vapor.

A subset of isolates was characterized by traditional taxonomic criteria, BIOLOG™, and analysis of SSU rRNA genes. The bacterial groups included *Proteo* bacteria, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, and *Alcaligenes* species. Further characterizations of the isolates may be seen in reference to the information provided in Tables 1 and 2. The BIOLOG™ characterization protocols using minimal nutritional factors along with various organic substrates of interest are

described in reference to the publication *Use of BIOLOG™ Technology for Hazardous Chemical Screening, Microbiological Techniques* 18:329-347, 1993, and which is incorporated herein by reference.

5 A total of 45 bacteria, 68 fungi, and 7 yeast species were isolated using a naphthalene vapor acidic mineral salts basal growth medium. While not separately set forth, it is noted that many of the isolates have the ability to metabolize catechol and the bacterial isolates were characterized by the ability to degrade PAHs. Additionally, it is noted that the isolated and purified organisms having the ability to degrade PAHs also have the ability to degrade a variety of
10 petroleum pollutants associated with measurements of total petroleum hydrocarbons.

As set forth below in Table 1, three bacterial species designated CZORL1B, BP20, and CZORL1Bsm, and which correspond to isolates 1 through 3 in Table 2, were observed to produce a surfactant when grown in a minimal
15 medium containing naphthalene, phenanthrene, or fluoranthene. Nine additional strains identified in Table 1 were observed to degrade a range of PAHs indicating the isolates have a catalytic or enzymatic ability to degrade the contaminants although the additional isolates do not demonstrate an ability to produce a surfactant.

20 The above identified bacterial strains are grown and maintained on 1 percent peptone, trypticase, yeast extract, glucose (PTYG) plates. The bacteria were grown aerobically at 30° C and maintained on a minimal medium at 4° C or long-term storage in a frozen medium maintained at -70°C or in liquid nitrogen (-196° C).

25 The identification of the bacteria was made using rDNA or Fatty Acid Methyl Esters (FAME) identification protocols as set forth in the publication *Bacterial Evolution, Microbial Reviews* 51:221-271 by C. R. Woese (1987) and which is incorporated herein by reference. Deposits of isolates 1 through 12 as identified in Table 2 were deposited with the American Type Culture Collection
30 (ATCC), Rockville, Maryland, on October 9, 2003, and have the indicated ATCC designation numbers. The deposit forms accompanying each of the isolate deposits as submitted to the ATCC are incorporated herein by reference.

12

Assayed for the following characteristics: ^a									
Isolate	Indigo	meta fission	NAP	PHE	ANT	FLE	ACE	FLA	PYR
5	Isolated on naphthalene vapor^b								
	BAA-1 (PB19)	indigo							
	BAA (PB16)	indigo							
	BP19A(PB17)	indigo							
10	BAB (PB14)	indigo							
	CZORL1B (KN-1) ^c	meta fission							
	BP20 CZORL1B (KN-2) ^c	meta fission							
	CZORL1Bsm (KN-3) ^c	meta fission							
	PB15	indigo							
									NAP (was designated BP20)
15	Isolated with phenanthrene overspray^d								
	BPA	indigo		PHE	ANT	FLE			
	BPB	indigo		PHE	ANT	FLE			
	BPC	indigo		PHE	ANT	FLE			
20	BPD	indigo		PHE	ANT	FLE			
	BPE	indigo		PHE	ANT	FLE			
	BPB	indigo	meta fission	NAP	PHE	ANT	FLE	ACE	FLA
	BPG	indigo	meta fission						PYR
	BPH	indigo	meta fission						
	BPI	indigo		PHE	ANT	FLE		FLA	PYR
25	BPJ	indigo			ANT	FLE			
	BPK			PHE	ANT	FLE			
	BPL	indigo		PHE		FLE			
	BPM	indigo		PHE	ANT	FLE			PYR
30	BPB	indigo		PHE	ANT	FLE		FLA	
	BPO	indigo		PHE	ANT	FLE			
	BPP	indigo		PHE					
	BPQ	indigo		PHE	ANT	FLE			
35	BPR	indigo	meta fission	PHE					

a Abbreviations; indigo, production of indigo from indole; meta fission, 2,3 catechol dioxygenase activity; NAP, naphthalene; PHE, phenanthrene; ANT, anthracene; FLE, fluorene; ACE, acenaphthene; FLA, fluoranthene; PYR, pyrene.

b Bacteria isolated on agar plates exposed to naphthalene.

c Bacteria produced biosurfactant

d Bacteria isolated on agar plates exposed to phenanthrene crystals.

Table 1
Dihydroxylating dioxygenase and 2,3 catechol dioxygenase activity and PAH
degradative range of isolates.

12

13

Isolate	Identification	ATCC Accession Number
1) CZOR-L1B (KN-1)	<i>ALCALIGENES-PIECHAUDII</i> SRS	PTA-5580
2) BP-20 (KN-2)	<i>RALSTONIA PICKETTII</i> SRS.	PTA-5579
3) CZOR-L1Bsm(KN-3)	<i>PSEUDOMONAS-PUTIDA</i> BIOTYPE B SRS	PTA-5581
4) BPB	<i>FLEXIBACTER</i> CF. <i>SANCTI</i> SRS	PTA-5570
5) BPC	<i>PSEUDOMONAS FREDRIKSBERGENSIS</i> SRS	PTA-5571
6) BPE	<i>STAPHYLOCOCCUS WARNERI</i> . LMG 19417 SRS	PTA-5572
7) BPF	<i>SPHINGOMONAS</i> SRS	PTA-5573
8) BPH	<i>SPHINGOMONAS</i> SP. S37 SRS	PTA-5574
9) BPI	<i>PHYLOBACTERIUM</i> SRS	PTA-5575
	(α <i>PROTEOBACTERIUM</i> TA-A1)	
10) BPJ	<i>SERRATIA FICARIA</i> SRS	PTA-5576
	(α <i>PROTEOBACTERIUM</i> TA12-21)	
11) BPK	<i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> SRS	PTA-5577
12) BPL	<i>RHIZOBIUM</i> SP. SDW045 SRS	PTA-5578

Table 2.

Isolate identification.

The above identified bacteria isolates have been established as distinct species. Each of the identified isolates has PAH-degrading properties and have demonstrated an ability to reduce TPH in soil as well. In addition, certain isolates have the ability to produce a biosurfactant. Each isolate is believed novel, based upon the rDNA characterization and variations noted in Tables 1 and 2 with respect to physiological growth characteristics.

The isolates 1-3, ATCC PTA-5580(*Alcaligenes piechaudii* SRS); ATCC PTA-5579, (*Ralstonia pickettii* SRS); and ATCC PTA-5581(*Pseudomonas putida* Biotype B SRS) identified above, all demonstrate the ability to produce a biosurfactant, the formation of which was noted during culturing conditions. The biosurfactant exudate was evaluated for each isolate and determined to have a surface tension altering property consistent with a surfactant. Isolates 4-12 all demonstrate the ability to biodegrade a variety of PAHs (Table 1). As set forth in Example 1 below, the use of a consortium of the twelve isolates identified in Table 2 to remediate petroleum hydrocarbons contained in soil in a bioreactor remediation study results in visible quantities of biosurfactants being produced under the bioremediation conditions.

The ability of certain of the isolates to produce bioreactants is believed to enhance remediation through several different mechanisms. The production of

13

14

the biosurfactant increases the biological availability of PAHs and other hydrophobic petroleum compounds. The increased biological availability includes the ability of the produced surfactant to solubilize and make available to the isolate the PAHs and other petroleum compounds. As such, the isolates' ability to produce surfactants increases the efficiency of the isolates to degrade and metabolize PAHs.

As noted in Example 1, the consortium of isolates used results in visible quantities of surfactants being produced within the soil. Biosurfactants are generally known to have a chemistry consisting of a polar head and a non-polar tail. In aqueous solutions, biosurfactants serve to reduce liquid surface tension and to facilitate the formation of an emulsion between liquids of different polarities. This ability facilitates the biosurfactants' usefulness in that hydrophobic, non-polar tail regions of the biosurfactants and biosurfactant micelles may trap oils and other petroleum compounds. The trapped oils and petroleum compounds have greater bioavailability to bacteria for biodegradation. Additionally, micelles containing trapped oils and petroleum compounds may be periodically removed or flushed from the system, thereby providing an ability to further isolate and separate petroleum compounds from the soil substrate.

Additionally, micelles formed by the biosurfactants promote the removal of metals from the soil. The hydrophilic polar head groups of micelles will bind metal and metal ions present within the soil. Once bound, the soluble nature of the micelles allows the micelles and bound metals to be collected. Once collected, the now concentrated volume of micelles and contained metals can be further treated to separate the metals from the biosurfactant. In addition, it has been found that selected isolates which produce biosurfactants can be used to reduce the bioavailability of certain metals such as lead present within the soil. For certain remediations, the surfactants are not used to remove a contaminant, but rather provide a method of long term stabilization of a contaminated site. Stabilization includes reducing the bioavailability of lead along with preventing the migration of lead in surface runoff to adjacent, uncontaminated sites and groundwater.

14

Example 1

A mobile bioreactor was constructed and was supplied with a four ton volume of soil contaminated with low level cesium-137 and 26,000 ppm petroleum hydrocarbons. The contaminated soil was weathered material
5 obtained from the Savannah River Site (Aiken, SC). The source and make up of the petroleum products is unknown but believed to be a mixture of used motor oil and diesel fuel.

The soil was amended with a 7% bulking agent of aged compost. For each isolate, a three liter culture in log growth phase was added and distributed
10 within the four tons of mixed waste soil. The bioreactor is equipped with a raised, secondary, perforated floor having bottom feed aeration lines which provide a continuous supply of ambient air to the bioreactor. Additionally, periodic nutrient supplements of nitrogen, potassium, and phosphorus fertilizers (10-10-10) were applied to enhance the biological activity within the bioreactor. Influent and
15 effluent water couplings were attached. Air compressors, vacuum pumps, and a liquid pump were used to control and regulate the air and liquid flows through the bioreactor and control moisture content in the bioreactor.

The presence of low level cesium-137 limited the number and types of sampling techniques used to monitor the bioreactor and required the use of
20 HEPA filtering with the air effluent couplings. Periodic CO₂ measurements indicated that, in a five-month interval, 121 pounds of petroleum products were degraded. Based upon the CO₂ measurements, it is conservatively estimated that the bioremediation process removed 16,000 mg/kg of petroleum contaminants from the soil during the five-month evaluation interval. It was
25 demonstrated that the 4 ton volume of contaminated soil had the TPH reduced to 45 ppm after 20 months of treatment. The ability of the isolates to degrade petroleum and other hydrocarbon products while producing biosurfactants offers enormous advantages in terms of efficiency and versatility of treatment protocols. For instance, it is believed that for soils contaminated solely with petroleum and
30 petroleum by-products, the present isolates may, either individually or as a consortium, be used with conventional bioremediation techniques to improve the efficiency of degradation. As described above, the action of the biosurfactants

16

creates a greater zone of petroleum solubility for each individual bacterium. As a result, a greater availability of petroleum products occurs. Further, to the extent the isolates form aggregate colonies, biofilms, or biosheets within portions of the soil, the surfactants are believed to substantially increase the bioavailability of the petroleum substrates for the bacterial aggregates. At the same time, the surfactants also increase the solubilization of heavy metals that may be present and provide an ability to reduce the heavy metal concentration by removal of the produced surfactants.

As seen in Example 1, the consortium of isolates provides for a bioremediation process which can achieve significant reductions in petroleum from contaminated soil. This property is particularly useful with respect to formulating disposal strategies for mixed waste in which petroleum contaminated soil and low-level radioactive material are present together. Currently, soil contaminated with low-level radioactive waste and having additional petroleum contaminants must be below regulatory limits of 1 ppm for BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, xylene, and 100 ppm TPH (Total Petroleum Hydrocarbons) before the soil can be classified and disposed of as a low-level radioactive waste. The cost of disposing of soil which meets the definition of a low-level radioactive waste is approximately U.S. \$262 per cubic meter per year. In contrast, soil containing both low-level radioactive material and petroleum contamination in excess of the regulatory limits must be stored as a mixed waste product. The cost of storage of mixed waste soil is approximately U.S. \$10,165 per cubic meter of soil per year based on yearly costs alone. The ability to treat mixed waste soils and thereby remove substantial levels of petroleum contaminants is of critical importance. Removing sufficient petroleum contaminants from a mixed waste soil allows the waste to be disposed of as a low-level radioactive waste. The resulting cost is 38 times lower than the storage cost of a mixed waste.

The use of the present inoculants is further advantageous in that, unlike some prior art techniques, the volume of amendments to the soil is kept at a minimum. Keeping the volume of soil amendments to a minimum reduces the eventual disposal costs, particularly for soil containing low-level radiation.

16

12

The present isolates are also believed useful for *in situ* remediation projects. The consortium of isolates may be supplied to contaminated soil using any number of conventional techniques. As needed, nutritional supplements along with the supply of oxygen in either a physical or chemical form facilitates the bioremediation activity. Given the isolates' ability to degrade PAHs as well as the desired ability to degrade petroleum hydrocarbons generally, *in situ* remediation using the isolates is advantageous. Additionally, the ability of certain of the isolates to produce a surfactant (biosurfactant) during soil growth conditions makes the use of certain isolates more beneficial. As noted, the biosurfactant enhances the ability to physically entrap petroleum products and heavy metals as well as providing for increased solubilization and access of petroleum hydrocarbons to both the bacterial isolates as well as native microorganisms present within the soil environment.

The use of biosurfactants can bring about useful results in a variety of contaminated substrate conditions. For instance, it is known in the art that biosurfactants have useful metal-complexing properties that can both reduce metal toxicity while allowing enhanced biodegradation of other waste in sites contaminated with both organic and metal pollutants. One such publication, entitled "A Rhamnolipid Biosurfactant Reduces Cadmium Toxicity during Naphthalene Biodegradation", by Sandrin et al, *Applied and Environmental Microbiology*, Oct. 2000, pp 4585-4588, and which is incorporated herein by reference, describes the ability of biosurfactants to reduce metal toxicity in co-contaminated systems having both organic and metal pollutants.

An additional publication, "Microbial Surfactants and their use in Field Studies of Soil Remediation", by N. Christofi and I.B. Ivshina, published in the *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 93, pp. 915-929, and which is incorporated herein by reference, provides a useful overview of the role of surfactants in soil remediation applications. Biosurfactants can, under appropriate conditions, provide useful benefits with respect to organic solubilization, organic degradation, metal solubilization, and metal isolation.

Certain isolates disclosed herein have demonstrated an ability to reduce the bioavailability of lead within a contaminated soil. Lead contaminants in soil

17

12

may occur as a result of numerous activities including mining, presence of lead-based paint, ordnance from firing ranges, contamination from gasoline and petroleum additives, lead battery recycling centers, and residue from lead-based explosives. Lead exposure is associated with numerous disorders human
5 nervous and reproductive systems. Lead usually enters the body through inhalation or ingestion of lead-containing dust.

It is known that lead containing soils can be treated with the use of soil amendments to reduce the bioavailability of lead. Some such amendments include apatites, HR, and other calcium phosphate containing materials. Apatites
10 are known to bind with lead and other metals within soil and thereby reduce the tendency of lead to migrate. The binding interaction also reduces the bioavailability of lead. Selected surfactants may also be used to reduce the bioavailability of lead as demonstrated by isolate 3.

An evaluation of isolate 1 (*Alcaligenes piechaudii*) and isolate 3
15 (*Pseudomonas putida*) was conducted to see if beneficial reductions in lead bioavailability could be obtained by incorporating the biosurfactant producing isolates along with other soil amendments in lead-containing soil. The lead contaminated soil was obtained from a small arms firing range where the lead bullets had accumulated in the soil over a number of years. 50 gm samples of
20 contaminated soil were mixed with 3 different calcium phosphate amendments. The calcium phosphate amendments included a naturally occurring rock calcium phosphate from North Carolina (USA) hereinafter designated as NCA, a naturally occurring rock calcium phosphate from Florida (USA) hereinafter designated FA, and a biological apatite obtaining from ground fish bones, hereinafter designated
25 as BA. 10% and 5% by weight additions of the NCA, SA, and BA were made to the respective samples of the lead contaminated soils. Additionally, certain of the amended soil samples were further treated by the introduction of 5 ml samples of the isolate number 1, *Alcaligenes piechaudii* in a 1% PTYG nutrient broth. Density of the isolate was 3.11×10^8 cells per ml. Additional samples were also
30 treated with isolate number 3 *Pseudomonas putida* using a similar 5 ml addition and a density of 3.43×10^8 cells per ml containing samples for the microbial amendment included a 1% PTYG sterile broth. The contaminated soil samples

12

19

and various amendments and cultures were mixed together in sealed containers which were connected by tubing to a Micro-Oxymax Respirometer (Columbus Instruments, Columbus, OH) for determination of metabolic rates includes oxygen consumption and CO₂ evolution. Microbial density was obtained through
5 conventional plating techniques for determining colony and sample density.

As seen in the results set forth in Figure 1, the addition of isolate 3 achieves a significant decrease in lead bioavailability as measured through a toxicity characteristic leaching procedure (TCLP) using protocols identified in the U.S. Environmental Protection Agency Method 6010. The microbial amendments
10 brought about significant reductions in lead bioavailability when used with the 5% soil amendments of NCA or BA. Given the low cost of a BA product and uniformity of the biological apatite, it is believed that use of the biological apatite in combination with the isolate 3, or combinations thereof, offers an excellent reduction for the bioavailability of lead within soil.

15 The combination of the biological apatite with the naturally producing biosurfactants from isolate 3 bacteria brings about other noted improvements to the contaminated soil samples. It is noted that an increase in metabolic rates as measured by oxygen consumption and carbon dioxide production increased along with the overall microbial density. As seen in reference to Figure 2, the
20 total organic matter is significantly increased following a 114 hour incubation period for samples using the *P. putida* isolate in combination with the biological apatite at both 1% and 5% incorporation levels. The increase in total organic matter reflects the increase in total microbial population attributable to the increase nutrient supply of the biosurfactants. Increased availability of
25 micronutrients results in enhanced biological activity resulting in an increase in organic matter. While the most significant results can be seen with the biological apatites in combination with the *P. putida* isolate strain, various combinations of other apatites suggests that one or more isolates may be used to increase total microbial activity.

30 While not separately reported, it is noted that the increases in organic matter as noted in Figure 2 correlated with significant increases in soil pH, O₂

19

20

consumption, CO₂ production, as well as the reduced lead bioavailability as noted in Figure 1.

It is believed that the use of the isolates described above bring about a decrease in bioavailability of lead due at least in part to the surfactant producing properties of the isolates. The biosurfactants are believed to accentuate the inherent tendencies of the apatite with respect to increasing metabolic rates, nutrient availability, and favorable increases in pH and lowering of lead bioavailability. As previously described, the biosurfactants bring about favorable soil conditions that improve nutrient conditions and availability of micronutrients for micro-organisms. The increase in biological activity and associated biomass within the soil is believed to further decrease the lead bioavailability. The *P. putida* activity of lowering soil lead bioavailability is synergistic with BA at the 5% concentration. The exponential increase in respiration rate, microbial density and increase in biomass is clear evidence that the activity is related to specific biological activity.

As noted in Figure 1, different surfactants have different results when applied to any particular apatite used as the inorganic additive. One could, through routine experimentation, evaluate the various isolates to determine the combination offering the desired improvements in lead bioavailability with respect to the given soil conditions, selected apatites and/or other additives used in the remediation procedure. The most useful combinations of additives and isolates can be selected to bring about the desired reduction in lead bioavailability.

As described previously in this application, the isolates are useful for reduction of PAHs as well as facilitating the removal and/or sequestration of mineral ions from contaminated soils and substrates. Accordingly, for contaminated soils and waste streams having a variety of contaminants including PAHs, metal ions, and other metals such as lead, use of one or more of the present isolates, including isolates producing a biosurfactant, can effectively treat multiple contaminants within a given site.

While the above examples were given in the context of remediation of a highly contaminated soil (900mg Pb/Kg soil), it is believed that the utility of individual isolates or combinations of isolates is not limited to soil remediation

20

efforts *per se*. For instance, it is believed that the isolates producing biosurfactants can be used as part of a waste stream treatment process of a mine or industrial facility where heavy metals, metal ions, lead, copper, cadmium, zinc, other metals, and other contaminants are generated. Many sites (i.e.,
5 landfills and brownfields) have lead contamination in the low ppm concentration (1-10mg Pb/Kg soil) that is still of health concern due to the potential toxicological impact and future land use. The use of inoculants which are incorporated into an initial waste stream and which include one or more of the above isolates can bring about a reduced volume of contaminants within the waste stream and
10 introduce a microbial flora population which can persist as part of a longer term treatment protocol for generated and/or stored waste. For instance, mine tailings can be initially treated to reduce certain contaminants prior to being deposited onto a disposal area. Afterwards, the presence of the isolates within the mine tailings can be used to advantage by further treatment designed to promote the
15 useful biological activity so as to bring about a continuing reduction and/or stabilization of the contaminants present in the waste stream.

It is believed that similar results can be used in a variety of industrial waste streams where the isolates can be used as part of a biological treatment process to initially reduce the level of contaminants and to provide a microbial population
20 which can be used as part of a longer term treatment for the stored or deposited waste streams.

Although preferred embodiments of the invention have been described using specific terms, devices, and methods, such description is for illustrative purposes only. The words used are words of description rather than of limitation.
25 It is to be understood that changes and variations may be made by those of ordinary skill in the art without departing from the spirit or the scope of the present invention, which is set forth in the following claims. In addition, it should be understood that aspects of the various embodiments may be interchanged, both in whole and in part. Therefore, the spirit and scope of the appended claims
30 should not be limited to the description of the preferred versions contained therein.

20

THAT WHICH IS CLAIMED IS:

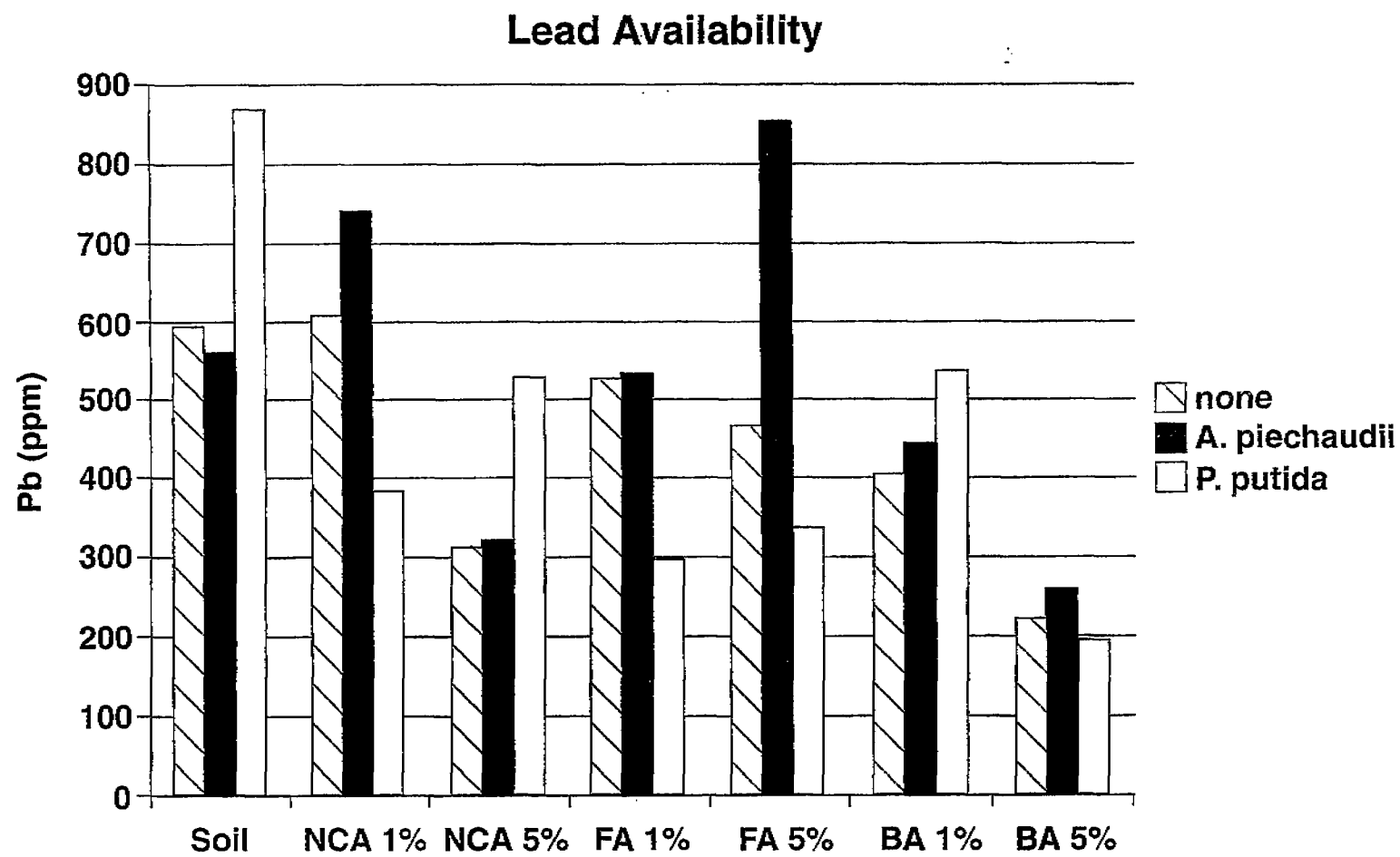
1. A biologically pure bacterial strain for bioremediation of petroleum hydrocarbons comprising an isolate selected from the group consisting of ATCC accession numbers PTA-5570, PTA-5571, PTA-5572, PTA-5573, PTA-5574, PTA-5575, PTA-5576, PTA-5577, PTA-5578, PTA-5579, PTA-5580, PTA-5581 and combinations thereof.
2. A process of bioremediation of petroleum pollutants from a soil environment comprising the steps of:
 - providing a supply of a contaminated soil having a petroleum pollutant;
 - introducing into said supply of contaminated soil at least one bacteria isolate which metabolizes constituents of the petroleum pollutant and which further produces a biosurfactant; and,
 - providing adequate nutrients for a treatment time sufficient for the pollutant utilizing isolate to degrade the petroleum pollution.
3. The process according to claim 2 wherein said concentration of petroleum pollutant within said soil is less than about 100 ppm total petroleum hydrocarbons after treatment with the at least one bacterial isolate.
4. A process of treating a mixed waste of soil contaminated with a heavy metal pollutant and a petroleum pollutant comprising the steps of:
 - providing a supply of a contaminated soil containing a heavy metal pollutant and a petroleum pollutant;
 - introducing into said supply of contaminated soil at least one bacterial isolate which metabolizes a constituent of the petroleum pollutant and which further produces a biosurfactant; and,
 - periodically removing a portion of the produced biosurfactant from said supply of soil, said biosurfactant containing therein either a portion of said heavy metals or said petroleum pollutants; and,
 - repeating said step of removing a portion of said surfactant until said heavy metal concentration is reduced to a target value.

28

5. The process according to claim 2 wherein said supply of a contaminated soil further contains a low-level radioactive waste.
6. The process according to claim 2 wherein said step of introducing an isolate further comprises adding an isolate selected from the group consisting of ATCC accession numbers PTA-5579, PTA-5580, and PTA-5581 and combinations thereof.
7. The process according to claim 4 wherein said step of introducing at least one bacterium isolate further comprises adding an isolate selected from the group consisting of ATCC accession numbers PTA-5579, PTA-5580, and PTA-5581 and combinations thereof.
8. A process of treating a soil containing low-level radioactive material and petroleum hydrocarbons comprising the steps of:
 - providing a supply of contaminated soil containing a radioactive waste and a petroleum hydrocarbon;
 - introducing into said supply of contaminated soil at least one bacterial isolate which metabolizes a constituent of the petroleum hydrocarbon and is selected from the group consisting of ATCC accession numbers PTA-5570, PTA-5571, PTA-5572, PTA-5573, PTA-5574, PTA-5575, PTA-5576, PTA-5577, PTA-5578, PTA-5579, PTA-5580, PTA-5581, and combinations thereof which metabolize a constituent of the petroleum hydrocarbons; and,
 - treating said supply of contaminated soil until a treated concentration of said petroleum pollutant is less than about 100 ppm total petroleum hydrocarbons.
9. The process according to claim 8 wherein said at least one bacterial isolate further comprises an isolate selected from the group consisting of ATCC accession numbers PTA-5579, PTA-5580, and PTA-5581, and combinations thereof.
10. The process according to claim 2 wherein said petroleum pollutant includes polyaromatic hydrocarbons.

11. The process according to claim 10 wherein said polyaromatic hydrocarbons further includes polyaromatic hydrocarbons selected from the group consisting of 2-ringed, 3-ringed, and 4-ringed polyaromatic hydrocarbons and combinations thereof.
12. The process according to claim 8 wherein said at least one bacterial isolate additionally produces a surfactant during bioremediation conditions.
13. The process according to claim 12 comprising the additional step of periodically removing a portion of the produced surfactant from said supply of contaminated soil.
14. The process according to claim 4 wherein said petroleum pollutant further includes polyaromatic hydrocarbons.
15. The process according to claim 14 wherein said polyaromatic hydrocarbons further includes polyaromatic hydrocarbons selected from the group consisting of 2-ringed, 3-ringed, and 4-ringed polyaromatic hydrocarbons and combinations thereof.
16. A process of treating lead contaminated soil so as to reduce the bioavailability of lead comprising:
- providing a supply of the lead contaminated soil;
 - providing a soil amendment in the form of an about 1% to about 5% or greater of a biological apatite;
 - further adding to said contaminated soil an inoculant selected from the group consisting of ATTC accession numbers PTA-5580, PTA-5581, and combinations thereof;
 - wherein said contaminated soil hereafter has a lower bioavailability of lead.

20

**FIG. 1**

25

25

RESULTS - Organic Matter

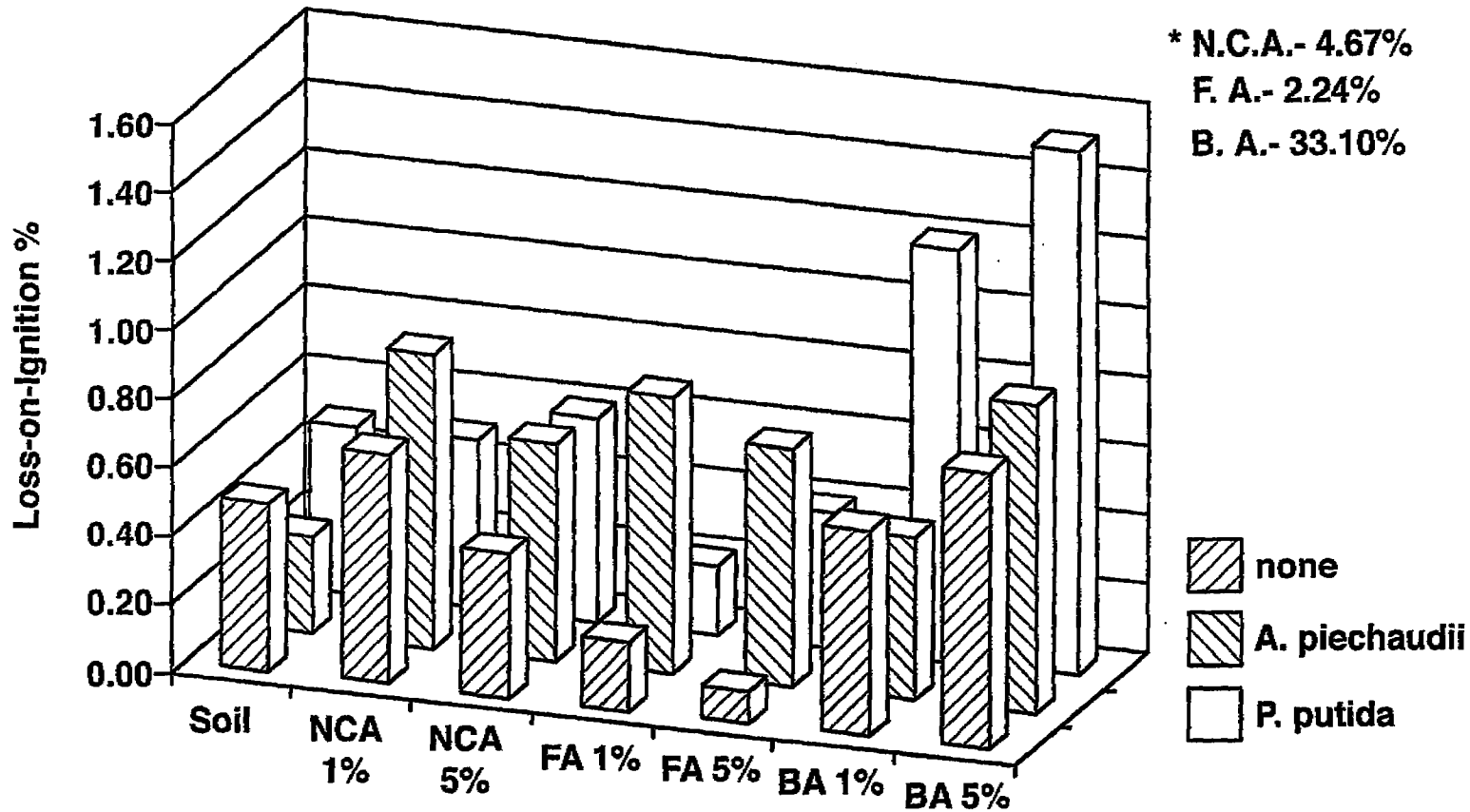


Figure 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US2005/003405

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N1/20 C12S1/00 B09C1/10 C02F3/34 C12R1/01
A62D3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12R B09C C02F A62D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, FSTA, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SINGLETON D ET AL: "Microbial diversity in an acidic refinery sludge" ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 101, 2001, page 637, XP009052807 & 101ST GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY; ORLANDO, FL, USA; MAY 20-24, 2001 ISSN: 1060-2011 the whole document -/-	1,8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 August 2005

Date of mailing of the international search report

08. 11. 2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Valcarcel, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US2005/003405

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PLAZA GRAZYNA ET AL: "Relationship between soil microbial diversity and bioremediation process at an oil refinery." ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA, vol. 52, no. 2, 2003, pages 173-182, XP009052781 ISSN: 0137-1320 the whole document	1,8
A	DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 2004-446832 XP002342187 BLOKHIN VA ET AL: "strain of bacterium Pseudomonas alcaligenes MEV used for the removal of petroleum and its products from soil, ground and surface water" --& RU 2 228 953 C ((BIOL-R) BIOL PREPARATIONS TOXIYOLOGY & HYGIENE) 20 May 2004 (2004-05-20) abstract	1,8
A	KORDA A ET AL: "Petroleum hydrocarbon bioremediation: Sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 48, no. 6, December 1997 (1997-12), pages 677-686, XP009052820 ISSN: 0175-7598 the whole document	1,8
A	DAGHER FADI ET AL: "Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial strains isolated from contaminated soils" CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, vol. 43, no. 4, 1997, pages 368-377, XP009052823 ISSN: 0008-4166 the whole document	1,8
A	WO 00/56668 A (PERRIELLO, FELIX, ANTHONY) 28 September 2000 (2000-09-28) the whole document	1,8
A	SALLEH ABU BAKAR ET AL: "Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution." INDIAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 2, no. 3, July 2003 (2003-07), pages 411-425, XP009052818 ISSN: 0972-5849 the whole document	1,8

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internationals

cation No

PCT/US2005/003405

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ANDREONI V ET AL: "Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils" CHEMOSPHERE, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 57, no. 5, November 2004 (2004-11), pages 401-412, XP004544270 ISSN: 0045-6535 the whole document	1,8
A	US 6 503 746 B1 (DAANE LORI ET AL) 7 January 2003 (2003-01-07) cited in the application the whole document	1,8
X	HAMANA KOEI ET AL: "Polyamine distribution profiles in newly validated genera and species within the Flavobacterium-Flexibacter-Cytophaga-Sphingobacterium complex" MICROBIOS, vol. 106, no. Supplement 2, 2001, pages 105-116, XP009052886 ISSN: 0026-2633 the whole document	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US2005/003405

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1, 8 (both partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

38

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1,8 (both partially)

A biologically pure bacterial strain having ATCC accession number PTA-5570 and method according to claim 8 involving the use of said bacterial strain.

2. claims: 1,8 (both partially)

As subject 1 but wherein the bacterial strain has the ATCC accession number PTA-5571.

3. claims: 1,8 (both partially)

As subject 1 but wherein the bacterial strain has the ATCC accession number PTA-5572.

4. claims: 1,8 (both partially)

As subject 1 but wherein the bacterial strain has the ATCC accession number PTA-5573.

5. claims: 1,8 (both partially)

As subject 1 but wherein the bacterial strain has the ATCC accession number PTA-5574.

6. claims: 1,8 (both partially)

As subject 1 but wherein the bacterial strain has the ATCC accession number PTA-5575.

7. claims: 1,8 (both partially)

As subject 1 but wherein the bacterial strain has the ATCC accession number PTA-5576.

8. claims: 1,8 (both partially)

As subject 1 but wherein the bacterial strain has the ATCC accession number PTA-5577.

9. claims: 1,8 (both partially)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

As subject 1 but wherein the bacterial strain has the ATCC accession number PTA-5578.

10. claims: 1-15 (all partially)

A biologically pure bacterial strain having ATCC accession number PTA-5579 and methods involving the use of said bacterial strain which produce a biosurfactant.

11. claims: 1-16 (all partially)

A biologically pure bacterial strain having ATCC accession number PTA-5580 and methods involving the use of said bacterial strain which produce a biosurfactant.

12. claims: 1-16 (all partially)

A biologically pure bacterial strain having ATCC accession number PTA-5581 and methods involving the use of said bacterial strain which produce a biosurfactant.

13. claims: 2-7,10-15 (all partially)

Method of bioremediation of petroleum pollutants introducing a bacteria isolate which metabolizes constituents of the petroleum pollutant and which further produces a biosurfactant, wherein the bacteria isolate is not one of the 3 strains recited in claim 1 (PTA-5579, PTA-5580, and PTA-5581) which produce a biosurfactant.

14. claims: 4,5 (partially)

Method of bioremediation of petroleum pollutants and heavy metal pollutants by using a bacteria isolate which metabolizes constituents of the petroleum pollutant and which further produces a biosurfactant, said biosurfactant containing a portion of said heavy metals or said petroleum pollutants, wherein the bacteria isolate is not one of the 3 strains recited in claim 1 (PTA-5579, PTA-5580, and PTA-5581) which produce a biosurfactant.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International :ation No
PCT/US2005/003405

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
RU 2228953	C	20-05-2004	NONE	
WO 0056668	A	28-09-2000	AU 3911200 A	09-10-2000
			BR 0009273 A	16-04-2002
			CA 2367931 A1	28-09-2000
			CN 1347391 A	01-05-2002
			EP 1189843 A1	27-03-2002
			MX PA01009589 A	21-04-2004
			PL 350546 A1	16-12-2002
US 6503746	B1	07-01-2003	US 2003100098 A1	29-05-2003

34

"BIOCATALIZADOR DE AGENTE TENSIOACTIVO PARA CORRECCIÓN DE
ORGÁNICOS Y METALES PESADOS RESISTENTES"

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere a cepas bacterianas
útiles para la biocorrección y procesos para utilizar las
cepas bacterianas. En particular, se refiere a aislados
bacterianos únicos que pueden degradar hidrocarburos
poliaromáticos (PAHs) y métodos para utilizar estas
10 novedosas cepas bacterianas para corrección biológica.
También se ha demostrado la corrección de plomo al reducir
la biodisponibilidad por una de las cepas que indica el
doble uso para correcciones orgánicas e inorgánicas.

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

A lo largo de la especificación se hace
referencia a diversos artículos científicos y patentes.
Estas publicaciones se incorporan en la presente para
referencia a fin de describir el estado de la materia al
20 cual pertenece esta invención y a fin de proporcionar
detalles o metodologías convencionales y aparatos que
pueden ser útiles para llevar a la práctica diversas
modalidades de la presente invención.

Los hidrocarburos poliaromáticos (PAHs) son
25 contaminantes comunes y esparcidos encontrados en

32

asociación con refinerías de petróleo, algunos productos derivados del petróleo, instalaciones de almacenamiento de petróleo, y lugares de derrames petroleros. Los niveles elevados de PAHs están asociados con efectos mutagénicos y carcinogénicos en seres humanos y plantean un gran riesgo para la migración y contaminación de las fuentes de agua de suelo y tierra. Como resultado, existe bastante interés en técnicas y procesos que degraden los PAHs y productos derivados del petróleo a fin de remediar el ambiente. Los usos de agentes biológicos para tratar los PAHs son conocidos en la materia. La Patente de E.U. No. 6,503,746 para Deane describe cepas bacterianas en la familia *Bacillaceae* las cuales son utilizadas en esfuerzos de corrección de PAHs.

15 La Patente de E.U. No. 3,616,204 para Linn describe la inoculación de tierra contaminada con cultivos de microorganismos conocidos para degradar los contaminantes indeseables. El procedimiento descrito en Linn involucra adicionalmente la introducción de complementos nutricionales para incrementar la eficiencia de corrección de tierras.

La Patente de E.U. No. 5,100,455 para Pickard describe la utilización de microflora y fauna endógenas en combinación con substratos húmicos a fin de tratar biológicamente los contaminantes de la tierra incluyendo

25

35

hidrocarburos asociados con petróleo.

La Patente de E.U. No. 4,849,360 para Norris describe un bioreactor para tratar tierras contaminadas con petróleo en el cual se fuerza el aire a través de la tierra
5 contaminada a fin de facilitar la biocorrección. El bioreactor utiliza microflora endógena que se complementa con nutrientes de fósforo y nitrógeno.

Aunque es conocida una variedad de bacterias degradantes de PAH y ha sido utilizado en diversas
10 aplicaciones para correcciones, existe la necesidad de mejoras en la materia en términos de la identificación de nuevas y útiles especies que tengan propiedades novedosas las cuales sean efectivas para la rápida degradación de contaminantes de petróleo. Además, existe la necesidad de
15 mejoras relacionadas con el campo de corrección de metales tales como por la reducción de la biodisponibilidad del metal presente en tierras contaminadas, flujos de desechos con contenido metálico, y materiales de procesos industriales.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos para la degradación de contaminantes de petróleo que incluyen hidrocarburos poliaromáticos (PAHs). Además, la presente
25 invención se relaciona con un proceso de biotratamiento que

36

mejora la eliminación de metales pesados de la tierra. La presente invención utiliza cepas bacterianas aisladas y purificadas de aislados bacterianos provenientes de un terreno de refinería de petróleo. Algunos aislados tienen
5 la capacidad adicional de producir bioagentes tensioactivos útiles.

Un aspecto de al menos una de las presentes modalidades de la presente invención es proporcionar cepas bacterianas aisladas que produzcan bioagentes tensioactivos
10 bajo condiciones de corrección *in situ* y *ex situ*. La capacidad innata de las cepas bacterianas aisladas y purificadas para producir bioagentes tensioactivos contribuye a las propiedades de corrección de las bacterias. El bioagente tensioactivo proporciona una mayor
15 solubilidad de los PAHs y acceso de las bacterias a los PAHs, incrementando consecuentemente la eficiencia de la biocorrección por las cepas de bacterias. El bioagente tensioactivo también puede reducir la biodisponibilidad del Pb de la tierra y se considera que tiene utilidad para
20 biocorrecciones de otros contaminantes metálicos que responden también a los tratamientos de agente tensioactivo.

Un aspecto adicional de al menos una de la }
modalidades de la presente invención se refiere a cepas
25 aisladas y purificadas de bacterias en las cuales las

37

propiedades productoras de agente tensioactivo contribuyen a una mayor solubilización de productos de petróleo y de derivados del petróleo. Los bioagentes tensioactivos incrementan la solubilización de los productos petroleros la cual mejora el enjuague acuoso o eliminación de productos petroleros asociados con agregados de bioagentes tensioactivos tales como estructuras micelares y las relacionadas. Además, los bioagentes tensioactivos incrementan también la biodisponibilidad de productos petroleros que mejoran la capacidad microbiana de degradar los contaminantes. La biodisponibilidad mejorada es benéfica para las cepas aisladas y purificadas así como también otros organismos benéficos presentes en el substrato contaminado.

Aún otro aspecto de al menos una de las modalidades de la presente invención es proporcionar cepas de bacterias aisladas y purificadas que degradan PAHs de peso molecular bajo de 2 y 3 anillos tales como naftaleno, fenantreno, y fluoranteno junto con intermediarios degradantes de PAH.

Aún un aspecto adicional de al menos una de las modalidades de la presente invención es proporcionar una cepa de bacterias aisladas y purificadas la cual degrada los PAHs de peso molecular alto y de 4 anillos incluyendo pireno y fluoranteno. Típicamente, los PAHs de peso

30

39

molecular más alto y de 4 anillos son mucho más persistentes en el ambiente y resistentes a la degradación en comparación con los PAHs de peso molecular bajo. De acuerdo con lo anterior, la capacidad para proporcionar
5 cepas de bacterias que degraden PAHs de peso molecular más alto y de 4 anillos es significativa.

Los intermediarios degradantes de PAH pueden funcionar además como queladores metálicos. Esta actividad quelante o complejación metálica puede ayudar a la
10 corrección de desechos con contenido tanto de PAHs como de metales. Además, al menos algunas de las cepas bacterianas identificadas en la presente tienen capacidad para degradar diversos tipos diferentes de PAHs (incluyendo PAHs de 2-, 3-, y 4-anillos) además de tener capacidad para degradar
15 fenantreno.

Aún otro aspecto de al menos una de las modalidades de la presente invención es proporcionar cepas de bacterias aisladas y purificadas que tienen propiedades de agente tensioactivo útiles para la eliminación de
20 metales de tierras y substratos contaminados. Las cepas de bacterias aisladas y purificadas producen monómeros de bioagente tensioactivo. Se produce una cantidad suficiente de monómeros de bioagente tensioactivo que los monómeros se agregan en estructuras tridimensionales incluyendo colonias
25 micelares. Las estructuras micelares de bioagente

31

tensioactivo definen grupos de cabeza polar que se unen a iones metálicos en la tierra. Las estructuras micelares, con contenido de iones metálicos, pueden eliminarse por suspensiones o enjuagues acuosos(as), disminuyendo
5 consecuentemente el contenido de iones metálicos del substrato. Después, los metales eliminados resultantes, contenidos dentro de las estructuras micelares de bioagente tensioactivo, contenidos dentro de las estructuras micelares de bioagente tensioactivo, se separan y
10 concentran más fácilmente para su eficiente desecho y almacenamiento.

Aún otro aspecto de al menos de las presentes modalidades de la invención es proporcionar cultivos aislados y purificados de bacterias que producen bioagentes
15 tensioactivos bajo condiciones constitutivas, siendo capaces además las cepas aisladas de degradar los PAHs durante condiciones de corrección biológica.

Aún otro aspecto de al menos una de las presentes modalidades de la invención es proporcionar cepas aisladas
20 y purificadas de bacterias que tienen la capacidad para degradar un amplio rango de diferentes tipos de PAHs bajo condiciones de corrección biológica.

Aún otro aspecto de al menos una de las presentes modalidades de la invención es proporcionar cepas de
25 bacterias aisladas y purificadas que tienen capacidad para

30

producir una reducción general de hidrocarburos de petróleo total (TPH - total petroleum hydrocarbons). Además, la capacidad de algunos aislados para producir un bioagente tensioactivo durante las condiciones de corrección biológica incrementa la biodisponibilidad de hidrocarburos de petróleo para otros microorganismos que pueden estar presentes en tierras contaminadas u otros productos de desecho.

Aún otro aspecto de al menos una de las presentes modalidades de la invención es proporcionar cepas de bacterias aisladas y purificadas que tienen la capacidad para degradar los PAHs junto con una capacidad para producir un bioagente tensioactivo durante las condiciones de corrección biológica.

Aún otro aspecto de al menos una de las presentes modalidades de la invención es permitir que las cepas de bacterias aisladas y purificadas tengan la capacidad para producir una reducción general de la disponibilidad de plomo que puede estar presente en tierra o los flujos de agua con contenido de plomo. El bioagente tensioactivo producido por uno o más aislados puede utilizarse en combinación con fosfatos inorgánicos a fin de reducir la biodisponibilidad del plomo en un substrato contaminado tal como tierra.

Otros aspectos de al menos una modalidad de esta

invención incluyen un proceso de corrección biológica de
contaminantes petroleros provenientes de un ambiente
contaminado que comprende los pasos para proporcionar un
suministro de un substrato contaminado con un contaminante
5 petrolero; introducir en el suministro del substrato
contaminado al menos un aislado bacterial que metabolice a
los integrantes del contaminante petrolero y que produzca
además un bioagente tensioactivo; y, proporcionar
nutrientes adecuados para un tiempo de tratamiento
10 suficiente para que el contaminante petrolero utilice el
aislado a fin de degradar la contaminación petrolera hasta
una concentración objetivo de 100 ppm de TPH o menos.

Estos y otros aspectos de la invención se
proporcionan por cepas bacterianas biológicamente puras
15 para la biocorrección de productos petroleros y los PAHs
que comprenden los aislados seleccionados de los aislados
identificados en la Tabla 2.

Estas y otras características, aspectos, y
ventajas de la presente invención se comprenderán mejor con
20 referencia a la siguiente descripción y reivindicaciones
anexas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 presenta una gráfica que muestra la
25 biodisponibilidad del plomo con respecto a diversos

42

aditivos y aislados biológicos con respecto a una tierra altamente contaminada (900mg Pb/Kg de tierra).

La Figura 2 es una gráfica que presenta los cambios en la materia orgánica total en muestras de tierra
5 después de un protocolo de tratamiento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Una descripción total y habilitante de la presente invención, incluyendo la modalidad preferida de la
10 misma, para aquellos expertos en la materia, se expone más particularmente en el resto de la especificación. A continuación se hará referencia detalladamente a las modalidades de la invención, uno o más ejemplos los cuales se exponen a continuación. Cada ejemplo se proporciona a
15 manera de explicación de la invención, no de limitación de la invención. De hecho, será aparente para aquellos expertos en la materia que pueden realizarse diversas modificaciones y variaciones en la presente invención sin aislarse del alcance o espíritu de la invención. Por
20 ejemplo, las características descritas como parte de una modalidad pueden utilizarse en otra modalidad a fin de producir una modalidad adicional. Consecuentemente, se pretende que la presente invención cubra tales modificaciones y variaciones dentro del alcance de las
25 reivindicaciones anexas y sus equivalentes. Otros objetos,

SM

características, y aspectos de la presente invención se revelan en la siguiente descripción detallada. Los expertos en la materia comprenden que la presente descripción es solamente una descripción de modalidades a
5 manera de ejemplo y no pretende ser limitante de aspectos más amplios de la presente invención, aspectos más amplios que se incorporan en las construcciones a manera de ejemplo.

La presente invención se refiere a aislados
10 bacterianos obtenidos a partir de una vieja refinería de petróleo en Czechowice, Polonia. Los sedimentos añejados proveniente de la refinería de petróleo se caracteriza por sus propiedades acídicas (pH 2) y contiene altas concentraciones de PAHs junto con metales pesados. Además,
15 los sedimentos se caracteriza por la presencia de catalizadores agotados, asfálticos, tierra diatomácea, gel de sílice, y polvillo de cenizas de carbón, conteniendo todos altos niveles de fondo de metales pesado (Pb/Cd/Zn) los cuales se han depositado con anterioridad en el lugar.
20 El lugar de concentración es de un área que tiene aproximadamente 120,000 toneladas de material de desecho depositado en lagunas sin revestir a 3 metros de profundidad cubriendo un área de 3.8 hectáreas. Se aisló un total de 45 bacterias, 68 hongos, y 7 especies de
25 levadura a partir de los sedimentos en un medio mínimo

44

acídico (pH 4) expuesto a vapor de naftaleno.

Un subconjunto de aislados se caracterizó por criterios taxonómicos tradicionales, BIOLOG™, y análisis de genes de ARNr de SSU. Los grupos bacterianos incluyeron

5 especies de *Proteo* bacterias, *Ralstonia*, *Pseudomonas* y *Alcaligenes*. Las caracterizaciones adicionales de los aislados pueden observarse con referencia a la información proporcionada en las Tablas 1 y 2. Los protocolos de

10 caracterización de BIOLOG™ que utilizan factores nutricionales mínimos junto con diversos substratos orgánicos de interés se describen con referencia a la publicación "Uso de tecnología BIOLOG™ para técnicas microbiológicas riesgosas y de examen químico" (*Use of*

15 *BIOLOG™ Technology for Hazardous Chemical Screening, Microbiological Techniques*) 18:329-347, 1993, y que se incorpora en la presente para referencia.

Se aisló un total de 45 bacterias, 68 hongos, y 7 especies de levadura utilizando un medio de desarrollo basal de sales minerales acídicas de vapor de naftaleno.

20 Aunque no se exponen separadamente, se observa que muchos de los aislados tienen la capacidad para metabolizar el catecol y los aislados bacterianos se caracterizaron por la capacidad para degradar PAHs. Además, se observa que los organismos aislados y purificados tienen la capacidad para

25 degradar los PAHs también tienen la capacidad para degradar

205

una variedad de contaminantes de petróleo asociados con las mediciones de hidrocarburos de petróleo total.

Como se expone en la Tabla 1, se observó que tres especies bacterianas designadas CZORL1B, BP20, y CZORL1Bsm, y que corresponden a los aislados 1 a 3 en la Tabla 2, producen un agente tensioactivo cuando se desarrolla en un medio mínimo con contenido de naftaleno, fenantreno, o fluoranteno. Se observó que nueve cepas adicionales identificadas en la Tabla 1 degradaron los contaminantes aunque los aislados adicionales no de muestran una capacidad para producir un agente tensioactivo.

Las cepas bacterianas anteriormente identificadas se desarrollaron y mantuvieron en placas al 1 por ciento de peptona, triptona, extracto de levadura, glucosa (PTYG - peptone, trypticase, yeast extract, glucosa). Las bacterias se desarrollaron aeróbicamente a 30°C y se mantuvieron en un medio mínimo a 4°C o en almacenamiento a largo plazo en un medio congelado mantenido a -70°C o en nitrógeno líquido (-196°C).

La identificación de las bacterias se realizó utilizando los protocolos de identificación de ADN_r o Ésteres Metílicos de Ácido Graso (FAME - Fatty Acid Methyl Esters) como se expone en la publicación "Evolución Bacterial, Reseñas Microbianas" ("Bacterial Evolution, Microbial Review") 51:221-227 por C. R. Woese (1987) y la

46

cual se incorpora en la presente para referencia. Los depósitos de los aislados 1 a 12 identificados en la Tabla 2 se depositaron con la ATCC (ATCC - American Type Culture Collection), Rockville, Maryland, el 9 de Octubre de 2003, y tienen los números de designación de ATCC. Las formas de depósito anexas a cada uno de los depósitos de aislado enviadas al ATCC se incorporan en la presente para referencia.

10

15

20

25

47

48
14

Evaluado para las siguientes características ^a :									
aislado	índigo	meta	NAP	PHE	ANT	FLE	ACE	FLA	PYR
	fisión								
Aislado en vapor de naftaleno ^b									
BAA-1 (PB19)	índigo								
BAA (PB16)	índigo								
BAB (PB(4)	índigo								
5 CZORL1B (KN-1) ^c		meta							
BP20 CZORL1B (KN-2) ^c		meta							
CZORL1Bsm (KN-3) ^c		meta							
PB15	índigo		NAP (se designó BP20)						
Aislado con sobreatomizador de fenantreno ^d									
BPA	índigo			PHE	ANT	FLE			
BPB	índigo			PHE	ANT	FLE			
BPC	índigo			PHE	ANT	FLE			
BPD	índigo			PHE	ANT	FLE			
BPE	índigo			PHE	ANT	FLE			
10 BPF	índigo	meta	NAP	PHE	ANT	FLE	ACE	FLA	PYR
		fisión							
BPG	índigo	meta							
		fisión							
BPH	índigo	meta		PHE	ANT	FLE		FLA	PYR
		fisión							
BPI	índigo			PHE	ANT	FLE			
BPJ	índigo				ANT	FLE			
BPK				PHE	ANT	FLE			
BPL	índigo			PHE		FLE			
BPM	índigo			PHE	ANT	FLE			PYR
15 BPN	índigo			PHE	ANT	FLE		FLA	
BPO	índigo			PHE	ANT	FLE			
BPP	índigo			PHE					
BPQ	índigo			PHE	ANT	FLE			
BPR	índigo	meta		PHE					
		fisión							

a Abreviaciones; índigo, producción de índigo derivado de indola; meta fisión, actividad de dioxigenasa de 2,3 catecol; NAP, naftaleno; PHE, fenantreno; ANT, antraceno; FLE, fluoreno; ACE, acenanfteno; FLA, fluoranteno; PYR, pireno.

b Bacteria aislada en placas de ágar-ágar expuesto a naftaleno.

c Bacteria que produjo bioagente tensioactivo

d Bacteria aislada en placas de ágar-ágar expuestas a cristales de fenantreno.

20

Tabla 1
Dioxigenasa dihidroxilante y actividad de dioxigenasa de 2,3 catecol y rango degradante de PAH de aislados.

25

48

Aislado	Identificación	Número de Acceso de ATCC
1) CZOR-L1B (KN-1)	ALCALIGENES-PIECHAUDII SRS	PTA-5580
2) BP-20 (KN-2)	RALSTONIA PICKETTII SRS.	PTA-5579
3) CZOR-L1Bsm(KN-3)	PSEUDOMONAS-PUTIDA BIOTIPO B SRS	PTA-5581
4) BPE	FLEXIBACTER CF. SANCTI SRS	PTA-5570
5) BPC	PSEUDOMONAS FREDRIKSBERGENSIS SRS	PTA-5571
5 6) BPE	STAPHYLOCOCCUS WARNERI, LMG 19417 SRS	PTA-5572
7) BPF	SPHINGOMONAS SRS	PTA-5573
8) BPH	SPHINGOMONAS SP. S37 SRS	PTA-5574
9) BPI	PHYLOBACTERIUM SRS	PTA-5575
	(α PROTEOBACTERIUM TA-A1)	
10) BPJ	SERRATIA FICARIA SRS	PTA-5576
	(α PROTEOBACTERIUM TA12-21)	
11) BPK	AGROBACTERIUM TUMEFACIENS SRS	PTA-5577
12) BPL	RHIZOBIUM SP, SDW045 SRS	PTA-5578

Tabla 2
Identificación de aislados

Los aislados de bacterias anteriormente identificados se han establecido como distintas especies.

15 Cada uno de los aislados identificados tiene propiedades degradantes de PAH y ha demostrado capacidad para reducir el TPH en tierra también. Además, algunos aislados tienen capacidad para producir un bioagente tensioactivo. Cada

aislado se considera novedoso, con base en la

20 caracterización de ADN_r y las variaciones observadas en las Tablas 1 y 2 con respecto a las características de desarrollo fisiológico.

Los aislados 1-3, ATCC PTA-5580 (*Alcaligenes piechaudii* SRS); ATCC PTA-5579, (*Ralstonia pickettii* SRS);

25 y ATCC PTA-5581 (*Pseudomonas putida* Biotipo B SRS)

identificados con anterioridad, demuestran todos capacidad para producir un bioagente tensioactivo, cuya formación se observó durante las condiciones de cultivo. El exudado de bioagente tensioactivo se evaluó para cada aislado y se determinó que tenía una tensión superficial que altera la propiedad consistente con un agente tensioactivo. Los aislados 4-12 demuestran capacidad para biodegradar una variedad de PAHs (Tabla 1). Como se establece en el Ejemplo 1 mostrado a continuación, el uso de un conjunto de doce aislados identificados en la Tabla 2 para remediar los hidrocarburos de petróleo contenidos en la tierra en un estudio de corrección de bioreactor da como resultado cantidades visibles de bioagentes tensioactivos producidos bajo las condiciones de corrección biológica.

La capacidad de algunos aislados de producir bioagentes reactivos se considera que mejora la corrección a través de diversos mecanismos diferentes. La producción del bioagente tensioactivo incrementa la disponibilidad biológica de los PAHs y otros compuestos petroleros hidrofóbicos. La mayor disponibilidad biológica incluye la capacidad del agente tensioactivo producido de solubilizar y tener disponible para el aislado los PAHs y los demás compuestos petroleros. Como tal, la capacidad de los aislados de producir agentes tensioactivos incrementa la eficiencia de los aislados para degradar y metabolizar los

PAHs.

Como se observa en el Ejemplo 1, el conjunto de aislados utilizados da como resultado cantidades visibles de agentes tensioactivos producidos en la tierra. Los bioagentes tensioactivos generalmente tienen una química consistente de una cabeza polar y una cola no polar. En soluciones acuosas, los bioagentes tensioactivos sirven para reducir la tensión superficial líquida y para facilitar la formación de una emulsión entre líquidos de diferentes polaridades. Esta capacidad facilita la utilidad de los bioagentes tensioactivos porque las regiones de cola no polar e hidrofóbicas de los bioagentes tensioactivos y de las estructuras micelares de bioagentes tensioactivos pueden retener aceites y otros compuestos petroleros. Los aceites y otros compuestos petroleros retenidos tienen mayor biodisponibilidad para que se biodegraden las bacterias. Además, las estructuras micelares que contienen aceites y compuestos petroleros retenidos pueden eliminarse o enjuagarse periódicamente del sistema, proporcionando consecuentemente una capacidad para aislar y separar también compuestos petroleros del substrato de tierra.

Además, las estructuras micelares formadas por los bioagentes tensioactivos mejoran la eliminación de metales de la tierra. Los grupos hidrofílicos de cabeza

5

polar de estructuras micelares se unirán a metales y iones metálicos presentes en la tierra. Una vez unidos, la naturaleza soluble de las estructuras micelares permite recolectar las estructuras micelares y metales unidos. Una vez recolectados, el nuevo volumen concentrado de estructuras micelares y metales contenidos puede tratarse adicionalmente para separar los metales derivados del bioagente tensioactivo. Además, se ha descubierto que los aislados seleccionados que producen bioagentes tensioactivos pueden utilizarse para reducir la biodisponibilidad de algunos metales tales como plomo presentes en la tierra. Para algunas correcciones, los agentes tensioactivos no se utilizan para eliminar un contaminante, sino más bien para proporcionar un método de estabilización a largo plazo de un sitio contaminado. La estabilización incluye reducir la biodisponibilidad del plomo además de evitar la migración del plomo a sitios no contaminados superficiales y adyacentes y al agua subterránea.

20

Ejemplo 1

Se construyó un bioreactor móvil y se suministró con un volumen de cuatro toneladas de tierra contaminada con cesio-137 de bajo nivel y 26,000 ppm de hidrocarburos de petróleo. La tierra contaminada fue material desgastado

25

obtenido por the Savannah River Site (Aiken, SC). La fuente y conformación de los productos petroleros es desconocida pero se considera que es una mezcla de aceite de motor y combustible diesel utilizados.

5 La tierra se modificó con un agente masivo al 7% de abono añejo. Para cada aislado, se añadió un cultivo de tres litros en fase de desarrollo logarítmico y se distribuyó dentro de las cuatro toneladas de tierra de desechos mixtos. El bioreactor se encuentra equipado con
10 un fondo elevado, secundario y perforado que tiene líneas inferiores de ventilación de alimentación que proporcionan un suministro continuo de aire ambiente al bioreactor. Además, se aplicaron complementos de nutrientes periódicos de fertilizantes de nitrógeno, potasio, y fósforo (10-10-
15 10) para mejorar la actividad biológica dentro del bioreactor. Se anexaron acoplamientos de agua influentes y efluentes. Se utilizaron compresores de aire, bombas al vacío, y una bomba líquida para controlar y regular los flujos de aire y líquidos a través del bioreactor y
20 controlar el contenido de humedad en el bioreactor.

La presencia de cesio-137 de bajo nivel limitó el número y tipos de técnicas de muestreo utilizadas para monitorear el bioreactor y requirieron el uso de filtración HEPA con los acoplamientos efluentes de aire. Las
25 mediciones periódicas de CO₂ indicaron que, en un intervalo

de cinco meses, se degradaron 121 libras (54.8 kg) de productos petroleros. Con base en las mediciones de CO₂, se calcula conservadoramente que el proceso de corrección biológica eliminó 16,000 mg/kg de contaminantes petroleros

5 de la tierra durante el intervalo de cinco meses de evaluación. Se demostró que el volumen de 4 toneladas de tierra contaminada redujo el TPH hasta 45 ppm después de 20 meses de tratamiento. La capacidad de los aislados de degradar el petróleo y otros productos de hidrocarburo y

10 simultáneamente de producir bioagentes tensioactivos ofrece enormes ventajas en términos de eficiencia y versatilidad de los protocolos de tratamiento. Por ejemplo, se considera que para las tierras contaminadas únicamente con petróleo y derivados del petróleo, los presentes aislados

15 pueden utilizarse, individualmente o en conjunto, con técnicas convencionales de corrección biológica para mejorar la eficiencia de degradación. Como se describió con anterioridad, la acción de los bioagentes tensioactivos crea una mayor zona de solubilidad de petróleo para cada

20 bacteria individual. Como resultado, ocurre una mayor disponibilidad de productos petroleros. Además, en la medida en que los aislados forman colonias, biopelículas, o bioláminas anexas dentro de porciones de tierra, se considera que los agentes tensioactivos incrementan

25 substancialmente la biodisponibilidad de los substratos

54

petroleros para los agregados bacterianos. Al mismo tiempo, los agentes tensioactivos incrementan también la solubilización de metales pesados que pueden estar presentes y que proporcionan capacidad para reducir la concentración de metales pesados mediante la eliminación de los agentes tensioactivos producidos.

Como se observa en el Ejemplo 1, el conjunto de aislados proporciona un proceso de corrección biológica que puede alcanzar reducciones significativas del petróleo en tierra contaminada. Esta propiedad es particularmente útil con respecto a la formulación de estrategias de desecho para desechos mixtos en los cuales la tierra contaminada con petróleo y el material radiactivo de bajo nivel se encuentran presentes conjuntamente. Actualmente, la tierra contaminada con desechos radiactivos de bajo nivel y que tiene contaminantes petroleros adicionales debe estar por debajo de los límites normativos de 1 ppm de BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno, xileno, y 100 ppm de TPH (Total Petroleum Hydrocarbons) antes de que la tierra pueda clasificarse y desecharse como desecho radioactivo de bajo nivel. El costo de desecho de la tierra que cumple la definición de un desecho radiactivo de bajo nivel es de aproximadamente U.S. \$262 por metro cúbico al año. En cambio, la tierra con contenido de material radiactivo de bajo nivel y con una contaminación de petróleo que excede

los límites normativos debe almacenarse como un producto de desechos mixtos. El costo de almacenamiento de tierra de desechos mixtos es de aproximadamente U.S. \$10,165 por metro cúbico de tierra al año con base en los costos anuales solamente. La capacidad para tratar tierras de desecho mixto y consecuentemente de eliminar los niveles substanciales de contaminantes petroleros es de importancia crítica. La eliminación de suficientes contaminantes petroleros de una tierra de desechos mixtos permite desechar el desperdicio como un desecho radiactivo de bajo nivel. El costo resultante es 38 veces menor que el costo de almacenamiento de un desecho mixto.

El uso de los presentes inoculantes es ventajoso porque, a diferencia de algunas técnicas anteriores, el volumen de modificaciones a la tierra se mantiene en un mínimo. Mantener el volumen de modificaciones de la tierra en un mínimo reduce los eventuales costos de desecho, particularmente para la tierra con contenido de radiación de bajo nivel.

Los presentes aislados también se consideran útiles para los proyectos de corrección *in situ*. El conjunto de aislados puede suministrarse a la tierra contaminada utilizando cualquier número de técnicas convencionales. Según se requiera, los complementos adicionales junto con el suministro de oxígeno en forma

86
5

física o química facilita la actividad de corrección biológica. Dada la capacidad de los aislados para degradar los PAHs así como también la capacidad deseada de degradar los hidrocarburos de petróleo generalmente, es ventajosa la corrección *in situ* que utiliza aislados. Además, la capacidad de algunos aislados de producir un agente tensioactivo (bioagente tensioactivo) durante las condiciones de desarrollo de la tierra hace más benéfico el uso de algunos aislados. Como se observa, el bioagente tensioactivo mejora la capacidad para retener físicamente los productos petroleros y metales pesados así como también de proporcionar una mayor solubilización y acceso de hidrocarburos de petróleo tanto a los aislados bacterianos así como también en microorganismos presentes en el ambiente de tierra.

El uso de bioagentes tensioactivos puede producir resultados útiles en una variedad de condiciones de sustrato contaminado. Por ejemplo, en la materia se conoce que los bioagentes tensioactivos tienen propiedades útiles de complejación de metales que pueden reducir la toxicidad del metal tanto con contaminantes orgánicos como metálicos. Una de tales publicaciones, titulada "Un bioagente tensioactivo ramnolípido reduce la toxicidad de cadmio durante la biodegradación de naftaleno" ("Rhamnolipid Biosurfactant Reduces Cadmium Toxicity during

Naphtalene Biodegradation"), por Sandrin et al.,
Microbiología Ambiental y Aplicada (Applied and
Environmental Microbiology), Octubre de 2000, págs. 4585-
4588, y que se incorpora en la presente para referencia,
5 describe la capacidad de bioagentes tensioactivos para
reducir la toxicidad metálica en los sistemas co-
contaminados que tienen contaminantes tanto orgánicos como
metálicos.

Una publicación adicional, "Agentes tensioactivos
10 microbianas y su uso en estudios de campo de corrección de
tierra" ("Microbial Surfactants and their use in Field
Studies of Soil Remediation"), por N. Christofi e I. B.
Ivshina, publicada en la Gaceta de Microbiología Aplicada
(Journal of Applied Microbiology), 2000, 93, págs. 915-929,
15 y que se incorpora en la presente para referencia,
proporciona un resumen útil del papel de agentes
tensioactivos en aplicaciones de corrección de tierra. Los
bioagentes tensioactivos pueden, bajo condiciones
apropiadas, proporcionar beneficios útiles con respecto a
20 una solubilización orgánica, degradación orgánica,
solubilización metálica, y aislamiento metálico.

Algunos aislados descritos en la presente han
demostrado capacidad para reducir la biodisponibilidad del
plomo en una tierra contaminada. Los contaminantes de
25 plomo en la tierra pueden ocurrir como resultado de

numerosas actividades que incluyen la minería, la presencia de pinturas con contenido de plomo, artillería de rangos de disparo, contaminación derivada de la gasolina y aditivos de petróleo, centros de reciclaje de baterías de plomo, y
5 residuos derivados de explosivos con contenido de plomo. La exposición al plomo se encuentra asociada con numerosos padecimientos nerviosos humanos y de los sistemas reproductivos. El plomo normalmente ingresa al cuerpo a través de la inhalación o la ingestión de polvo con
10 contenido de plomo.

Se sabe que las tierras con contenido de plomo pueden tratarse con el uso de correcciones de tierra a fin de reducir la biodisponibilidad del plomo. Algunas de tales correcciones incluyen apatitas, HR, y otros
15 materiales con contenido de fosfato de calcio. Las apatitas son conocidas por unirse al plomo y a otros metales en la tierra y consecuentemente reducen la tendencia del plomo a migrar. Esta interacción de unión reduce también la biodisponibilidad del plomo. También
20 pueden utilizarse los agentes tensioactivos seleccionados a fin de reducir la biodisponibilidad del plomo como lo demuestra el aislado 3.

Se realizó una evaluación del aislado 1 (*Alcaligenes piechaudii*) y del aislado 3 (*Pseudomonas putida*)
25 para ver si podían obtenerse reducciones benéficas en la

A

biodisponibilidad de plomo al incorporar los aislados de producción de bioagente tensioactivo con otras correcciones de tierra en tierra con contenido de plomo. La tierra contaminada con plomo se obtuvo a partir de un pequeño

5 rango de disparo de armas en el que se habían acumulado en la tierra balas de plomo durante varios años. Se mezclan 50 gm de muestras de tierra contaminada con 3 diferentes corrección de fosfato de calcio. Las correcciones de fosfato de calcio incluyeron un fosfato de calcio de roca

10 de calcio de generación natural proveniente de Carolina del Norte (EUA) designada en lo sucesivo como NCA, un fosfato de calcio de roca de generación natural proveniente de Florida (EUA) designada en lo sucesivo FA, y una apatita biológica obtenida a partir de huesos de pescado alojados

15 en la tierra, designada en lo sucesivo como BA. Se realizaron adiciones de peso del 10% y del 5% de NCA, SA y BA en las muestra respectivas de las tierra contaminadas con plomo. Además, algunas de las muestras de tierra corregida se trataron adicionalmente por la introducción de

20 muestra de 5ml del aislado número 1, *Alcaligenes piechaudii*, en un caldo nutriente de PTYG al 1%. La densidad del aislado fue de 3.11×10^8 células por ml. También se trataron muestras adicionales con el aislado número 3 *Pseudomonas putida* utilizando una adición similar

25 de 5 ml y una densidad de 3.43×10^8 células por ml con

60

contenido de muestras para la corrección microbiana
incluido un caldo estéril de PTYG al 1%. Las muestras de
tierra contaminada y diversas correcciones y cultivos se
mezclaron conjuntamente en recipiente sellados los cuales
5 se conectaron mediante tubería a un Respirómetro Micro-
Oxymax (Columbus Instruments, Columbus, O) para la
determinación de tasas metabólicas incluye el consumo de
oxígeno y evolución de CO_2 . La densidad microbiana se
obtuvo mediante técnicas convencionales de preparación de
10 placas para determinar la densidad de la colonia y de la
muestra.

Como se observa en los resultados expuestos en la
Figura 1, la adición del aislado 3 alcanza una disminución
significativa en la biodisponibilidad del plomo medida a
15 través de un procedimiento de lixiviación característica
de toxicidad (TCLP - toxicity characteristic leaching
procedure) que utiliza protocolos identificados en el
Método 6010 de la Agencia de Protección Ambiental de E.U.
Las correcciones microbianas generan reducciones
20 significativas en la biodisponibilidad del plomo cuando son
utilizadas con las correcciones de tierra al 5% de NCA o
BA. Dado el bajo costo de un producto de BA y la
uniformidad de la apatita biológica, se considera que el
uso de la apatita biológica en combinación con el aislado
25 3, o combinaciones de los mismos, ofrece una excelente

reducción para la biodisponibilidad del plomo en la tierra.

La combinación de la apatita biológica con los bioagente tensioactivos de generación natural derivados de las bacterias del aislado 3 produce otras mejoras observadas para las muestras de tierra contaminada. Se observa que hubo un incremento en las tasas metabólicas medido por el consumo de oxígeno y se incrementó la producción de dióxido de carbono junto con la densidad microbiana general. Como puede observarse con referencia a la Figura 2, la materia orgánica total se incrementa significativamente después de un periodo de incubación de 114 horas para muestras que utilizan el aislado *P. putida* en combinación con la apatita biológica en los niveles de incorporación de tanto de 1% como de 5%. El incremento de la materia orgánica total relega el incremento de la población microbiana total atribuible al mayor suministro de nutriente de los bioagentes tensioactivos. La mayor biodisponibilidad de micronutrientes da como resultado una mejor actividad biológica que da como resultado un incremento en materia orgánica. Aunque los resultados más significativos pueden observarse con las apatitas biológicas en combinación con la cepa del aislado *P. putida*, diversas combinaciones de otras apatitas sugieren que pueden utilizarse uno o más aislados para incrementar la actividad microbiana total.

62

Aunque no se reportan separadamente, se observa que los incrementos en la materia orgánica como se observa en la Figura 2 están correlacionados con incremento significativos en el pH de la tierra, consumo de O₂,
5 producción de CO₂, así como también una biodisponibilidad del plomo reducida como se observa en la Figura 1.

Se considera que el uso de los aislados descrito con anterioridad produce una disminución en la biodisponibilidad del plomo debido al menos en parte a las
10 propiedades de producción de agente tensioactivo de los aislados. Se considera que los bioagentes tensioactivos acentúan las tendencias inherentes de la apatita con respecto al incremento de las tasas metabólicas, biodisponibilidad de nutrientes, e incrementos favorables
15 en el pH y la disminución de la biodisponibilidad del plomo. Como se describió con anterioridad, los bioagentes tensioactivos producen condiciones de tierra favorables que mejoran las condiciones de los nutrientes y la biodisponibilidad de micronutrientes para microorganismos.
20 Se considera que el incremento en la actividad biológica y la biomasa asociada en la tierra disminuyen también la biodisponibilidad del plomo. La actividad de *P. putida* para disminuir la biodisponibilidad del plomo en la tierra es sinérgica con BA a una concentración del 5%. El
25 incremento exponencial en la tasa de respiración, densidad

microbiana e incremento en la biomasa es una clara evidencia de que la actividad se encuentra relacionada con actividad biológica específica.

Como se observa en la Figura 1, diferentes
5 agentes tensioactivos tienen diferentes resultados cuando se aplican a alguna apatita en particular utilizada como aditivo inorgánico. Uno podría, mediante experimentación rutinaria, evaluar los diversos aislados a fin de determinar la combinación que ofrece las mejoras deseadas
10 en la biodisponibilidad del plomo con respecto a las condiciones de tierra determinadas, las apatitas seleccionadas y/u otros aditivos utilizados en el procedimiento correctivo. Las combinaciones más útiles de aditivos y aislados pueden seleccionarse a fin de producir
15 la reducción deseada en la biodisponibilidad del plomo.

Como se describe con anterioridad en esta solicitud, los aislados son útiles para la reducción de PAHs así como también la facilitación de la eliminación y/o secuestro de iones metálicos derivados de tierras y
20 substratos contaminados. De acuerdo con lo anterior, para las tierras contaminadas y flujos de desechos que tienen una variedad de contaminantes que incluyen PAHs, iones metálicos, y otros metales tale como plomo, el uso de uno o más de los presentes aislados, incluyendo los aislados que
25 producen un bioagente tensioactivo, pueden tratar

64

efectivamente múltiples contaminantes en un lugar determinado.

Aunque los ejemplos anteriores se determinaron en el contexto de la corrección de una tierra altamente contaminada (900 mg de Pb/Kg de tierra), se considera que la utilidad de los aislados o combinaciones individuales de aislados no se limita a esfuerzos de corrección de tierra per se. Por ejemplo, se considera que los bioagentes tensioactivos que producen aislados pueden utilizarse como parte de un proceso de tratamiento de flujo de desechos de una mina o instalación industrial donde se generan metales pesados, iones metálicos, plomo, cobre, cadmio, cinc, otros metales, y otros contaminantes. Muchos sitios (es decir, basureros y terrenos industriales inactivos) tienen contaminación por plomo con una baja concentración de ppm (1-10 mg de Pb/Kg de tierra) que es aún causa de preocupación debido al potencial impacto toxicológico y al futuro uso de la tierra. El uso de inoculantes que se incorporan al flujo de desechos inicial y que incluyen uno o más de los aislados anteriormente mencionados puede producir un volumen reducido de contaminantes dentro del flujo de desechos e introducir una población de flora microbiana que pueda persistir como parte de un protocolo de tratamiento a más largo plazo para desechos generados y/o almacenados. Por ejemplo, los residuos mineros pueden

65

tratarse inicialmente para reducir algunos contaminantes antes de desecharse en un área de desechos. Después de ello, la presencia de aislados en los residuos mineros puede utilizarse para sacarle ventaja al tratamiento
5 diseñado a fin de mejorar la actividad biológica útil a fin de producir una reducción en el consumo y/o estabilización de los contaminantes presentes en el flujo de desechos.

Se considera que pueden utilizarse resultados similares en una variedad de flujos de desechos
10 industriales en los que los aislados pueden utilizarse como parte de un proceso de tratamiento biológico a fin de reducir inicialmente el nivel de contaminantes y para proporcionar una población microbiana que puede utilizarse como parte de un tratamiento a más largo plazo para los
15 flujos de desechos almacenados o depositados.

Aunque las modalidades de la invención se han descrito utilizando términos, dispositivos, y métodos específicos, tal descripción solamente es para propósitos ilustrativos. Las palabras utilizadas son palabras de
20 descripción más que de limitación. Debe comprenderse que los expertos en la materia pueden realizar cambios y modificaciones sin aislarse del espíritu y alcance de la presente invención, la cual se expone en las siguientes reivindicaciones. Además, debe comprenderse que pueden
25 intercambiarse aspectos de las diversas modalidades, tanto

66

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiéndose descrito la invención como antecedente, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

5

REIVINDICACIONES

1. Una cepa bacteriana biológicamente pura la biocorrección de hidrocarburos de petróleo caracterizada porque comprende un aislado seleccionado a partir del grupo
10 que consiste en los números de acceso de ATCC PTA-5570, PTA-5571, PTA-5572, PTA-5573, PTA-5574, PTA-5575, PTA-5576, PTA-5577, PTA-5578, PTA-5579, PTA-5580, PTA-5581 y combinaciones de los mismos.

2. Un proceso de biocorrección de contaminantes
15 de petróleo provenientes de un ambiente de tierra caracterizado porque comprende los pasos para:

proporcionar un suministro de tierra contaminada que tiene un contaminante de petróleo;

introducir a dicho suministro de tierra
20 contaminada al menos un aislado de bacterias que metaboliza los constituyentes del contaminante de petróleo y que produce además un bioagente es activo; y,

proporcionar nutrientes adecuados para una
duración de tratamiento suficiente para que el contaminante
25 utilice aislados para degradar la contaminación de

68

petróleo.

3. El proceso según la reivindicación 2, caracterizado porque la concentración de contaminante de petróleo en la tierra es menor que aproximadamente 100 ppm de hidrocarburos de petróleo total después del tratamiento con al menos un aislado bacteriano.

4. Un proceso para tratar un desecho mixto de tierra contaminada con un contaminante de metal pesado y un contaminante de petróleo caracterizado porque comprende los pasos para:

proporcionar un suministro de tierra contaminada que contiene un contaminante de metal pesado y un contaminante de petróleo;

introducir a dicho suministro de tierras contaminadas al menos un aislado bacteriano que metaboliza un constituyente del contaminante de petróleo y que produce además un bioagente tensioactivo; y

eliminar periódicamente una porción del bioagente tensioactivo producido del suministro de tierra, conteniendo el bioagente tensioactivo será una porción de metales pesados o de los contaminantes de petróleo; y,

repetir el paso de eliminación de una porción del agente tensioactivo hasta que se reduzca la concentración de metales pesados a un valor objetivo.

5. El proceso según la reivindicación 2,

69

caracterizado porque el suministro de tierra contaminada contiene también un desecho radiactivo de bajo nivel.

6. El proceso según la reivindicación 2, caracterizado porque el paso de introducción de un aislado
5 comprende además añadir un aislado seleccionado del grupo consistente en los números de acceso de ATCC PTA-5579, PTA-5580, y PTA-5581 y combinaciones de los mismos.

7. El proceso según la reivindicación 4, caracterizado porque el paso de introducción de al menos un
10 aislado bacteriano comprende también la adición de un aislado seleccionado del grupo consistente en los números de acceso de ATCC PTA-5579, PTA-5580, y PTA-5581 y combinaciones de los mismos.

8. Un proceso para tratar una tierra con
15 contenido de material radiactivo de bajo nivel e hidrocarburos de petróleo, caracterizado porque comprende los pasos para:

proporcionar un suministro de tierra contaminada con contenido de desechos radiactivos y un hidrocarburo de
20 petróleo;

introducir en dicho suministro de tierra contaminada al menos un aislado bacteriano el cual metaboliza un constituyente del hidrocarburo de petróleo y se selecciona a partir del grupo que consiste en los
25 números de acceso de ATCC PTA-5570, PTA-5571, PTA-5572,

20

PTA-5573, PTA-5574, PTA-5575, PTA-5576, PTA-5577, PTA-5578, PTA-5579, PTA-5580, PTA-5581 y combinaciones de los mismos que metabolizan un constituyente de los hidrocarburos de petróleo; y,

5 tratar el suministro de tierra contaminada hasta que una concentración tratada del contaminante de petróleo sea menor que aproximadamente 100 ppm de hidrocarburos de petróleo total.

9. El proceso según la reivindicación 8,
10 caracterizado porque al menos un aislado bacteriano comprende además un aislado seleccionado a partir del grupo que consiste en los números de acceso de ATCC PTA-5579, PTA-5580, y PTA-5581, y combinaciones de los mismos.

10. El proceso según la reivindicación 2,
15 caracterizado porque el contaminante de petróleo incluye hidrocarburos poliaromáticos.

11. El proceso según la reivindicación 10,
caracterizado porque los hidrocarburos poliaromáticos incluyen además hidrocarburos poliaromáticos seleccionados
20 a partir del grupo que consiste en hidrocarburos poliaromáticos de 2 anillos, 3 anillos, y 4 anillos y combinaciones de los mismos.

12. El proceso según la reivindicación 8,
caracterizado porque al menos un aislado bacteriano produce
25 un agente tensioactivo durante las condiciones de

74

biocorrección.

13. El proceso según la reivindicación 12, caracterizado porque comprende el paso adicional para eliminar periódicamente una porción del agente tensioactivo
5 producido del suministro de tierra contaminada.

14. El proceso según la reivindicación 4, caracterizado porque el contaminante de petróleo incluye además hidrocarburos poliaromáticos.

15. El proceso según la reivindicación 14,
10 caracterizado porque los hidrocarburos poliaromáticos incluyen además hidrocarburos poliaromáticos seleccionados a partir del grupo que consiste en hidrocarburos poliaromáticos de 2 anillos, 3 anillos, y 4 anillos y combinaciones de los mismos.

15 16. Un proceso para tratar de tierra contaminada por plomo a fin de reducir la biodisponibilidad del plomo, caracterizado porque comprende:

proporcionar un suministro de la tierra contaminada por plomo;

20 proporcionar una corrección de tierra en forma de aproximadamente número 1% hasta aproximadamente número 5% o más de una apatita biológica;

añadir además a la tierra contaminada un inculante seleccionado a partir del grupo que consiste en
25 los números de acceso de ATCC PTA-5580, PTA-5581, y

72

RESUMEN

Se han identificado cepas novedosas de bacterias aisladas y purificadas que tienen la capacidad para degradar hidrocarburos de petróleo incluyendo una variedad de PAHs. Diversos aislados presentan también la capacidad para producir un bioagente tensioactivo. La combinación de la capacidad de producción de bioagente tensioactivo junto con la capacidad para degradar los PAHs mejora la eficiencia con la cual pueden degradarse los PAHs. Además, el bioagente tensioactivo proporciona también una capacidad adicional para unir iones de metal pesado para la eliminación de un ambiente de tierra o acuático.

15

20

25

74

74 75

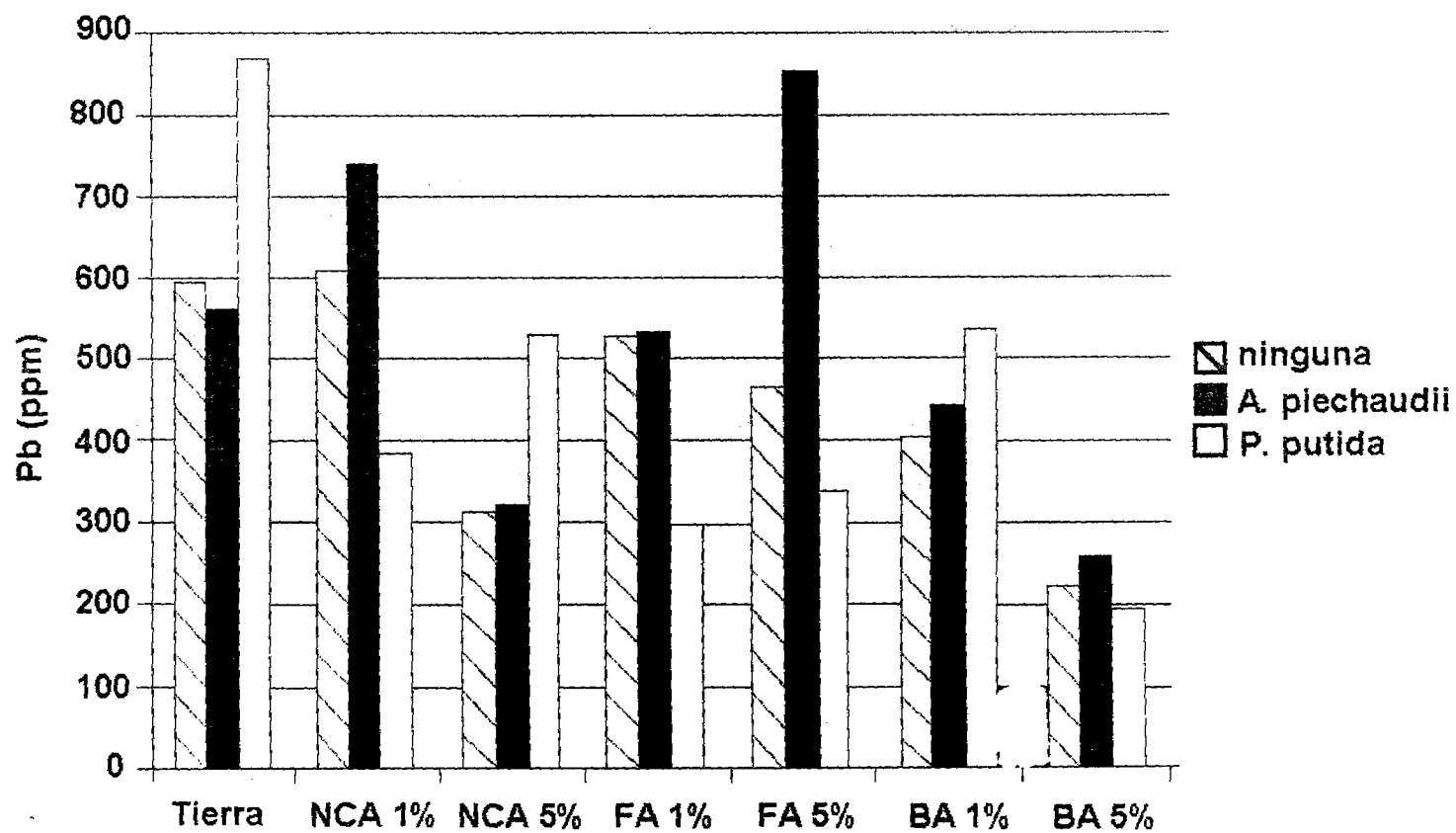


Fig. 1

1/2

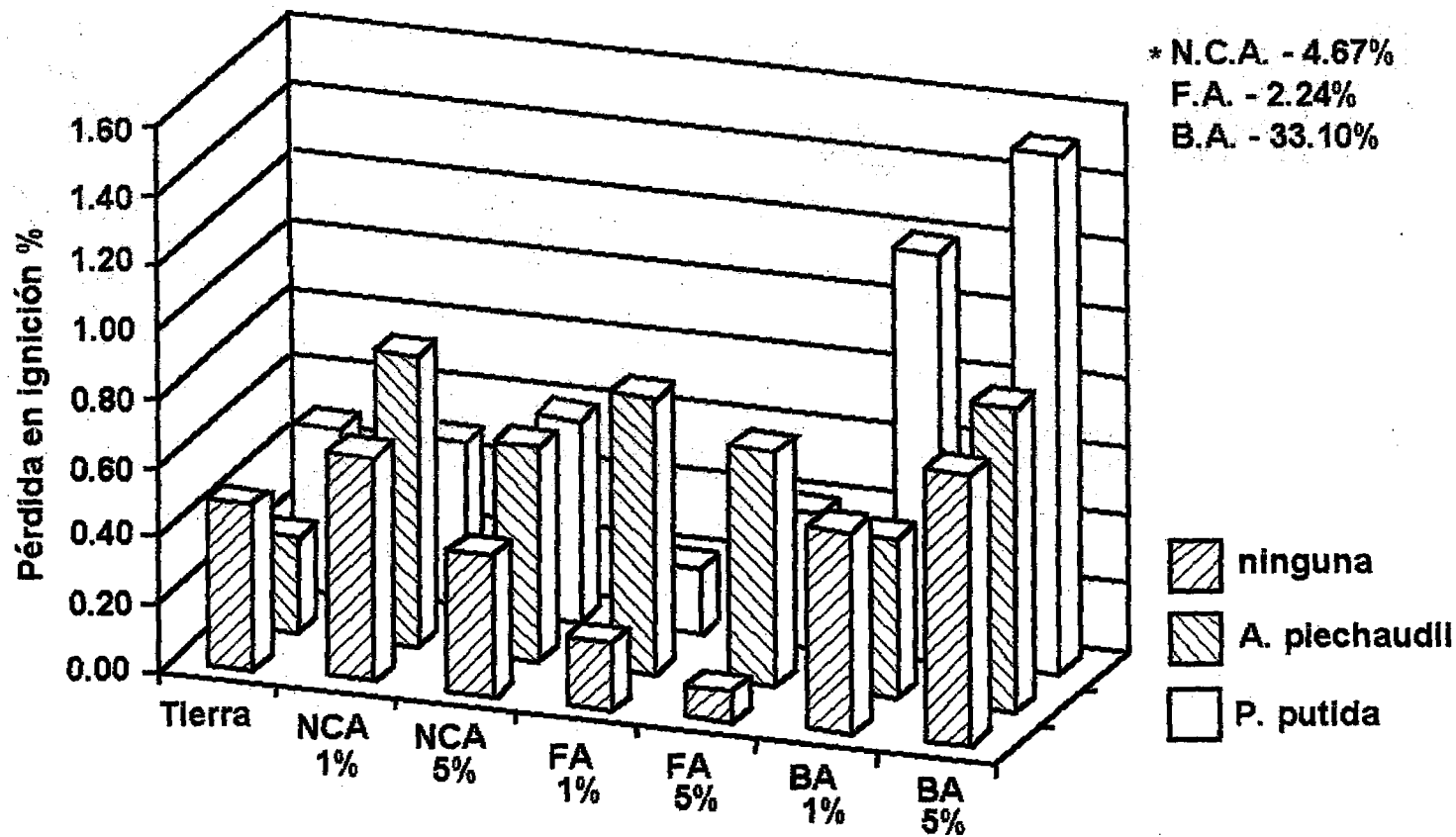


Fig. 2

7078
77

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-069903- -00000-0000

Fecha: 2007-07-10 16:18:01 Dep. 2020 NUECRACIONE
Tra. 11 PATENTEIYI Eve. 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 77



**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

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 ☐

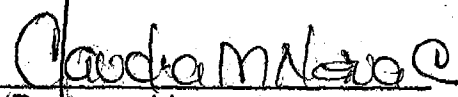
INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se 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 trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐


Firma Responsable

2979
78

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ D ALEMAN DILIA MARIA

REFERENCIA	Radicación No.	7 69903
	Solicitud internacional	PCT/US2005/003405
	Fecha inicio fase nacional	28/08/05
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	10386

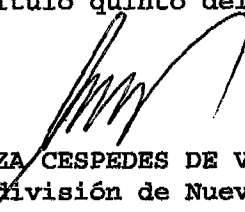
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, deben legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos 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 numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 31-AGO-2007
jfernand