

53

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-068859- -00002-0000

Fecha: 2008-10-23 15:12:01 Dep. 2020 NUECREACION  
Ha 2 PATENTES Lvs: 1 REGDEPOSITO  
Act 329 C/OINFORMACION Folios: 50

**Clarke, Modet & C°**

**COLOMBIA**

P-1335

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Ref.: Expediente No. 08.068.859  
Solicitud de Patente a nombre de  
**Universidad Tecnica Federico Santa Maria**

Yo, DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN, identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada de la sociedad **Universidad Tecnica Federico Santa Maria**, domiciliada en Valparaiso, Chile, solicitante de la patente de la referencia, atentamente me permito presentar copia certificada de la solicitud de Patente número 1982-2007 presentada en Chile el día 06 de julio de 2007.

Señor Superintendente,

DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN  
C.C. 41.654.882 de Bogotá.  
T.P. 20824 CSJ

# REPUBLICA DE CHILE



MINISTERIO DE ECONOMIA, FOMENTO Y RECONSTRUCCION

DEPARTAMENTO DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

## CERTIFICADO OFICIAL

El Jefe del Departamento de Propiedad Industrial y la Conservadora de Patentes que suscriben, certifican que las copias (48) adjuntas corresponden a una solicitud de Patente de Invencion.

N° 1982 - 2007

Presentada en Chile con fecha:

06 DE JULIO DE 2007

Danica Mardescic Stuardo  
Conservadora de Patentes

Christobal Acevedo Ferrer  
Jefe Departamento de Propiedad Industrial

Santiago, 17 de Julio de 2008

55



GOBIERNO DE CHILE  
SUBSECRETARIA DE ECONOMIA  
Departamento de Propiedad Industrial  
Departamento de Propiedad Industrial



SOL - CL200701982

USO EXCLUSIVO D.P.I.

|                         |                      |
|-------------------------|----------------------|
| 21 N° Solicitud         | 11 N° Registro       |
| 1982 - 2007             |                      |
| 43 Fecha de Publicación |                      |
| 22 Fecha de Solicitud   | 45 Fecha de Registro |

SOLICITUD DE PATENTE

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|----------------------------------|-------|--------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|----------------------------------|-------|--------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|----------------------------------|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>12 TIPO DE SOLICITUD</b><br><input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCION<br><input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD<br><input type="checkbox"/> DISEÑO INDUSTRIAL<br><input type="checkbox"/> DIBUJO INDUSTRIAL<br><input type="checkbox"/> ESQUEMAS DE TRAZADO O TOPOGRAFIA DE CIRCUITOS INTEGRADOS                                                                                                                                                                                                    | <b>PRIORIDAD</b><br><table border="0"><tr><td><input type="checkbox"/> 31 N°</td><td>_____</td></tr><tr><td><input type="checkbox"/> 32 FECHA</td><td>_____</td></tr><tr><td><input type="checkbox"/> 33 PAIS</td><td>_____</td></tr><tr><td><input type="checkbox"/> 31 N°</td><td>_____</td></tr><tr><td><input type="checkbox"/> 32 FECHA</td><td>_____</td></tr><tr><td><input type="checkbox"/> 33 PAIS</td><td>_____</td></tr><tr><td><input type="checkbox"/> 31 N°</td><td>_____</td></tr><tr><td><input type="checkbox"/> 32 FECHA</td><td>_____</td></tr><tr><td><input type="checkbox"/> 33 PAIS</td><td>_____</td></tr></table> | <input type="checkbox"/> 31 N° | _____ | <input type="checkbox"/> 32 FECHA | _____ | <input type="checkbox"/> 33 PAIS | _____ | <input type="checkbox"/> 31 N° | _____ | <input type="checkbox"/> 32 FECHA | _____ | <input type="checkbox"/> 33 PAIS | _____ | <input type="checkbox"/> 31 N° | _____ | <input type="checkbox"/> 32 FECHA | _____ | <input type="checkbox"/> 33 PAIS | _____ | <b>DOCUMENTOS ACOMPAÑADOS</b><br><input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN<br><input checked="" type="checkbox"/> MEMORIA DESCRIPTIVA<br><input checked="" type="checkbox"/> PLIEGO DE REIVINDICACIONES<br><input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS<br><input type="checkbox"/> PODER<br><input type="checkbox"/> CESIÓN<br><input type="checkbox"/> COPIA PRIORIDAD<br><input type="checkbox"/> PROTOTIPO<br><div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> CERTIFICADA<br/><input type="checkbox"/> TRADUCIDA AL ESPAÑOL</div> |
| <input type="checkbox"/> 31 N°                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | _____                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <input type="checkbox"/> 32 FECHA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | _____                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <input type="checkbox"/> 33 PAIS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | _____                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <input type="checkbox"/> 31 N°                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | _____                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <input type="checkbox"/> 32 FECHA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | _____                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <input type="checkbox"/> 33 PAIS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | _____                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <input type="checkbox"/> 31 N°                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | _____                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <input type="checkbox"/> 32 FECHA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | _____                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <input type="checkbox"/> 33 PAIS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | _____                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>54 TITULO O MATERIA DE LA SOLICITUD</b><br>BACTERIA DEGRADADORA DE HERBICIDAS DEL TIPO S-TRIAZINAS, UN PRODUCTO DE BIORREMEDIACION Y UN METODO DE APLICACIÓN.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>71 SOLICITANTE</b> (Razón Social y/o Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombres, Rut - Calle, Comuna, Ciudad, País - Teléfono, Correo Electrónico)<br>UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA<br>Av. España 1680<br>Valparaíso<br>CHILE                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>74 REPRESENTANTE</b> (Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombres, Rut - Calle, Comuna, Ciudad, País - Teléfono, Correo Electrónico)<br>CLARKE MODET & CO., CHILE<br>Huérfanos 835, Of. 1803 Piso 19<br>Tel: (56-2) 3699888<br>Fax: (56-2) 3609050<br>Info@clarkemodet.cl<br>SANTIAGO-CHILE                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>72 INVENTOR O CREADOR</b> (Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombres, Rut - Calle, Comuna, Ciudad, País - Teléfono, Correo Electrónico)<br>1.- HERNANDEZ, Marcela; Av. España 1680, Valparaíso, CHILE<br>2.- MORGANTE, Verónica; Av. España 1680, Valparaíso, CHILE<br>3.- VILLALOBOS, Patricio; Av. España 1680, Valparaíso, CHILE<br>4.- FLORES, Cecilia; Av. España 1680, Valparaíso, CHILE<br>5.- GONZALEZ, Myriam; Av. España 1680, Valparaíso, CHILE<br>6.- SEEGER, Michael; Av. España 1680, Valparaíso, CHILE |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <p>De conformidad con el Art. 44 de la Ley N° 19.039 sobre Propiedad Industrial, declaro/declaramos que los datos consignados en este formulario son verdaderos.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"><div style="width: 45%;"><p>_____<br/>Nombre y Firma Representante</p></div><div style="width: 45%;"><p>_____<br/>Nombre y Firma Solicitante</p></div></div>                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                |       |                                   |       |                                  |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

USO EXCLUSIVO D.P.I.



1er. PAGO

2do. PAGO

3er. PAGO

96



(19) GOBIERNO DE CHILE  
SUBSECRETARIA DE ECONOMIA  
Departamento de Propiedad Industrial

1982 2007

(12) TIPO DE SOLICITUD



INVENCION



PRECAUCIONAL

(11) N° REGISTRO



MODELO DE UTILIDAD

(43) Fecha de Publicación

(51) Int. Cl. \_\_\_\_\_

(21) Número de Solicitud

(22) Fecha de Solicitud

(30) Número de Prioridad (País, N° y Fecha)

(72) Nombre Inventor(es) (Incluir Dirección)

1.- HERNANDEZ, Marcela  
2.- MORGANTE, Verónica  
3.- VILLALOBOS, Patricio  
(otros en solicitud ficha)

(71) Nombre Solicitante (Incluir Dirección y Teléfono)

UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA  
Av. España 1680  
Valparaíso  
CHILE

(74) Representante (Incluir Dirección y Teléfono)

CLARKE MODET & CO. CHILE LTDA.  
HUERFANOS 835 OF. 1903 PISO.19  
Tel: (56-2) 3699888  
Fax (56-2) 3609050  
E-Mail: info@clarkemodet.cl  
Santiago-Chile

(54) Título de la Invención (Máximo 330 caracteres)

Bacteria degradadora de herbicidas del tipo s-triazinas, un producto de biorremediación y un método de aplicación.

(57) Resumen (Máximo 1600 caracteres)

Cepa bacteriana capaz de degradar completamente o mineralizar contaminantes del tipo s-triazinas, como la simazina, que corresponde a la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41, depositada bajo el número de acceso NRRL B-30908. Producto para la biorremediación de ambientes contaminados con compuestos s-triazinas, en donde el producto comprende un inóculo bacteriano de dicha cepa *Pseudomonas* sp. MHP41. Método para la biorremediación de un ambiente contaminado con s-triazinas, que utiliza dicho producto para la biorremediación



VISITENOS EN [www.dpi.cl](http://www.dpi.cl)  
LLENAR POR COMPUTADOR O MÁQUINA DE ESCRIBIR

57

## MEMORIA DESCRIPTIVA

### CAMPO DE APLICACIÓN

La presente invención se refiere a una cepa bacteriana que tiene la capacidad de degradar compuestos herbicidas pertenecientes a la familia de las s-triazinas.

Asimismo, se protege un producto que contiene este microorganismo y un método de aplicación de dicho producto para la biorremediación de ambientes contaminados con s-triazinas.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las s-triazinas son una familia de herbicidas, cuya estructura base es un compuesto heterocíclico aromático simétrico de 6 átomos que alterna átomos de carbono y nitrógeno. Dentro de los herbicidas s-triazinas se destacan la simazina y la atrazina entre otros compuestos, menos utilizados los que incluyen: hidroxisimazina, deetilhidroxisimazina, hidroxiatrazina, deetilatrazina, deetilhidroxiatrazina, deisopropilatrazina, fluoroatrazina, propazina, terbutilazina, ácido cianúrico y cianazina. Tanto la simazina (IUPAC: 6-cloro-N<sup>2</sup>,N<sup>4</sup>-dietil-1,3,5-triazina-2,4-diamina) como la atrazina (IUPAC: 6-cloro-N<sup>2</sup>-etil-N<sup>4</sup>-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina) son herbicidas s-triazina con un átomo de cloro unido al anillo heterocíclico.



El mecanismo de acción de esta familia de herbicidas comprende la inhibición del transporte de electrones en el proceso de la fotosíntesis.

Las s-triazinas, en especial la simazina y la atrazina han sido ampliamente empleados para el control de malezas en predios agrícolas en diferentes regiones del mundo. En predios agrícolas y forestales de Chile, la aplicación de simazina es habitual.

No obstante de su ventajoso uso como herbicidas, las s-triazinas constituyen contaminantes ambientales que pueden afectar la salud humana y a los ecosistemas. Se ha demostrado que atrazina, y otras s-triazinas, pueden inducir cáncer mamario en ratas, por lo que han sido clasificadas por la EPA como un "posible carcinógeno humano" de clase C (Tappe et al., 2002). Diversos ecosistemas han sido perturbados químicamente por el constante uso de herbicidas de la familia de las s-triazinas especialmente por la simazina y la atrazina. Por su alta movilidad estos compuestos pueden ocasionar graves problemas de contaminación de suelos llegando incluso a contaminar las napas subterráneas. Esto explica por qué frecuentemente, estos herbicidas exceden los niveles máximos permitidos en muestras de agua potable, los cuales son de  $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$  [es decir, 0,1 partes por billón (ppb)] en Europa y  $3 \mu\text{g l}^{-1}$  (3 ppb) permitidos por EPA Estados Unidos (Rousseaux et al., 2001).



59

A pesar de estos antecedentes, lejos de disminuir, la producción y venta global de herbicidas en el mundo siguen un ritmo creciente desde los años 1980. Las estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, realizadas durante los comienzos del siglo XXI revelan que el consumo de herbicidas, y en especial de las s-triazinas tanto en la Unión Europea como en América es elevado. Según estas estadísticas, las principales potencias exportadoras de herbicidas s-triazinas son los Estados Unidos, Francia y Alemania.

Según la Environmental Protection Agency (EPA) el mercado mundial de pesticidas durante los años 2000 y 2001 fue de más de 2,3 millones de toneladas. Sólo en Estados Unidos se consumieron 0,7 millones de toneladas durante los años 2000 y 2001, lo que representa aproximadamente el 40% del mercado mundial de herbicidas y más del 30% del mercado de pesticidas. En Estados Unidos, atrazina es el herbicida más empleado para control de malezas en cultivo de maíz, cítricos, viñedos y árboles frutales, mientras que simazina se emplea en mayor proporción en cultivos de maíz.

Debido al empleo masivo de s-Triazinas para el control de malezas, se han detectado la presencia de atrazina y simazina en aguas superficiales y subterráneas en países tales como Estados Unidos, Suiza, Sudáfrica y Alemania. En Chile según el Servicio Agrícola Ganadero (SAG), el con-



7

de plaguicidas durante el 2004 fue de aproximadamente 23.000 toneladas. Cultivos agrícolas de gran importancia en Chile son tratados con herbicidas pre-emergentes como la atrazina o la simazina. El empleo de estos herbicidas alcanzó las 350 toneladas representando el 10% del total de herbicidas empleados en el país. En el último tiempo el empleo masivo de agroquímicos ha motivado el estudio de ambientes potencialmente afectados por estos compuestos. Investigaciones a nivel nacional, reflejan la presencia de s-triazinas en aguas dulces de la región centro-sur, representando una problemática vigente.

Todo lo anterior nos indica que la contaminación ambiental con s-triazinas es un problema a nivel mundial, que debe atenderse con urgencia.

Una de las mejores estrategias para enfrentar la contaminación por s-triazinas es la biorremediación, empleando microorganismos capaces de degradar estos contaminantes en compuestos inocuos para el medio ambiente y la población. En distintos lugares del mundo se han aislados comunidades mixtas de microorganismos y cepas puras, como *Pseudaminobacter*, *Nocardioides* sp. y *Agrobacterium*. La cepa *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum y Wacket, 1996) es capaz de mineralizar s-triazinas gracias a procesos enzimáticos bien caracterizados en el estado del arte. Probablemente es la



#### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra una micrografía de *Pseudomonas* sp. MPH41. La micrografía fue obtenida por microscopía electrónica de transmisión. La barra representa 1  $\mu$ m.

La figura 2 muestra una fotografía de colonias de *Pseudomonas* sp. MPH41 crecida en una placa con medio mínimo y simazina como única fuente de nitrógeno. Se observa el crecimiento de las colonias y halos de degradación de simazina alrededor de las colonias.

La figura 3 muestra la curva de crecimiento de la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 utilizando simazina como única fuente de nitrógeno. Donde el crecimiento se evalúa por la turbidez del medio a 600 nm, la curva muestra el resultado de 3 experimentos independientes.

La figura 4 muestra un gel de agarosa donde se muestran los productos de amplificación por PCR utilizando partidores específicos para los genes degradadores de atrazina: atzA (carril 1), atzB (carril 2), atzC (carril 3), atzD (carril 4), atzE (carril 5) y atzF (carril 6) en la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41.

La figura 5 muestra el perfil de restricción del gen ribosomal 16S rRNA de las cepas *Pseudomonas* sp. MHP41 y *Pseudomonas* sp. ADP. Donde las líneas 2 y 5 corresponden a *Pseudomonas* sp. MHP41, las líneas 1 a 4 corresponden a



64

*Pseudomonas* sp. ADP y las líneas 3 y 6 corresponden a controles negativos de restricción.

La figura 6 muestra una cinética de degradación de simazina por la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41. Las curvas muestran el resultado de 3 experimentos independientes.

La figura 7 muestra el crecimiento y degradación de simazina por *Pseudomonas* sp. MHP41 encapsulada en matriz de alginato de sodio. A. Crecimiento de la cepa MHP41 encapsulada en matriz de alginato de sodio. B. Degradación de simazina en medio acuoso. Las microcápsulas fueron incubadas en medio mínimo AM con simazina como única fuente de nitrógeno. Cada punto es determinación de tres experimentos independientes.

La figura 8 muestra la cinética de degradación de *Pseudomonas* sp. MHP41 en experimentos de biorremediación en microcosmos de suelos sin historial de aplicación de simazina. En suelos inoculados con la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 a los 15 días se observa el 50% de la concentración inicial del herbicida mientras que suelos no tratados con *Pseudomonas* sp. MHP41 no se detecta atenuación del herbicida durante 28 días de experimentación.

La figura 9 muestra la cinética de degradación de *Pseudomonas* sp. MHP41 en experimentos de biorremediación en microcosmos de suelos con historial de aplicación de simazina. Sólo tres días post-aplicación de la cepa



65

*Pseudomonas* sp. MHP41 encapsulada fueron necesarios para atenuar el 50% de la concentración inicial del herbicida simazina. En suelos inoculados el 90% de la simazina aplicada se remueve en menos de 15 días. En suelos no inoculados la remoción de simazina demora al menos 25 días.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con una cepa bacteriana capaz de degradar compuestos s-triazinas, con un producto que contiene dicha cepa y con un método de biorremediación de ambientes contaminados con compuestos s-triazinas.

Como se utiliza en la presente invención el término "s-triazinas" representa una molécula cuya estructura base es un compuesto heterocíclico aromático simétrico de 6 átomos que alterna átomos de carbono y nitrógeno.

Como se utiliza en la presente invención el término "simazina" representa una s-triazina cuyos átomos de carbono están sustituidos por un átomo de cloro y dos grupos etilamino (IUPAC: 6-cloro-N<sup>2</sup>,N<sup>4</sup>-dietil-1,3,5-triazina-2,4-diamina).

Como se utiliza en la presente invención el término "atrazina" representa una s-triazina cuyos átomos de carbono están sustituidos por un átomo de cloro, un grupo etilamino y



66

un grupo isopropilamino (IUPAC: 6-cloro-N<sup>2</sup>-etil-N<sup>4</sup>-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina).

Como se utiliza en la presente invención el término "degradar" representa la descomposición por una vía metabólica de un compuesto químico, tal como un compuesto s-triazina para obtener una molécula de menor complejidad.

Como se utiliza en la presente invención el término "mineralizar" representa la descomposición biológica de un compuesto orgánico, tal como un compuesto s-triazina, hasta moléculas de mínima complejidad.

Como se utiliza en la presente invención el término "biorremediación" representa al método de tratamiento para tratar o remediar un ambiente o material considerado desecho contaminado, el cual se encuentra en un ambiente definido. Dicho tratamiento permite transformar dicho desecho en un material menos tóxico para el ambiente que lo comprende, o bien transformar dicho desecho en un material susceptible de ser metabolizado por un microorganismo o grupo de microorganismos, en donde dicho método de tratamiento comprende la aplicación de un organismo vivo, como un componente del método de tratamiento.

Como se utiliza en la presente invención el término "bacteria nativa" representa a una bacteria natural aislada desde suelos y cuya genética no ha sido manipulada.



Como se utiliza en la presente invención el término "inóculo" representa una suspensión concentrada de bacterias (células libres o encapsuladas), de concentración conocida (UFC/ml).

Como se utiliza en la presente invención el término "ribotipo" representa una tipificación de identidad y diferenciación de especies y subespecies bacterianas basadas en el análisis RFLP (de sus siglas en inglés, Restriction Fragment Length Polymorphism) del gen rRNA 16S.

Como se utiliza en la presente invención el término "solución tampón" representa una solución amortiguadora, que se caracteriza porque tiene la capacidad de mantener el pH ante la adición de un ácido o una base.

Como se utiliza en la presente invención el término "liofilizado" representa un inóculo de la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 sometido a un proceso de liofilización, método consistente en una rápida deshidratación al vacío y a bajas temperaturas, para lograr una mejor conservación del producto.

Como se utiliza en la presente invención el término "microcosmos" representa a un cierto volumen de suelo dispuesto en un recipiente, cuyas variables relevantes tales como la humedad, la temperatura y la presencia o ausencia de microorganismos y/o contaminantes orgánicos son conocidas y controladas.



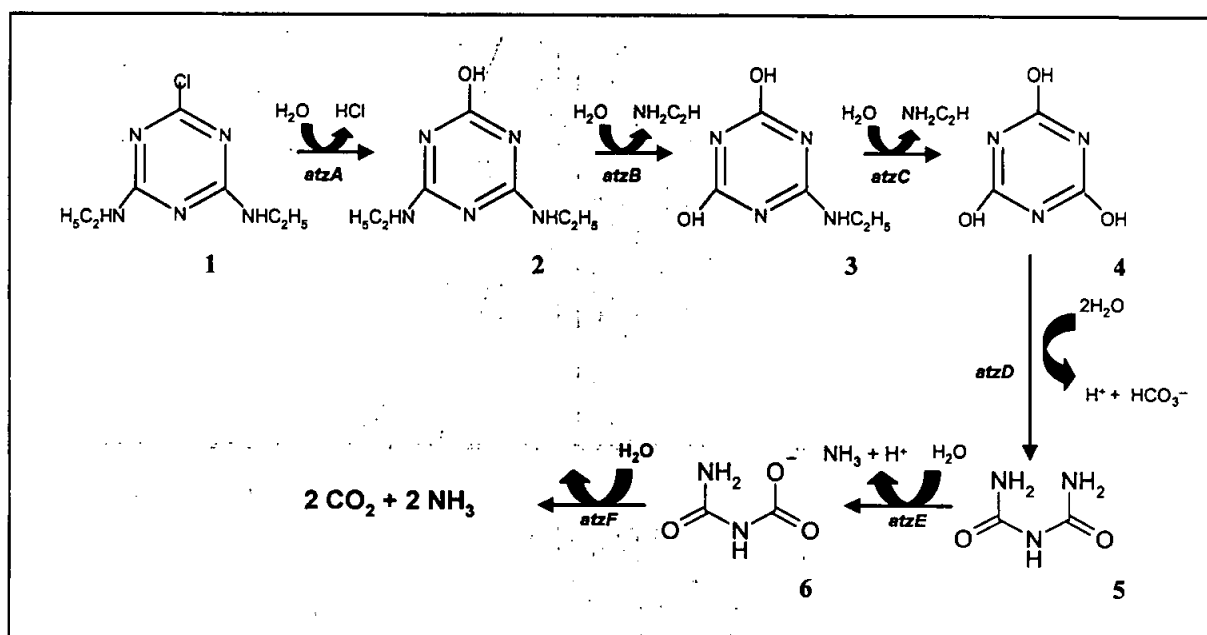
Para obtener una cepa bacteriana capaz de degradar compuestos s-triazinas se realizó una selección de microorganismos aislados de muestras de suelos agrícolas en un medio de cultivo teniendo simazina como única fuente de nitrógeno. Desde los cultivos crecidos se realizaron aislamientos de bacterias en placas con agar mínimo y simazina como única fuente de nitrógeno, y se aislaron colonias individuales desde las placas.

De esta manera se obtuvo una cepa nativa capaz de degradar compuestos s-triazinas, capaz de crecer utilizando simazina como única fuente de nitrógeno, la que se designó como MHP41. Pruebas posteriores, de análisis de la secuencia del gen de rRNA 16S, permitieron determinar que el género de la cepa aislada era *Pseudomonas*, por lo que finalmente la cepa se denominó *Pseudomonas* sp. MHP41.

Tal como se anticipó en la discusión de los antecedentes de la invención, en el estado del arte se conocen microorganismos que degradan s-triazinas, como la cepa *Pseudomonas* sp. ADP. En este microorganismo se ha estudiado y caracterizado la ruta de degradación de las s-triazinas, y se conocen los productos génicos y los genes involucrados. Es probable que cualquier cepa capaz de degradar s-triazinas utilice esta misma ruta, activando estos mismos genes. El esquema 1 representa el proceso de degradación bacteriana conocido para este tipo de compuestos.



Esquema 1.



La ruta superior de degradación del compuesto simazina (y otros herbicidas de la familia *s*-triazina, como el compuesto atrazina) comprende las enzimas codificadas por los genes *atzA*, *atzB* y *atzC*. La reacción de degradación la inicia la enzima atrazina clorohidrolasa (*AtzA*), codificada por el gen *atzA*. Esta enzima produce una descloración del compuesto simazina (1) formando el compuesto hidroxisimazina (2), el primer metabolito de la vía catabólica. Reacciones sucesivas catalizadas por las enzimas hidroxiatrazina etilaminohidrolasa (*AtzB*) -codificada por el gen *atzB*- e *N*-isopropilamelida-isopropilaminohidrolasa (*AtzC*) -codificada por el gen *atzC*- transforman la hidroxisimazina (2) al compuesto *N*-etilamelida (3) y finalmente, al compuesto ácido

70

cianúrico (4) marcando el fin de la ruta superior de degradación (de Souza et al., 1998). La ruta inferior de degradación de s-triazinas, en este caso, simazina comprende las enzimas ácido cianúrico amidohidrolasa (AtzD), biuret hidrolasa (AtzE) y alofanato hidrolasa (AtzF), que están codificados por los genes *atzD*, *atzE* y *atzF*, respectivamente. Estas enzimas transforman el compuesto ácido cianúrico en los compuestos biuret (5) y alofanato (6) hasta terminar en dióxido de carbono y amonio, completando la mineralización de simazina (de Souza et al., 1998; Cheng et al., 2005).

Se determinó que la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 posee los genes *atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE* y *atzF*, por lo que la ruta de degradación de s-triazinas de esta cepa es la misma que se ha descrito en el estado de la técnica.

Descripción de la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41.

La nueva cepa *Pseudomonas* sp. MHP41, es una cepa Gram negativa, forma bacilar, catalasa y oxidasa positiva y posee motilidad. Es capaz de crecer evidenciando halos de degradación en placas con simazina o atrazina.

Se identificó a la presente cepa por medio del análisis de Identificación Biolog, y por análisis de la secuencia del gen de rRNA 16S, dando como resultado que la cepa pertenece a las bacterias del género *Pseudomonas*.

Esta cepa es sensible a los antibióticos rifampicina, kanamicina, carbamicilina, tetraciclina, streptomina y posee resistencia natural a ampicilina.

El perfil metabólico de la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 se resume en Tabla 1.

Tabla 1

|                                                                     |                                 |                            |                               |
|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| Fuentes de Carbono en la cual crece <i>Pseudomonas</i> sp. MHP41    | Dextrina                        | Ácido Masónico             | L-Prolina                     |
|                                                                     | Glicógeno                       | Ácido Propiónico           | D-Serina                      |
|                                                                     | Tween 40                        | Ácido Químico              | L-Serina                      |
|                                                                     | Tween 80                        | Ácido Sebácico             | L-Treonina                    |
|                                                                     | N-acetil-D-glucosamina          | Ácido Succínico            | D,L-Carnitina                 |
|                                                                     | $\alpha$ -D-Glucosa             | Metil Piruvato             | Ácido $\gamma$ -Aminobutírico |
|                                                                     | Ácido Acético                   | Ácido Bromo succínico      | Ácido Urocánico               |
|                                                                     | Ácido cis-Acomítico             | L-Alaninamida              | Feniletilamina                |
|                                                                     | Ácido Cítrico                   | D-Alanina                  | Putresina                     |
|                                                                     | Ácido Fórmico                   | L-Alanina                  | 2-Aminoetanol                 |
|                                                                     | Ácido D-Glucónico               | L-Alanilglicina            | Mono-Metil-Succinato          |
|                                                                     | Ácido $\alpha$ -Hidroxibutírico | L-Asparagina               | L-Leucina                     |
|                                                                     | Ácido $\beta$ -Hidroxibutírico  | Ácido L-aspártico          | L-Omitina                     |
|                                                                     | Ácido Itacónico                 | Ácido L-glutámico          | Ácido $\alpha$ -Ketoglutárico |
|                                                                     | Ácido $\alpha$ -Ketobutírico    | Ácido Glicil-L-glutámico   | Ácido $\alpha$ -Ketoaléico    |
|                                                                     | Ácido D,L-Láctico               | Hidroxil-L-Prolina         |                               |
| Fuentes de Carbono en la cual no crece <i>Pseudomonas</i> sp. MHP41 | $\alpha$ -Ciclodextrina         | D-Melibiosa                | Ácido D-Sacárico              |
|                                                                     | N-acetil D-galactosamina        | $\beta$ -Metil D-Glucosida | Ácido Succinámico             |
|                                                                     | Adonitol                        | D-Psicososa                | Glucuronamida                 |
|                                                                     | L-Arabinosa                     | D-Rafinosa                 | Ácido Glicil-L-aspártico      |
|                                                                     | D-Arabitól                      | L-Ramosa                   | L-Histidina                   |



|  |                             |                                 |                                |
|--|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
|  | D-Celobiosa                 | D-Sorbitol                      | L-Fenilalanina                 |
|  | i-Eritritol                 | Sacarosa                        | Ácido L-Piroglutámico          |
|  | L-Fructosa                  | D-Tetralosa                     | Inosina                        |
|  | L-Fucosa                    | Turanosa                        | Uridina                        |
|  | D-Galactosa                 | Xilitol                         | Timidina                       |
|  | Gentiobiosa                 | Acido Malónico                  | 2,3-Butanediol                 |
|  | m-Inositol                  | Ácido Lactona D-Galactónico     | Glicerol                       |
|  | $\alpha$ -D-Lactosa         | Ácido D-Galacturónico           | D,L- $\alpha$ -Glicerolfosfato |
|  | Lactulosa                   | Ácido D-Glucosamínico           | Glucosa-1-Fosfato              |
|  | Maltosa                     | Ácido D-Glucurónico             | Glucosa-6-Fosfato              |
|  | D-Manitol                   | Ácido $\gamma$ -Hidroxibutírico | D-Manosa                       |
|  | Ácido p-hidroxifenilacético |                                 |                                |

Tabla 1. Fuentes de carbono en la cual crece y no crece la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41. Estudios en base a sistema de identificación Biolog.

La cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 posee los genes *atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE* y *atzF* de la degradación de s-triazinas que le confieren capacidad de degradar diversas s-triazinas (Tabla 2). La enzima *AtzA* cataliza la remoción hidrolítica de sustituyentes clorados y fluorados de las moléculas s-triazinas pero son incapaces de remover grupos ciano, azida, metoxi, tiometil, o amino de compuestos estructuralmente análogos a la simazina o atrazina.



23

Tabla 2

| Sustituyentes |                                     |                                       | s-triazinas           | Degradación |
|---------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|-------------|
| R1            | R2                                  | R3                                    |                       |             |
| Cl            | NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>   | NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>     | Simazina              | +           |
| OH            | NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>   | NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>     | Hidroxisimazina       | +           |
| OH            | NH <sub>2</sub>                     | NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>     | Deetilhidroxisimazina | +           |
| Cl            | NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>   | NHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>   | Atrazina              | +           |
| OH            | NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>   | NHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>   | Hidroxiatrazina       | +           |
| Cl            | NH <sub>2</sub>                     | NHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>   | Deetilatrazina        | +           |
| OH            | NH <sub>2</sub>                     | NHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>   | Deetilhidroxiatrazina | +           |
| Cl            | NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>   | NH <sub>2</sub>                       | Deisopropilatrazina   | +           |
| Cl            | NHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | NHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>   | Propazina             | +           |
| Cl            | NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>   | NHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>    | Terbutilazina         | +           |
| OH            | OH                                  | OH                                    | Acido cianúrico       | +           |
| Cl            | NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>   | NHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CN | Cianazina             | +           |
| F             | NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>   | NHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>   | Fluoroatrazina        | +           |

Tabla 2. Estructuras de compuestos s-triazinas degradados por cepa nativa *Pseudomonas* sp. MHP41.

La figura 1 muestra una micrografía de *Pseudomonas* sp. MPH41, bacteria de la presente invención. La micrografía fue obtenida por microscopía electrónica de transmisión.

La figura 2 muestra una fotografía de colonias de *Pseudomonas* sp. MPH41 obtenida durante crecimiento en placa con medio mínimo con simazina como única fuente de nitrógeno. Se observan alrededor de las colonias halos transparentes de degradación.

La figura 3 muestra la curva de crecimiento de la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41. Las células fueron crecidas en medio mínimo AM utilizando simazina a saturación como única



74

fuelle de nitrógeno y succinato como única fuente de carbono. El crecimiento fue monitoreado por mediciones de turbidez a 600 nm con un espectrofotómetro Lambda 11 (Perkin Elmer). Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes. Se observó crecimiento por parte de la cepa nativa *Pseudomonas* sp. MHP41 alcanzando su fase exponencial a las 24 horas aproximadamente de crecimiento y llegando a fase estacionaria con una turbidez de 0,8 ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml) a las 36 horas de crecimiento (Fig. 3).

En la figura 4 se pueden observar los seis genes de degradación de s-triazinas que posee la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 en un gel de agarosa con tinción con bromuro de etidio. La amplificación de los genes *atz* se realizó mediante la técnica PCR usando partidores específicos descritos previamente para cada uno de los seis genes (de Souza et al., 1998). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa (1,2%) en TBE (0,5X) y fueron teñidos con bromuro de etidio (Fig. 4).

Es importante indicar que la cepa aislada, divulgada en la presente invención, *Pseudomonas* sp. MHP41, es diferente a la cepa descrita en el estado del arte, *Pseudomonas* sp. ADP. Se encontró que *Pseudomonas* sp. MHP41 presenta importantes diferencias genéticas y fenotípicas con la cepa de referencia *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum et al., 1996). La cepa MHP41 posee una secuencia del gen que codifica



75

el RNA ribosomal (rRNA) 16S, que es diferente que el gen de la cepa ADP. Este es el gen más utilizado para determinar la taxonomía de bacterias. La cepa MHP41 se puede manipular genéticamente en el laboratorio, incorporando con alta frecuencia plásmidos de las series de incompatibilidad IncP, IncQ y Crípticos. Hasta la fecha no hay estudios que describan la modificación genética de la cepa *Pseudomonas* sp. ADP.

En la figura 5 se muestra el análisis de restricción con endonucleasas de las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican el rRNA 16S de la cepa nativa *Pseudomonas* sp. MHP41 y la cepa de referencia *Pseudomonas* sp. ADP. El análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de los genes que codifican el rRNA 16S se realizó mediante la digestión con las enzimas de restricción Msp-1 y Hha-1. La digestión con ambas enzimas genera diferencias en los perfiles de restricción de los genes rDNA 16S de las dos cepas. Por consiguiente, se concluye que *Pseudomonas* sp. MHP41 y *Pseudomonas* sp. ADP son ribotipos distintos (Fig. 5).

En una modalidad adicional, la presente invención tiene como objetivo proveer un producto y un método de tratamiento para la biorremediación de un ambiente contaminado con herbicidas s-triazinas, tales como simazina.



76

hidroxisimazina, deetilhidroxisimazina, atrazina,  
hidroxiatrazina, deetilatrazina, deetilhidroxiatrazina,  
deisopropilatrazina, fluoroatrazina, propazina,  
terbutilazina, acido cianúrico y cianazina.

El producto útil para la biorremediación de ambientes contaminados con herbicidas s-triazinas, proveído en la invención comprende un inóculo empleando la cepa nativa *Pseudomonas* sp. MHP41 y un medio de cultivo, una solución tampón o alginato de sodio. Donde dicho inóculo contiene una concentración conocida de la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 NRRL B-30908 desde alrededor de  $1 \times 10^3$  UFC/ml de medio de cultivo o de solución tampón hasta alrededor de  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml de medio de cultivo o de solución tampón o desde alrededor de  $1 \times 10^5$  UFC/g de alginato de sodio hasta alrededor de  $1 \times 10^{12}$  UFC/g de alginato de sodio. Es conveniente que la bacteria de la presente invención, haya sido crecida previamente en un medio mínimo con simazina como única fuente de nitrógeno.

En una modalidad preferida, el producto útil para la biorremediación de ambientes contaminados con herbicidas s-triazinas, comprende un inóculo empleando la cepa nativa *Pseudomonas* sp. MHP41, en donde las células bacterianas se encuentran encapsuladas en matriz de alginato de sodio dicha encapsulación le brinda protección a las células bacterianas frente a condiciones ambientales adversas y disminuye su exposición a compuestos tóxicos, aumentando de este modo su



28

estabilidad y viabilidad (Cassidy et al., 1996). Este producto para la biorremediación contiene un inóculo de la bacteria de la invención en una concentración de entre  $1 \times 10^5$  UFC/ g de alginato y  $1 \times 10^{12}$  UFC/ g de alginato.

En una modalidad adicional, el producto útil para la biorremediación de ambientes contaminados con herbicidas s-triazinas, comprende un inóculo empleando la cepa nativa *Pseudomonas* sp. MHP41, en donde las células bacterianas se encuentran liofilizadas, lo cual además facilita su transporte y comercialización. Para la obtención de este producto para la biorremediación, la bacteria ha sido preservada en estado latente por liofilización de una suspensión concentrada de bacterias con: un medio protector complejo estéril como suero de bovino, leche descremada en polvo o extracto de levadura, un aminoácido como el glutamato monosódico, un ácido graso como el meso-inositol así como un carbohidrato como glucosa, lactosa, rafinosa o manitol. El inóculo liofilizado puede ser directamente incubado en un medio de crecimiento líquido o sólido, preferentemente a 28°C durante alrededor de 48 h para recuperar las células activas. Después de este proceso de activación, las células previamente liofilizadas de *Pseudomonas* sp. MHP41 son capaces de degradar s-triazinas. Este producto para la biorremediación contiene un inóculo de la bacteria de la invención que resuspendido en un volumen adecuado, da una

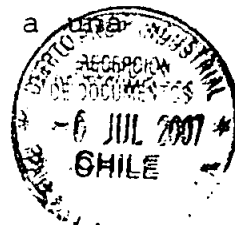


78

concentración de entre  $10^3$  UFC/ml de medio y  $10^{12}$  UFC/ml de medio.

El producto de la presente invención también puede formularse como una suspensión de la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 en un medio líquido de cultivo. Los expertos en el arte reconocerán que existen muchos medios de cultivos posibles de ser empleados para este propósito, cualquiera de ellos puede emplearse dentro del marco de la presente invención, especialmente se prefieren los medios mínimos descritos en la Tabla 3, incluida en el ejemplo 2 del presente escrito. Dicha suspensión contiene una concentración conocida de la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 NRRL B-30908 desde alrededor de  $1 \times 10^3$  UFC/ml hasta alrededor de  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml, en especial  $1 \times 10^5$  UFC/ml a  $1 \times 10^{12}$  UFC/ml.

En una de las modalidades de la invención, el método de biorremediación comprende la adición del producto que contiene células de la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41, al medio contaminado con compuestos s-triazinas, tales como por ejemplo la simazina. En el método de la presente invención, se permite que transcurra un periodo de tiempo suficiente para que dicha bacteria degrade completamente el compuesto s-triazina, tal como la simazina. El producto utilizado puede corresponder al inóculo de células de la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 encapsuladas en matriz de alginato de sodio, o a una



29

resuspensión activa del producto liofilizado de las células *Pseudomonas* sp. MHP41, o a la suspensión de un inóculo de *Pseudomonas* sp. MHP41 en un medio de cultivo. Una vez inoculado el producto de la invención en cualquiera de sus modalidades en el ambiente contaminado se debe dejar que actúe durante un periodo de tiempo suficiente, desde al menos 1 semana hasta alrededor de 12 meses, para permitir la degradación de dicho compuesto s-triazina contenido en dicho ambiente. Normalmente un período de tiempo de entre 1 y 4 semanas debería ser suficiente para una degradación efectiva de los contaminantes. Donde la concentración de la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 NRRL B-30908 en dicho ambiente contaminado, el que es habitualmente suelo, es desde alrededor de  $1 \times 10^2$  UFC/g de suelo hasta alrededor de  $1 \times 10^{12}$  UFC/g de suelo.

EJEMPLO 1: Aislamiento de la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41.

El aislamiento de *Pseudomonas* sp. MHP41 se realizó por enriquecimiento en simazina como única fuente de nitrógeno. Para ello se utilizó el medio mínimo denominado AM (Tabla 3) constituido por una fracción salina que aporta los micronutrientes, succinato como única fuente de carbono y simazina, a saturación como única fuente de nitrógeno. Para el cultivo de enriquecimiento inicial, se tomaron muestras de suelos agrícolas. Los cultivos se incubaron a 28°C y se

90

realizaron subcultivos. Desde los cultivos crecidos se realizaron aislamientos de bacterias en placas con agar mínimo y simazina como única fuente de nitrógeno. Se aislaron colonias individuales desde las placas. Estas cepas se conservaron en glicerol (20%) y a -24°C.

De esta manera se obtuvo la cepa nativa objetivo de la presente invención, *Pseudomonas* sp. MHP41, la cual mostró capacidad de crecer utilizando simazina como única fuente de nitrógeno. Esta cepa fue depositada en la colección de microorganismos Agricultural Research Culture Collection (NRRL) en Peoria, Illinois, Estados Unidos bajo el número de acceso NRRL B-30908, con fecha 17 de marzo de 2006.

EJEMPLO 2: Mantención y conservación del producto que contiene *Pseudomonas* sp. MHP41.

La cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 se mantiene viable en el laboratorio mediante cultivos en diferentes medios mínimos cuya composición se detalla en la Tabla 3.

Como métodos alternativos de conservación, para su mantención en el laboratorio e inoculación al suelo durante procesos de biorremediación, se implementó el proceso de encapsulación de la cepa en matriz de alginato de sodio y la liofilización según se describe previamente. Para el proceso de liofilización se utiliza un medio protector complejo estéril como suero de bovino, leche descremada en polvo



81

extracto de levadura, un aminoácido como el glutamato monosódico, un ácido graso como el meso-inositol, un carbohidrato como glucosa, lactosa, rafinosa o manitol, como así también glicerol o dimetisulfóxido.

En todos los medios de cultivo y métodos de conservación, la viabilidad y la capacidad biodegradativa de la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 no se ve afectada.

Tabla 3

| Nombre            | Composición (g/L)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Fuentes de Carbono y Nitrógeno                                                               |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| AM                | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,6 g; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,4 g; MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 0,2 g; NaCl 0,1 g; CaCl <sub>2</sub> 0,02 g; 20 ml de solución de elementos trazas que contiene (por litro): EDTA 2,5 g; ZnSO <sub>4</sub> 11,1 g; FeSO <sub>4</sub> 5 g; MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 1,54 g; CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O 0,4 g; Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O 0,25 g; Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> x 10H <sub>2</sub> O 0,18 g y H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5 ml.                                                                                                                      | Fuente de Carbono:<br>Succinato de sodio<br>2,5 mM.                                          |
| Medio Mínimo (MM) | 100 ml de tampón fosfato 10x, 2 ml de solución de microelementos 500x. Solución tampón fosfato 1x contiene (por litro): 70 g de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O, 28 g de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> y 5 g de NaCl. Solución de microelementos 500x contiene cada 100 ml: 5 g de MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O, 0,5 g FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O, 0,25 g MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, 0,32 g ZnCl <sub>2</sub> , 0,033 g CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O, 0,018 g CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O, 0,015 g CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, 0,325 g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 0,5 g EDTA, 7,3 ml de HCl 37%. | Fuente de Nitrógeno:<br>Simazina 0,5 mM.<br>Para medios sólidos<br>3 mM concentración final. |



82

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <b>BSMA</b>    | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 g; MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 0,5 g; FeCl <sub>3</sub> x H <sub>2</sub> O 10 mg; CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O 10 mg; MnCl <sub>2</sub> 0,1 mg; ZnSO <sub>4</sub> 0,01 mg.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |
| <b>Brunner</b> | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,44 g; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,52 g; MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 0,2 g; CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O 0,05 g; 10 ml solución traza de elementos que contiene (por litro): EDTA 0,5 g; FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 0,2 g; 100 ml de una solución traza de elementos que contiene (por litro): ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 0,1 g; MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O 0,03 g; H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 0,3 g; CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O 0,2 g; CuCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O 0,01 g; NiCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O 0,02 g; Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 0,03 g. |  |

Tabla 3. Formulación de medios mínimos para la  
mantención de la cepa nativa *Pseudomonas* sp. MHP41. Para la  
preparación de medios sólidos se debe suplementar con agar 15  
g/L.

EJEMPLO 3: Degradación del compuesto simazina por *Pseudomonas* sp. MHP41.

Se evaluó la capacidad de *Pseudomonas* sp. MHP41 para degradar el compuesto simazina. Para lo cual se cultivó la cepa bacteriana MHP41 en un medio AM empleando simazina como única fuente de nitrógeno a 30°C por 16-20 h hasta alcanzar fase exponencial turbidez a 600 nm de 0,3 (7x10<sup>7</sup> UFC/ml). Las células se centrifugaron y se lavaron en tampón fosfato de sodio [60 mM fosfato de sodio (pH 7,0), 0,5 g NaCl litro<sup>-1</sup>] y se resuspendieron en tampón U [10 mM fosfato de sodio (pH 7,0), 0,1 mM MgSO<sub>4</sub>] a una turbidez (600 nm) de 2,5.



93

3,0. Los cultivos se incubaron a 30°C con simazina a una concentración final de 0,06 mM. Como control se utilizó el medio de cultivo sin bacterias. Se tomaron muestras a intervalos de 15 minutos y éstas fueron centrifugadas por 1 minuto a 13.000 rpm. La concentración de simazina fue cuantificada por absorbancia a 225 nm empleando un espectrofotómetro. Se observó que la cepa es capaz de degradar hasta alrededor de un 50% el compuesto simazina al cabo de una hora de incubación. La figura 6 muestra una cinética de degradación de simazina por la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes (Fig. 6). La capacidad de degradar simazina se conserva al crecer la cepa MHP41 en diferentes fuentes de nitrógeno (Tabla 4).

Tabla 4

| Crecimiento<br>(Fuentes de<br>nitrógeno) | Degradación de<br>simazina |
|------------------------------------------|----------------------------|
| Amonio                                   | +                          |
| Nitrato                                  | ++                         |
| Urea                                     | ++                         |
| Acido cianúrico                          | +++                        |
| Simazina                                 | ++++                       |
| Atrazina                                 | ++++                       |

Tabla 4. Degradación de simazina por *Pseudomonas* sp. MHP41 crecidas en medio mínimo con diferentes fuentes de nitrógeno.



gm

EJEMPLO 4: Viabilidad y capacidad de degradación de simazina de *Pseudomonas* sp. MHP41 en matriz de alginato de sodio.

CC

Un cultivo de *Pseudomonas* sp. MHP41 de  $1 \times 10^8$  UFC/ml (turbidez a 600nm de 0,5) fue encapsulado en alginato de sodio 1% y las cápsulas estabilizadas en cloruro de calcio ( $9,3 \text{ gl}^{-1}$ ). Las cápsulas fueron mantenidas en  $\text{CaCl}_2$  y refrigeradas a  $4^\circ\text{C}$  hasta su utilización. La determinación de viabilidad fue realizada según se describe a continuación. 1 g de microcápsulas fue inoculado en medio mínimo AM 0,4X con simazina 0,5 mM. El medio mínimo 0,4X mantiene la integridad de la matriz de alginato de sodio. Se realizaron diluciones seriadas en NaCl 0,85% y se plaquearon en medio Agar Tripticasa Soya (TSA). Las placas de TSA fueron incubadas a  $30^\circ\text{C}$  y las colonias de *Pseudomonas* sp. MHP41 se contaron en las placas. La simazina se cuantificó por HPLC. Al inicio del experimento, se detectaron  $1,2 \times 10^7$  UFC/ml provenientes de las microcápsulas. El número de células viables se fue incrementando con el transcurso de los días hasta alcanzar  $3 \times 10^9$  UFC/ml a las 72 horas. El proceso de encapsulación con alginato de sodio 1% permite el crecimiento de *Pseudomonas* sp. MHP41, no afectando negativamente su viabilidad (Figura 7). Las muestras fueron extraídas con metanol/agua (80:20) para cuantificar el remanente de simazina en el medio mínimo AM. Al analizar las muestras por HPLC se observa que el potencial de degradación de simazina de *Pseudomonas* sp. MHP41

cuatro semanas. La humedad fue controlada semanalmente. La

486

muestras de suelo fueron utilizadas para determinaciones microbiológicas y analíticas por triplicado. Las muestras de suelo fueron utilizadas para el recuento de heterótrofos totales (RHT) en placas de agar tripticasa soya (TSA, OXOID). El método de NMP fue requerido para estimar la actividad catabólica de simazina en el suelo. La simazina fue cuantificada por HLPC previa extracción desde el suelo con solución metanol/agua (80:20).

En suelos no expuestos previamente a simazina, es decir suelos sin historial de aplicación del herbicida simazina (Figura 8), la bioaumentación con *Pseudomonas sp.* MHP41 incrementó el recuento de heterótrofos totales y la actividad catabólica de simazina respecto al tratamiento no inoculado. En los tratamientos no inoculados, no se detectó una población microbiana de suelo activa en la degradación de simazina y no se observó la remoción del herbicida. La bioaumentación con la cepa *Pseudomonas sp.* MHP41 incrementó la actividad catabólica de simazina y atenuó la concentración de simazina en suelo con un tiempo de vida medio de 15 días (Fig. 8).

Se observó que en suelos con historial de aplicación del herbicida simazina (Figura 9), el recuento de heterótrofos totales mostró cambios mínimos entre el tratamiento inoculado y no inoculado. Por otra parte, el tiempo de vida media de simazina en microcosmos no inoculados



98

fue de 11 días. El tiempo de vida media de simazina se redujo a 3 días cuando los suelos fueron bioaumentados. La atenuación completa de simazina en el tratamiento inoculado ocurrió a los 24 días (Fig. 9).

Con este ejemplo, podemos señalar que la cepa nativa *Pseudomonas* sp. MHP41 incrementa la actividad catabólica en ambos tipos de suelos con diferente historial de aplicación de simazina. Además, la adición de esta cepa encapsulada atenúa la concentración del herbicida en ambos suelos, por lo que puede ser utilizada en estrategias de biorremediación.

EJEMPLO 6: Biorremediación de simazina en suelos con la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 liofilizada.

Los experimentos de biorremediación a escala de microcosmos se realizaron a partir del producto *Pseudomonas* sp. MHP41 liofilizado, para evaluar el potencial biodegradativo de simazina en suelos agrícolas. Los inóculos en estado de latencia (liofilizados) de la cepa nativa MHP41 fueron activados en medio mínimo líquido AM y adicionados al suelo siguiendo el mismo esquema experimental descrito en el ejemplo 5. Se observó la atenuación de simazina, obteniéndose una reducción de dicho compuesto en suelos de aproximadamente 50% durante la primera semana de experimentación.



gg

Con este ejemplo, se demuestra que procesos de liofilización no afectan la capacidad de biodegradación del herbicida de la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 en suelos.

#### REFERENCIAS:

- Cassidy, M.B., H. Lee, and J. T. Trevors. 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. J Ind Microbiol Biotechnol 16:79-101.
- Cheng, G., Shapir, N., Sadowsky, M.J., and L. Wackett. 2005. Allophanate Hydrolase, not Urease, functions in bacterial cyanuric acid metabolism. Appl. Environ. Microbiol. 71:4437-4445-
- de Souza, M. L., J. Seffernick, B. Martinez, M. Sadowsky, and L. P. Wackett. 1998. The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. J. Bacteriol. 180:1951-1954.
- Mandelbaum, R. T. and L. P. Wackett. 1996. *Pseudomonas* strain for degradation of s-triazines in soil and water. United States Patent, Number 5,508,193. Estados Unidos.
- Rousseaux, S., A. Hartmann, and G. Soulas. 2001. Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. FEMS Microbiol. Ecol. 36:211-222.



29

- Tappe, W., J. Groeneweg and B. Jantsch. 2002. Diffuse atrazine pollution in German aquifers. Biodegradation 13:3-10.



32

90

### PLIEGO DE REIVINDICACIONES

1. Una cepa bacteriana capaz de degradar o mineralizar s-triazinas, CARACTERIZADA porque corresponde a la cepa de *Pseudomonas* sp. MHP41, depositada bajo el número de acceso NRRL B-30908 con fecha 17 de marzo de 2006.

2. Un producto para la biorremediación de ambientes contaminados con compuestos s-triazinas, CARACTERIZADO porque comprende un inóculo bacteriano de la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 NRRL B-30908, definida en la reivindicación 1 y un medio de cultivo, una solución tampón o alginato de sodio.

3. El producto para la biorremediación de acuerdo a la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque dicho inóculo contiene una concentración conocida de la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 NRRL B-30908 desde  $1 \times 10^3$  UFC/ml hasta  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml de medio de cultivo o de solución tampón o desde  $1 \times 10^5$  UFC/g hasta  $1 \times 10^{12}$  UFC/g de alginato de sodio.

4. El producto para la biorremediación de acuerdo a la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque dicho inóculo



21

contiene células liofilizadas de la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 NRRL B-30908 en un medio protector complejo estéril.

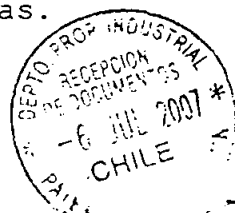
5. El producto para la biorremediación de acuerdo a la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque dicho inóculo contiene células encapsuladas en alginato de sodio de la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 NRRL B-30908.

6. Un método para la biorremediación de un ambiente contaminado con s-triazinas, CARACTERIZADO porque dicho método comprende:

a) agregar un producto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 a dicho ambiente contaminado con s-triazinas, y

b) incubar dicho producto que contiene el inóculo de la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 NRRL B-30908 en este ambiente contaminado, y dejar que este actúe durante un periodo de tiempo suficiente, desde al menos 1 semana hasta alrededor de 12 meses, para permitir la degradación de dicho compuesto s-triazina contenido en dicho ambiente.

7. Un método para la biorremediación de un ambiente contaminado con s-triazinas de acuerdo a la reivindicación 6, CARACTERIZADO porque dicho periodo de tiempo comprende un periodo desde 1 semana hasta 4 semanas.



42

8. Un método para la biorremediación de un ambiente contaminado con s-triazinas de acuerdo a la reivindicación 6, CARACTERIZADO porque la concentración de la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 NRRL B-30908 en dicho ambiente contaminado, el que es habitualmente suelo, es desde alrededor de  $1 \times 10^2$  UFC/g de suelo hasta alrededor de  $1 \times 10^{12}$  UFC/g de suelo.

9. Un método para la biorremediación de un ambiente contaminado con s-triazinas de acuerdo a la reivindicación 6, CARACTERIZADO porque dicha s-triazina presente en el ambiente contaminado es seleccionado del grupo que consiste de simazina, hidroxisimazina, deetilhidroxisimazina, atrazina, hidroxiatrazina, deetilatrazina, deetilhidroxiatrazina, deisopropilatrazina, fluoroatrazina, propazina, terbutilazina, ácido cianúrico y cianazina.

10. Un método de acuerdo a la reivindicación 9, CARACTERIZADA porque dicha s-triazina es una molécula que contiene un átomo de cloro.

11. Un método de acuerdo a la reivindicación 10, CARACTERIZADA porque dicha s-triazina es simazina.



40

93

12. Un método de acuerdo a la reivindicación 10,  
CARACTERIZADA porque dicha s-triazina es atrazina.

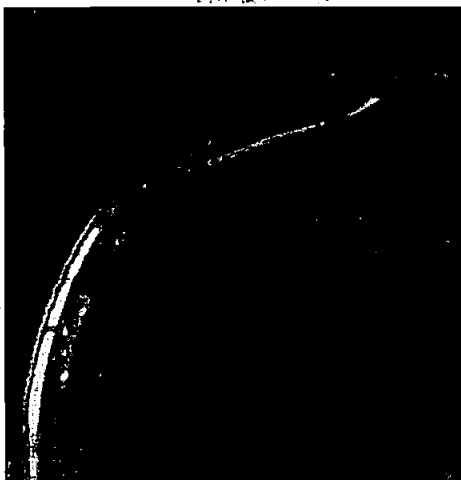


41

95

LAMINA 2/9

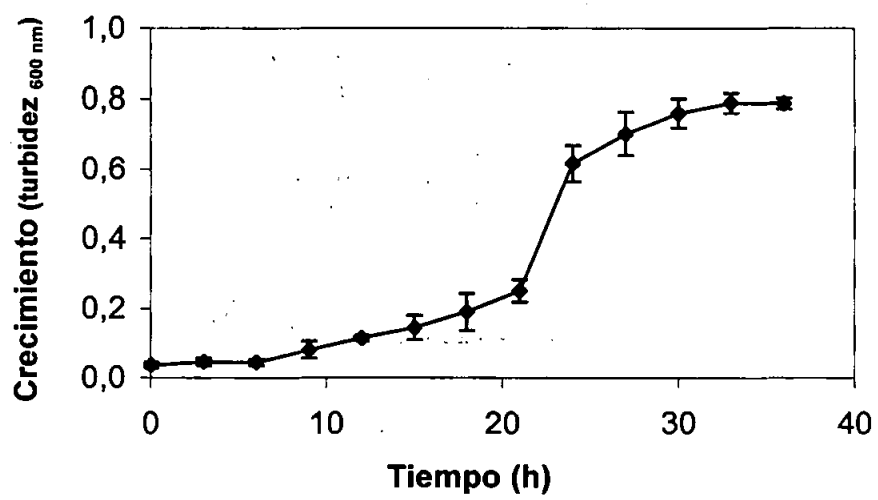
FIGURA 2



9/6

LAMINA 3/9

FIGURA 3

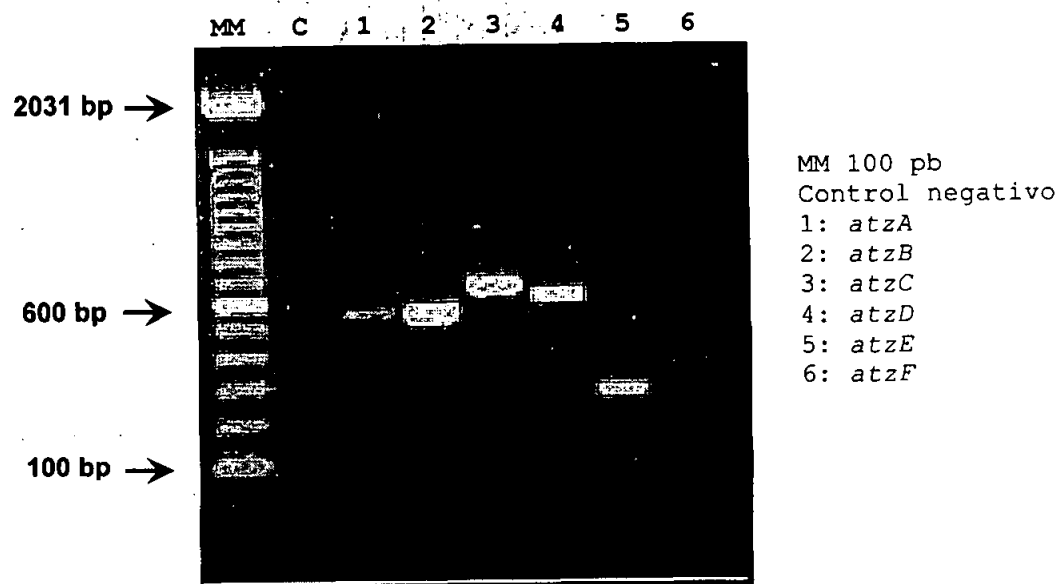


494

72

LAMINA 4/9

FIGURA 4



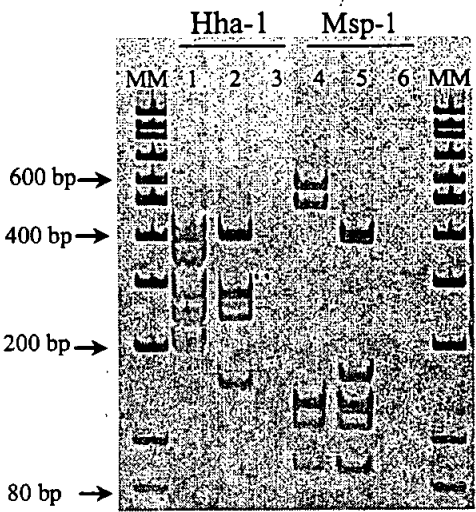
DEPTO PROP INDUSTRIAL  
RECEPCION  
DE DOCUMENTOS  
-6 JUL 2007 \*  
PAIS  
CHILE

48

98

LAMINA 5/9

FIGURA 5



MM: Marcador de peso molecular (100 pb)

Líneas 1 y 4: *Pseudomonas* sp. ADP

Líneas 2 y 5: *Pseudomonas* sp. MHP41

Líneas 3 y 6: controles negativos de restricción

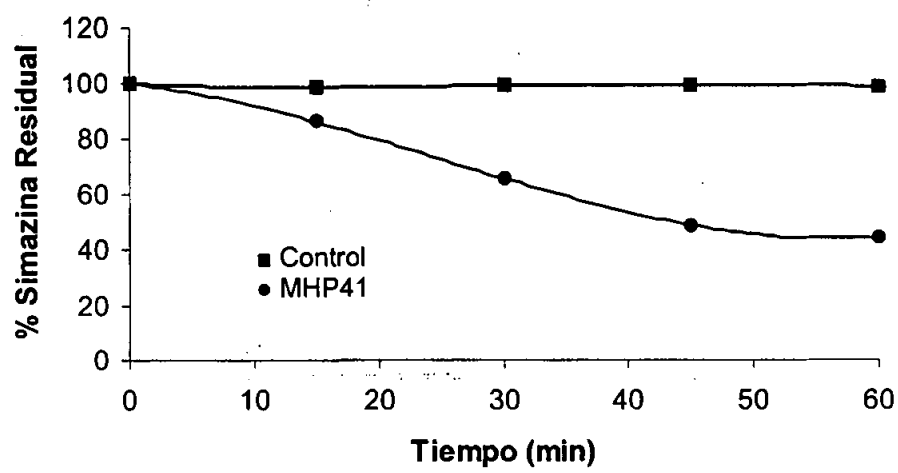
DEPTO. PROP. INDUSTRIAL  
RECEPCION  
DE DOCUMENTOS  
-6 JUL 2007 \*  
PAIS  
CHILE

46

99

LAMINA 6/9

FIGURA 6

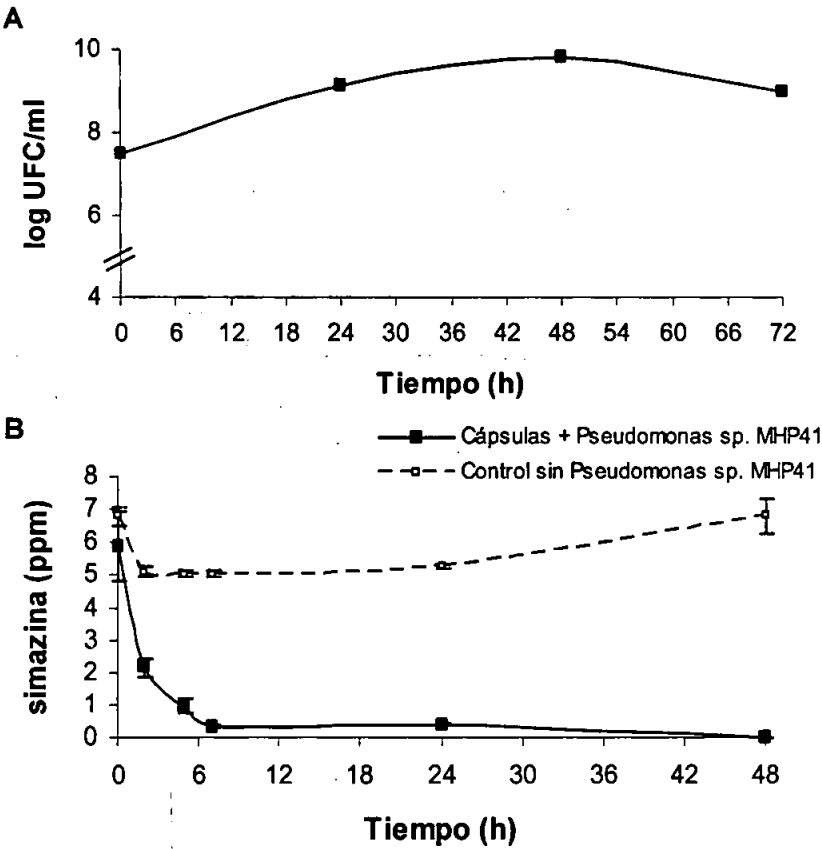


42

200

LAMINA 7/9

FIGURA 7

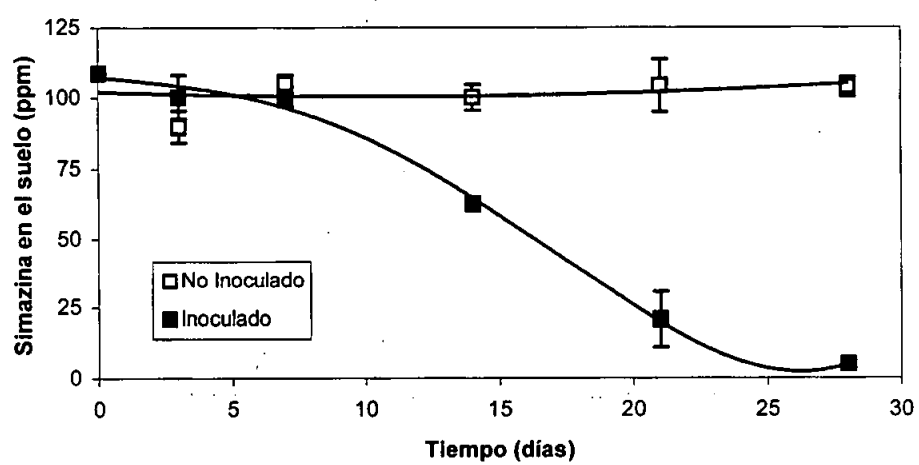


48

101

LAMINA 8/9

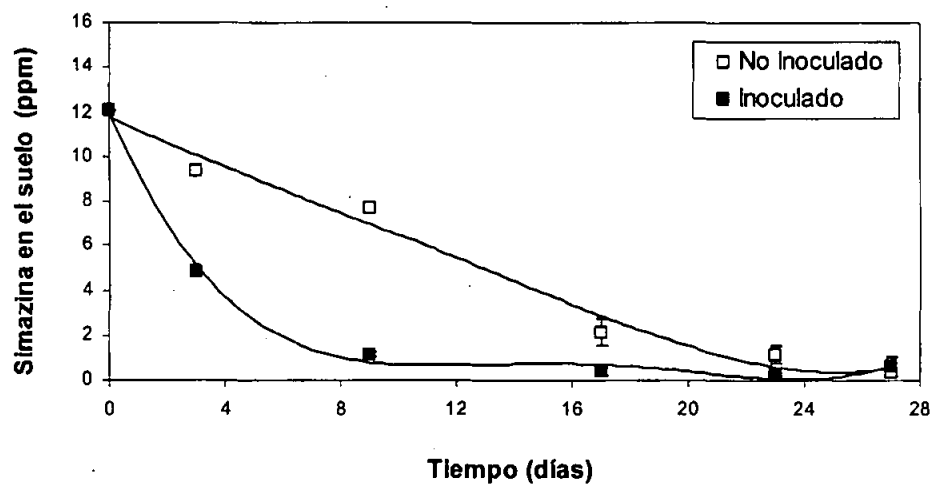
FIGURA 8



712

LAMINA 9/9

FIGURA 9



50

163

**Clarke, Modet & Cº**

COLOMBIA

P-1335

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES**

E.

S.

D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-068859- -00003-0000

Fecha: 2008-10-24 14:57:36 Dep: 2020 NUECREACION  
Tra: 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO  
Act: 467 SOLICIPRORROGA Folios: 2

Re: Expediente No. **08-068.859**  
Solicitud de Patente a nombre de  
**Universidad Tecnica Federico Santa Maria.**

Yo, DILIA MARÍA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la carrera 11 No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada en este negocio, atentamente solicito a usted se sirva conceder una prórroga de 2 meses para dar respuesta al oficio No. 10823 notificado por fijación en lista el 28 de agosto de 2008, relacionado con la solicitud de patente que se está tramitando bajo el expediente de la referencia.

Acompaño el recibo No. 08 - 83,420 de 22 de octubre de 2008, correspondiente a la tasa de la prórroga del término.

Señor Superintendente,

**DILIA MARÍA RODRIGUEZ D'ALEMAN**

C.C. 41.654.882 de Bogotá

T.P. 20.824 CSJ

104

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-068859- -00003-0000

Fecha: 2008-10-24 14:57:36 Dep: 2020 NUECREACION  
Tra: 2 PATENTES Eje: 1 REGDEPOSITO  
Act: 467 SOLICIPRORROGA Folios: 2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 83,420  
FECHA : OCTUBRE 22 DE 2008

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE               | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO | FECHA PGO  | Vr. PAGO      |
|---------------------------|--------------|-----------------|-----------|----------|------------|---------------|
| CLARKE MODET Y CO. COLOMB | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 94343303 | 21/10/2008 | 49,440,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------|-------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-08 | PRORROGA DE TERMINOS    | 75,000.00      |
|       |             | 31 PRORROGA DE TERMINOS | 75,000.00      |
|       |             | TOTAL :                 | \$ 75,000.00   |

SON: SETENTA Y CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : \_\_\_\_\_

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

P-1335



No. 08-068859- -00004-0000

Fecha 2008-11-21 15:39:35 Dep 2020 NULORLACION  
Ha 2 PATENTILS Lve 1 RLGDELPOSITO  
Act 444 RLSPLSTARLOQL Folios 3

P-1335

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES  
E. S. D.

Ref.: Expediente No. 08.068.859  
Solicitud de Patente a nombre de  
**Universidad Tecnica Federico Santa Maria**

Yo, DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN, identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada de la sociedad **Universidad Tecnica Federico Santa Maria**, domiciliada en Valparaiso, Chile, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. 10823 notificado por fijación en lista el día 28 de agosto de 2008, atentamente me permito presentar:

1. Copia auténtica del poder junto con el Certificado de Existencia y Representación Legal de dicha sociedad y con su respectiva traducción del inglés al español.
2. Documento(s) en que consta la cesión del derecho a la patente otorgada por los inventores a favor de mi mandante, junto con la traducción de las partes pertinentes del inglés al español.

Espero con esto haber dado cabal cumplimiento a lo solicitado por ese despacho y de conformidad con lo indicado en los artículos 3º., inciso 3, 35 inciso 2 y 59 inciso 2 del CCA, al analizar este memorial, atentamente ruego se traten todas las cuestiones planteadas con motivo del mismo.

Señor Superintendente,

DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN  
C.C. 41.654.882 de Bogotá.  
T.P. 20824 CSJ

Michael SEEGER

Cedentes /The Assignors

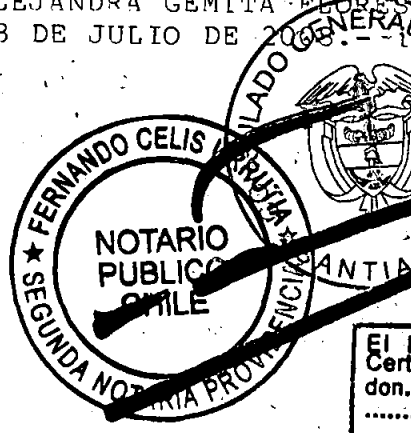
FIRMO ANTE MI en el anverso doña MARCELA TERESA HERNANDEZ GARCIA, C.N.I. 13.956.229-1.- Temuco, 23 Julio 2008.-

El Ministerio de Justicia de Chile  
Certifica la autenticidad de la firma de  
don Marcela Teresa Hernandez Garcia  
Santiago, 15 SEP 2008  
VICTORIA GÓMEZ LAGOS  
Oficial Subrogante de Legalizaciones



FIRMO ANTE MI DOÑA: CECILIA ALEJANDRA GEMITA FLORES DAZA FONDO ROTATORIO US\$ 15  
14.018.402-0.- PROVIDENCIA, 28 DE JULIO DE 2008.-

Legalizada en el Ministerio de Relaciones Exteriores de Chile  
Firma del Señor Cecilia Alejandra Gemita Flores Daza  
15 SEP 2008  
ALICIA FUENZALIDA GUTIERREZ  
Oficial de Legalizaciones



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA  
Santiago de Chile 16 SET. 2008 N° 7274  
El suscrito Consul General de Colombia CERTIFICA que el Sr. Alicia Fuenzalida Gutierrez que autoriza al presente a Cecilia Alejandra Gemita Flores Daza en la fecha allí expresada las funciones de Notario Subrogante de Legalizaciones DEL MINISTERIO DE JUSTICIA DE CHILE, que en el documento aparece como sujeto son los que se le han y acostumbra en sus funciones. El Consulado no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.  
Hatem Eduardo Dasuky  
Encargado de Relaciones Consulares

El Ministerio de Justicia de Chile  
Certifica la autenticidad de la firma de  
don FDO Cecilia  
Santiago 15 SEP 2008  
VICTORIA GÓMEZ LAGOS  
Oficial Subrogante de Legalizaciones

Firmo ante mi al anverso del presente documento, don **MICHAEL SEEGER REIFFER**, cédula nacional de identidad N° 9.647.091-6, don **PATRICIO HUMBERTO VILLALOBOS BIAGGINI**, cédula nacional de identidad N° 10.714.835-3, doña **MYRIAM LYDIA GONZÁLEZ VERGARA**, cédula nacional de identidad N° 5.880.575-0 y doña **VERONICA MAGALI MORGANTE**, cédula de identidad extranjeros N° 21.370.639-K. Valparaíso 30 de julio de 2008.ccg.

El Ministerio de Justicia de Chile  
Certifica la autenticidad de la firma de  
don Michael Seeger Reiffer  
Santiago 15 SEP 2008  
VICTORIA GÓMEZ LAGOS  
Oficial Subrogante de Legalizaciones



Firma del Señor  
06 NOV 2008



MARCOS JIMENEZ GAJARDO  
Oficial de Legalizaciones

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 661 888 - Fax: (57 1) 6350824 - Email: info@clarkemodet.com.co

PAGADO: IMPUESTO DE TIMBRE US\$ 7.000 FONDO ROTATORIO

CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA  
Santiago de Chile  
07 NOV. 2008 N° 3900  
El suscrito Cónsul General de Colombia CERTIFICA  
Que el Señor Marcos Jimenez que autoriza a don Jose Ramon Rodriguez Perez que presente documento ejercia legalmente en la fecha allí expresada las funciones de OFICIAL DE LEGALIZACIONES DEL MINISTERIO DE R.R.E.E. DE CHILE y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales.  
El Cónsul no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.  
RICHARD ALFONSO AGUILAR VILLA  
Cónsul General

Ministerio de Justicia de Chile  
Certifico la autenticidad de la firma de  
Santiago 06 NOV 2008  
VICTORIA GÓMEZ LAGOS  
Oficial Subrogante de Legalizaciones

### PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)  
José Rodríguez Pérez

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de  
**UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA**

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de Valparaíso, Chile

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en Av. España 1680 Valparaíso, CHILE por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

a los días de

Autorizo la firma de don JOSE RAMON RODRIGUEZ PEREZ, C.I. N° 6.299.240-9, en representación de UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA, Santiago, 06 de Noviembre del 2008.

### POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

legal representative(s) of

an organization existing under the laws of

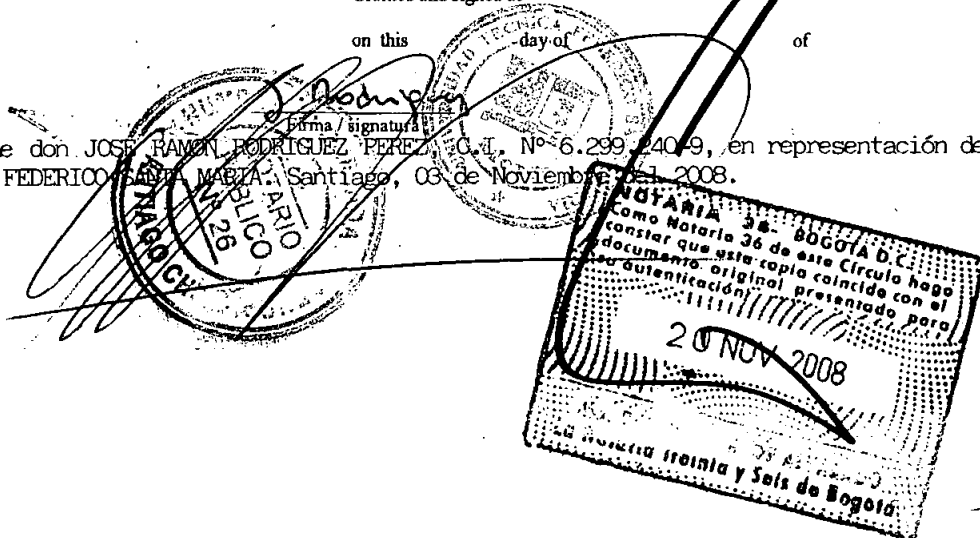
and in present execution of its business activities

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or renew any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models, Designs, plant varieties, Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin, as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or renew copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or renew temporary registrations, operating authorizations and/or licenses, as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

Granted and signed at

on this day of of



## CERTIFICADO NOTARIAL

(Cuando el solicitante es SOCIEDAD)

(Poderes otorgados en: El Salvador, Estados Unidos, México y Venezuela)

A los \_\_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, el Notario que suscribe DA FE de que:

1. \_\_\_\_\_  
(nombre de la persona que firma el poder)

mayor de edad y domiciliado en \_\_\_\_\_  
firmó de su puño

y letra el documento que antecede.

2. Conoce al (a la) otorgante y que este (a) está legalmente capacitado para el otorgamiento.

3. El otorgante ha firmado el referido documento en su carácter de

de la persona jurídica **UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA**

4. La citada persona jurídica con sede en Valparaíso, Chile, está legalmente constituida, que tiene actualmente existencia legal y que el acto para el cual se ha otorgado este poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5. El otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta, que esta es legítima y que está facultado para otorgar este poder.

6. Las anteriores certificaciones de los puntos 3, 4 y 5, me constan porque he tenido a la vista los documentos auténticos.

Notario Público.

NOTA: A continuación de lo anterior, el Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

**CERTIFICADO NOTARIAL (Cuando el solicitante es INDIVIDUO)**

A los \_\_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, el Notario que suscribe DA FE de que:

1. \_\_\_\_\_  
(nombre de la persona que firma el poder)

mayor de edad y domiciliado en \_\_\_\_\_  
firmó en su presencia

el documento que antecede, conoce al otorgante y que este está legalmente capacitado para el otorgamiento.

Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

Para todos los demás países el Señor Cónsul de Colombia o ante quien se otorgue, debe expedir una certificación dejando constancia 1) de la existencia legal de la sociedad, 2) de que esta ejerce actualmente su objeto social, y 3) de que la persona o personas que otorgan el poder están facultadas para hacerlo, dejando constancia así mismo de que tuvo a la vista las pruebas que acrediten tales circunstancias.

**LEGALIZACIÓN POR EL CONSUL DE COLOMBIA O POR APOSTILLA**

## NOTARIAL CERTIFICATE

(When the applicant is a CORPORATION)

(Powers of attorney granted in: El Salvador, Mexico, U.S.A. and Venezuela)

This \_\_\_\_\_ day of \_\_\_\_\_  
the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. \_\_\_\_\_  
(name of the person who signs the power of attorney)

of \_\_\_\_\_ legal \_\_\_\_\_ age \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_ domiciled in \_\_\_\_\_  
the foregoing document.

2. The grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.

3. The grantor has executed the foregoing document in his capacity of

of the juridical person \_\_\_\_\_

4. The mentioned juridical person with place of business in \_\_\_\_\_  
is duly organized, has actual legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. The grantor has in fact the referred quality and that his/her representation is legal and that he/she is empowered to grant this power of attorney.

6. I have based the above certifications 3, 4 and 5, on the authentic documents which for such purpose were exhibited to me.

Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

**NOTARIAL CERTIFICATE (When the applicant is an INDIVIDUALS)**

On this \_\_\_\_\_ day of \_\_\_\_\_  
the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. \_\_\_\_\_  
(name of the person who signs the Power of Attorney)

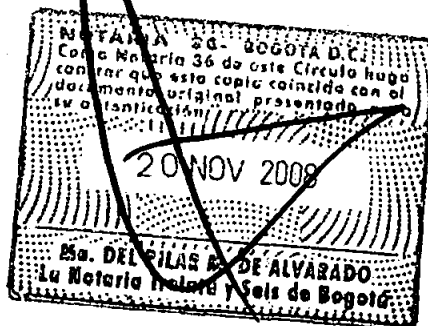
of legal age and domiciled at \_\_\_\_\_  
signed in his presence the foregoing document, the grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.

Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

For all other countries the Colombian Consul or before who it is granted must issue a certification stating 1) the legal existence of the corporation, 2) that the corporate purposes are actually being accomplished, 3) that the person or persons who grant this Power of Attorney are empowered to do it. The Consul will certify also that the documents evidencing those circumstances were exhibited to him.

**LEGALIZATION BY THE COLOMBIAN CONSUL OR BY APOSTILLE.**



**REPUBLICA DE COLOMBIA**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

Folio 108

2020  
Bogotá D.C.,

Doctor(a)  
RODRIGUEZ D<sup>a</sup> ALEMAN DILIA MARIA  
Apoderado(a) y/o Representante de  
UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

|            |                         |
|------------|-------------------------|
| REFERENCIA | Radicación No. 08 68859 |
|            | Trámite 2               |
|            | Evento 1                |
|            | Actuación 416           |
|            | Oficio No. 9101         |
|            | Folios 1                |

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la misma Decisión.

Siendo manifestación expresa del interesado de efectuar la publicación "inmediato", está se realizará en la próxima gaceta de Propiedad Industrial.

Cumplase  
Dado en Bogotá DC,

23 OCT. 2009

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

adpa10