



Organización y
Digitalización CSA Ltda.

OP
BT

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones



SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

08-68859

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO BACTERIA DEGRADADORA DE HERBICIDAS DEL TIPO S-TRIAZINAS, UN PRODUCTO
DE BIORREMEDIACION Y UN METODO DE APLICACION.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12 N 1/00, C12 S 13/00, C12 K 17/14.

71. SOLICITANTE UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

DOMICILIO VALPARAISO, CHILE

74. APODERADO DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D. C.,



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-068859- 00000-0000

Fecha: 2008-07-04 15:04:16 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 49

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

1 SOLICITUD DE:



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **UNIVERSIDAD TECNICA
FEDERICO SANTA MARIA**

Dirección: Av. España 1680, Valparaíso, Chile

Nacionalidad o Domicilio: Valparaíso, Chile.

Lugar de Constitución: Chile

Teléfono : Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN**

Dirección: Cra. 11 No. 86-53 piso 6

Teléfono: 6 162051/61 Fax: 6 161889

E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número 41.654.882 T.P. 20824
CSJ

4

INVENTORES (ES)
(72)

Nombre: **VER HOJA ANEXA**

Dirección:

Nacionalidad o Domicilio:

5 Título (54) **BACTERIA DEGRADADORA DE HERBICIDAS DEL TIPO S-TRIAZINAS, UN PRODUCTO
DE BIORREMEDIACIÓN Y UN MÉTODO DE APLICACIÓN.**

6 Clasificación Internacional (51) ~~A61~~ C12 N¹/00, C12 S¹³/00, C12 K¹⁷/14.

7 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen
CHILE

(32) Fecha
6 de julio de 2007

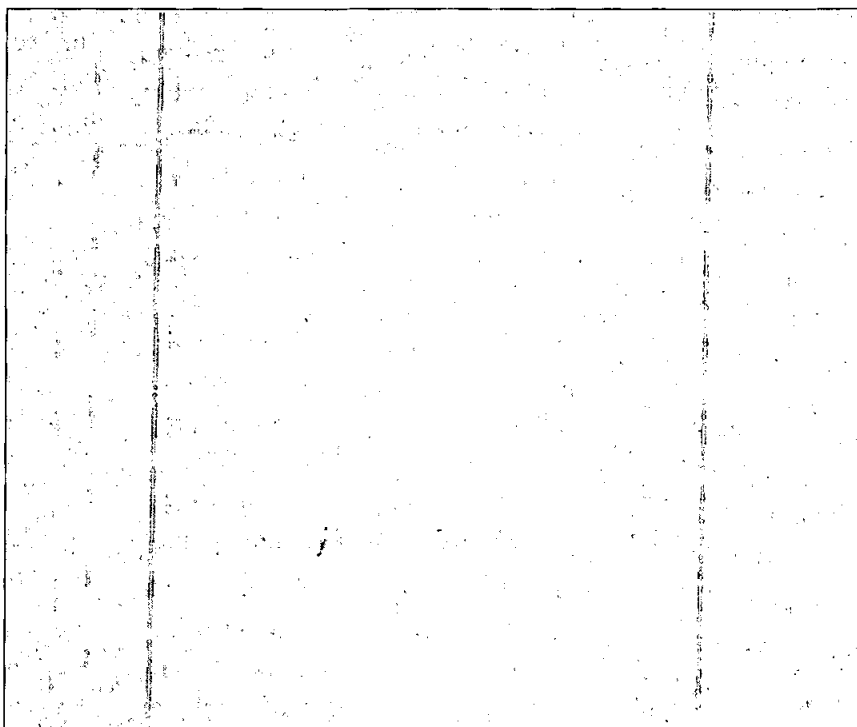
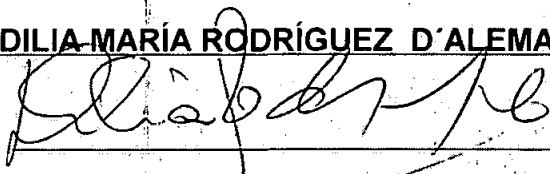
(31) Número de Solicitud
1982-2007

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

6 meses ☒ 12 meses ☐ 18 meses ☐ otros ☐ Cual

9 Comprobante de pago No. 08 - 43.911 // 08 - 43.923 // 08 - 49.880 // 08 - 49.881 // 08 - 49.768.
Fecha 04/06/08 // 04/06/08 // 20/06/08 // 20/06/08 // 20/06/08

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- ☐ Comprobante de pago por la reivindicación de prioridad
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Certificado de la fecha de presentación de la solicitud prioridad expedida por la autoridad correspondiente y una copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Resumen
- ☐ Descripción de la invención.
- ☐ Una o más reivindicaciones
- ☐ Dibujos y/o planos necesarios
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

11 FIGURA CARACTERÍSTICANOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMANFIRMA: 

C.C. 41.654.882

T.P. 20824

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-068859- -00000-0000

Fecha: 2008-07-04 15:04:16

Dep. 2020 NUECREACION

Tra. 2 PATENTES

Eve: 1 REGDEPOSITO

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 49

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 43,911
FECHA : JUNIO 4 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	3418225	03/06/2008	39,390,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-06	REGISTRO DE CESION, CAMBIO NOM	
		13 NOMBRES Y ENSENAS COMERCIALES, MAR	253,000.00
		TOTAL :	\$ 253,000.00

SON: DOSCIENTOS CINCUENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

P-1335
2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 08 - 43,923
FECHA : JUNIO 4 DE 2008



***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODEI Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	3418225	03/06/2008	39,390,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL : \$ 226,000.00

SON: DOSCIENTOS VEINTISEIS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

P-7335
3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 49,880
FECHA : JUNIO 20 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-068859- -00000-0000

Fecha: 2008-07-04 15:04:16 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 49

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLUMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	3418236	20/06/2008	46,620,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	21 CERTIFICACIONES
			11,000.00
		TOTAL :	\$ 11,000.00

SON: ONCE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

P-1335

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-068859.-00000-0000

Fecha: 2008-07-04 15:04:16 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 49

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 49,981
FECHA : JUNIO 20 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	3418236	20/06/2008	46,620,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO	
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	21 CERTIFICACIONES	11,000.00
TOTAL :				\$ 11,000.00

SON: ONCE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

P-1335



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 49,768
FECHA : JUNIO 20 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	3418236	20/06/2008	46,620,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	140,000.00
	TOTAL :	\$ 140,000.00

SON: CIENTO CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

P-1335

ANEXOS

INVENTORES

1.)

HERNÁNDEZ, Marcela

(Av. España 1680, Valparaíso, Chile);

2.)

MORGANTE, Verónica

(Av. España 1680, Valparaíso, Chile);

3.)

VILLALOBOS, Patricio

(Av. España 1680, Valparaíso, Chile);

4.)

FLORES, Cecilia

(Av. España 1680, Valparaíso, Chile);

5.)

GONZÁLEZ, Myriam

(Av. España 1680, Valparaíso, Chile);

6.)

SEEGER, Michael

(Av. España 1680, Valparaíso, Chile).

RESUMEN

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.

1

BACTERIA DEGRADADORA DE HERBICIDAS DEL TIPO S-TRIAZINAS,
UN PRODUCTO DE BIORREMEDIACIÓN Y UN MÉTODO DE
APLICACIÓN.

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^2, N^4 -dietil-1,3,5-triazina-2,4-diamina) como la atrazina (IUPAC: 6-cloro- N^2 -etil- N^4 -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 en Estados Unidos (Rousseaux et al, 2001).

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 consumo 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 aislado 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 cepa mejor caracterizada a escala molecular y es uno de los microorganismos degradadores más conocidos de atrazina.

No obstante, persiste en la técnica la necesidad de contar con alternativas eficientes para degradar las s-triazinas presentes en el medio ambiente.

~~Nosotros~~ Mediante la presente invención se ha resuelto dicho problema técnico seleccionando una bacteria nativa capaz de degradar s-triazinas, la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41, y desarrollando un producto que comprende dicha cepa y un método para la biorremediación de un ambiente contaminado con s-triazinas que emplea dicho producto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención protege una cepa bacteriana que tiene la capacidad de degradar herbicidas s-triazinas.

En un aspecto de la presente invención, dichos compuestos s-triazinas se seleccionan del grupo formado por compuestos clorados. Donde dichas s-triazinas cloradas se seleccionan de simazina y atrazina.

En una modalidad preferida de la invención, dicha cepa bacteriana corresponde a la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41, depositada en una colección de microorganismos denominada 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, la cual es capaz de crecer y degradar completamente el compuesto simazina.

La presente invención, además, protege un producto que contiene este microorganismo.

La presente invención también comprende un método para el tratamiento o biorremediación de un ambiente contaminado con compuestos s-triazinas, en donde dicho método comprende las etapas de: i) agregar la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 NRRL B-30908 a dicho ambiente contaminado con compuestos s-triazinas, en donde dicha bacteria es capaz de degradar dichos compuestos, e ii) incubar dicha cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 NRRL B-30908 en el ambiente contaminado durante un periodo de tiempo adecuado para permitir la degradación de los compuestos s-triazinas presentes en el medio,

obteniéndose de este modo la biorremediación del ambiente.

La presente invención protege la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 NRRL B-30908, una cepa bacteriana nativa y aislada de suelo. Es una bacteria del género *Pseudomonas* que se cultiva sin dificultades en el laboratorio, y que tiene un rápido crecimiento llegando a altas densidades celulares. Esta cepa crece a 30°C desde una turbidez a 600 nm de 0,082 (1×10^5 UFC/ml) hasta una turbidez a 600 nm de 1,012 (2×10^8 UFC/ml) en medio mínimo con simazina como única fuente de nitrógeno.

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 μ 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 *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 *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^2, N^4 -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 un grupo isopropilamino (IUPAC: 6-cloro- N^2 -etil- N^4 -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.

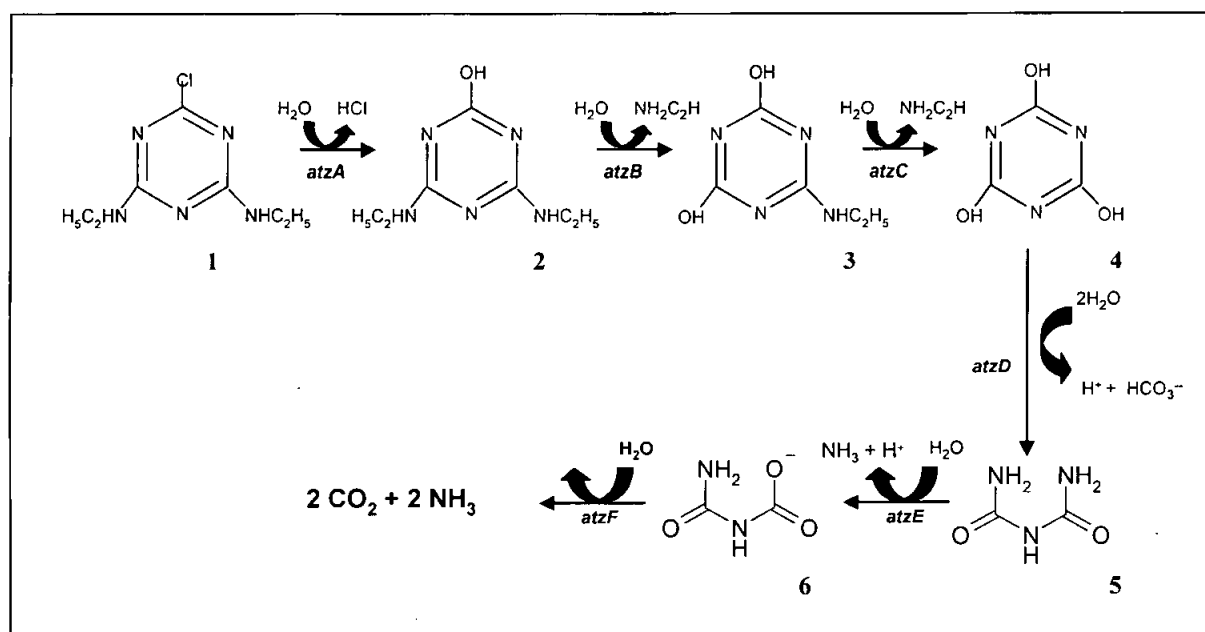
Para obtener una cepa bacteriana capaz de degradar compuestos s-triazinas se realizó una selección de microorganismos aislados de muestras de suelos agrícolas en un medio de cultivo teniendo simazina como única fuente de nitrógeno. Desde los cultivos crecidos se realizaron aislamientos de bacterias en 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 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, streptomycin 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		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
	α -D-Glucosa	Metil Piruvato	Ácido γ -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 α -Hidroxibutírico	L-Asparagina	L-Leucina

	Ácido β -Hidroxibutírico	Ácido L-aspártico	L-Omitina
	Ácido Itacónico	Ácido L-glutámico	Ácido α -Ketoglutárico
	Ácido α -Ketobutírico	Ácido Glicil-L-glutámico	Ácido α -Ketoaléxico
	Ácido D,L-Láctico	Hidroxi-L-Prolina	
Fuentes de Carbono en la cual no crece <i>Pseudomonas</i> sp. MHP41	α -Ciclodextrina	D-Melibiosa	Ácido D-Sacárico
	N-acetil D-galactosamina	β -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
	α -D-Lactosa	Ácido D-Galacturónico	D,L- α -Glicerolfosfato
	Lactulosa	Ácido D-Glucosamínico	Glucosa-1-Fosfato
	Maltosa	Ácido D-Glucurónico	Glucosa-6-Fosfato
	D-Manitol	Ácido γ -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.

Tabla 2

Sustituyentes			s-triazinas	Degradación
R1	R2	R3		
Cl	NHCH ₂ CH ₃	NHCH ₂ CH ₃	Simazina	+
OH	NHCH ₂ CH ₃	NHCH ₂ CH ₃	Hidroxisimazina	+
OH	NH ₂	NHCH ₂ CH ₃	Deetilhidroxisimazina	+
Cl	NHCH ₂ CH ₃	NHCH(CH ₃) ₂	Atrazina	+
OH	NHCH ₂ CH ₃	NHCH(CH ₃) ₂	Hidroxiatrazina	+
Cl	NH ₂	NHCH(CH ₃) ₂	Deetilatrazina	+
OH	NH ₂	NHCH(CH ₃) ₂	Deetilhidroxiatrazina	+
Cl	NHCH ₂ CH ₃	NH ₂	Deisopropilatrazina	+
Cl	NHCH(CH ₃) ₂	NHCH(CH ₃) ₂	Propazina	+
Cl	NHCH ₂ CH ₃	NHC(CH ₃) ₃	Terbutilazina	+
OH	OH	OH	Acido cianúrico	+
Cl	NHCH ₂ CH ₃	NHC(CH ₃) ₂ CN	Cianazina	+
F	NHCH ₂ CH ₃	NHCH(CH ₃) ₂	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 fuente 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 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 plasmidios 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, hidroxisimazina, deetilhidroxisimazina, atrazina, hidroxiatrazina, deetilatrazina, deetilhidroxiatrazina, deisopropilatrazina, fluoroatrazina, propazina, terbutilazina, ácido 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 1×10^3 UFC/ml de medio de cultivo o de solución tampón hasta alrededor de 1×10^{15} UFC/ml de medio de cultivo o de solución tampón o desde alrededor de 1×10^5 UFC/g de alginato de sodio hasta alrededor de 1×10^{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 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 1×10^5 UFC/ g de alginato y 1×10^{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 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 1×10^3 UFC/ml hasta alrededor de 1×10^{15} UFC/ml, en especial 1×10^5 UFC/ml a 1×10^{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 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 periodo 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 1×10^2 UFC/g de suelo hasta alrededor de 1×10^{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

fuelle 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 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 o 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 ₂ HPO ₄ 1,6 g; KH ₂ PO ₄ 0,4 g; MgSO ₄ x 7H ₂ O 0,2 g; NaCl 0,1 g; CaCl ₂ 0,02 g; 20 ml de solución de elementos trazas que contiene (por litro): EDTA 2,5 g; ZnSO ₄ 11,1 g; FeSO ₄ 5 g; MnSO ₄ x H ₂ O 1,54 g; CuSO ₄ x 5H ₂ O 0,4 g; Co(NO ₃) ₂ x 6H ₂ O 0,25 g; Na ₂ B ₄ O ₇ x 10H ₂ O 0,18 g y H ₂ SO ₄ 5 ml.	Fuente de Carbono: Succinato de sodio 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 ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 28 g de KH ₂ PO ₄ y 5 g de NaCl. Solución de microelementos 500x contiene cada 100 ml: 5 g de MgSO ₄ x 7H ₂ O, 0,5 g FeSO ₄ x 7H ₂ O, 0,25 g MnSO ₄ x H ₂ O, 0,32 g ZnCl ₂ , 0,033 g CaCl ₂ x 2H ₂ O, 0,018 g CuSO ₄ x 5H ₂ O, 0,015 g CoCl ₂ x 6 H ₂ O, 0,325 g H ₃ BO ₃ , 0,5 g EDTA, 7,3 ml de HCl 37%.	Fuente de Nitrógeno: Simazina 0,5 mM. Para medios sólidos 3 mM concentración final.
BSMA	K ₂ HPO ₄ 0,5 g; MgSO ₄ x 7H ₂ O 0,5 g; FeCl ₃ x H ₂ O 10 mg; CaCl ₂ x H ₂ O 10 mg; MnCl ₂ 0,1 mg; ZnSO ₄ 0,01 mg.	

Brunner	Na ₂ HPO ₄ 2,44 g; KH ₂ PO ₄ 1,52 g; MgSO ₄ x 7H ₂ O 0,2 g; CaCl ₂ x 2H ₂ O 0,05 g; 10 ml solución traza de elementos que contiene (por litro): EDTA 0,5 g; FeSO ₄ x 7H ₂ O 0,2 g; 100 ml de una solución traza de elementos que contiene (por litro): ZnSO ₄ x 7H ₂ O 0,1 g; MnCl ₂ x 4H ₂ O 0,03 g; H ₃ BO ₃ 0,3 g; CoCl ₂ x 6H ₂ O 0,2 g; CuCl ₂ x 2H ₂ O 0,01 g; NiCl ₂ x 6H ₂ O 0,02 g; Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ 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 (7×10^7 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⁻¹] y se resuspendieron en tampón U [10 mM fosfato de sodio (pH 7,0), 0,1 mM MgSO₄] a una turbidez (600 nm) de 2,5-3,0. 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 (Fuentes de nitrógeno)	Degradación de 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.

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

Un cultivo de *Pseudomonas* sp. MHP41 de 1×10^8 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 CaCl_2 y refrigeradas a 4°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°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 3×10^9 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 no se ve afectado por la microencapsulación. La remoción de simazina 0,5 mM en el medio líquido AM ocurre antes de las 48 horas. Cápsulas de alginato de sodio sin bacterias no remueven simazina del medio. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes (Fig 7).

EJEMPLO 5: Biorremediación de simazina con la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 en suelos.

Los experimentos de biorremediación a escala de microcosmos se realizaron para estudiar la biodegradación de simazina en suelos agrícola mediante la adición de la cepa nativa degradadora de s-triazinas *Pseudomonas* sp. MHP41.

El comportamiento de la cepa fue analizado en dos tipos diferentes de suelos: i) suelos sin historial

de aplicación de simazina e ii) suelos con historial de aplicación anual de simazina. Los suelos fueron recolectados de la capa superficial (0 a 15 cm), tamizados mediante mallas de 5, 2,8 y 2 mm y contaminados con simazina comercial (Gesatop® 90WP). *Pseudomonas* sp. MHP41 fue crecida en medio mínimo conteniendo simazina como una única fuente de nitrógeno y se adicionó al suelo como inóculo inmovilizado en matriz de alginato de sodio en concentración de 1×10^8 UFC/g de suelo seco (equivalente a una biomasa celular de 1×10^{12} UFC/ml). Los microcosmos se inocularon cada 4 días durante cuatro semanas. La humedad fue controlada semanalmente. Las 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 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.

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.

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 1×10^3 UFC/ml hasta 1×10^{15} UFC/ml de medio de cultivo o de solución tampón o desde 1×10^5 UFC/g hasta 1×10^{12} UFC/g de alginato de sodio.

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

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 1×10^2 UFC/g de suelo hasta alrededor de 1×10^{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.

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

LAMINA 1/9

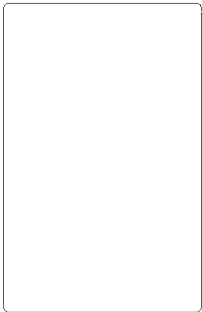
FIGURA 1



LAMINA 2/9

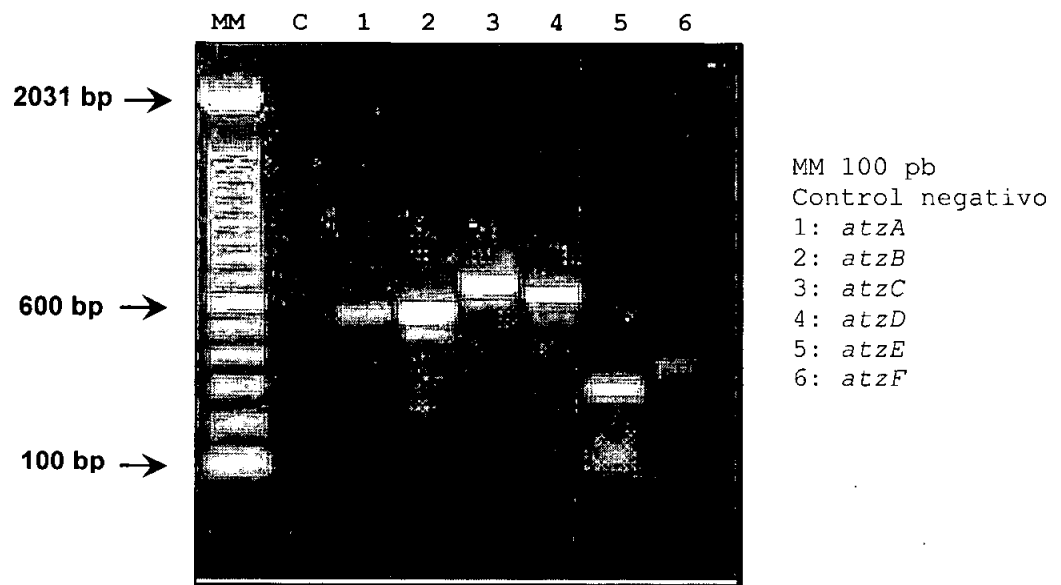
FIGURA 2





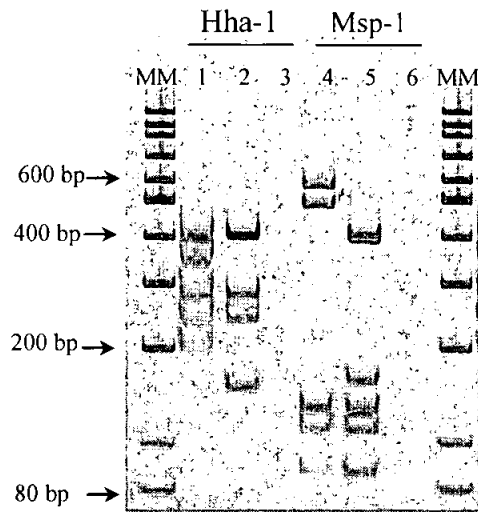
LAMINA 4/9

FIGURA 4



LAMINA 5/9

FIGURA 5



MM: Marcador de peso molecular (100 pb)

Líneas 1 y 4: *Pseudomonas* sp. ADP

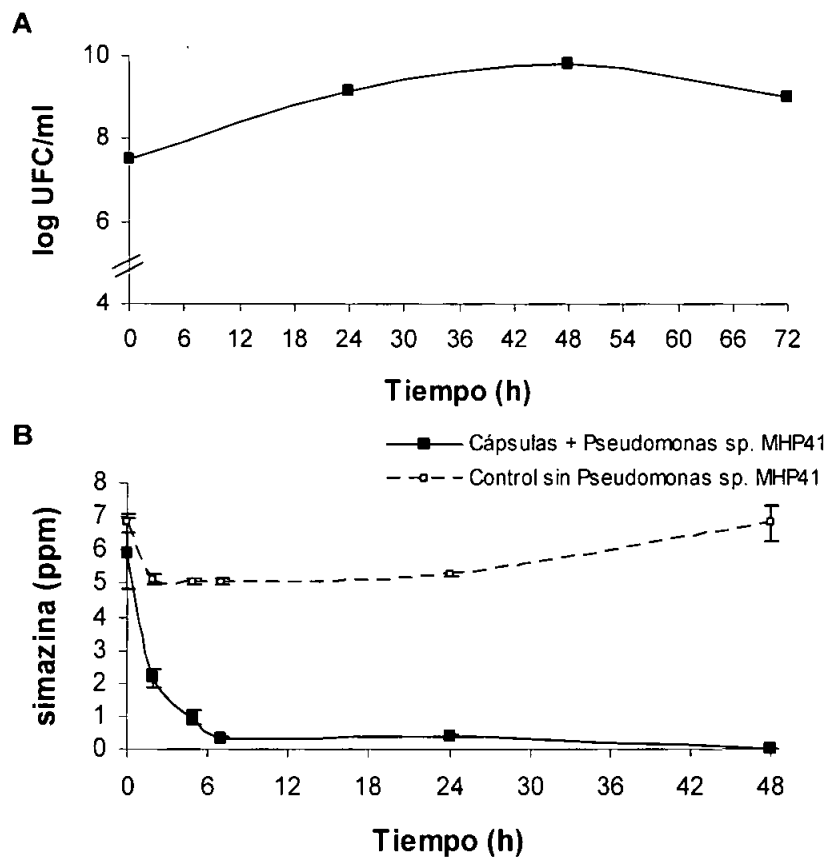
Líneas 2 y 5: *Pseudomonas* sp. MHP41

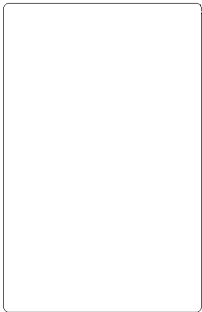
Líneas 3 y 6: controles negativos de restricción

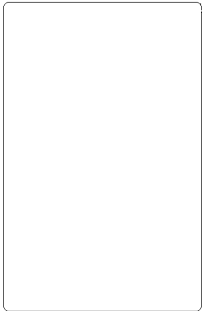


LAMINA 7/9

FIGURA 7







SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-068859- -00000-0000

Fecha: 2008-07-04 15:04:16 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 49



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Descripción de la invención []
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha Junio 4-08

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ D^a ALEMAN DILIA MARIA

REFERENCIA	Radicación No. 8 68859
	Trámite 2
	Evento 1
	Actuación 430
	Oficio No. 10823

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

1. Debe allegar el poder otorgado al abogado que aparece en la solicitud como apoderado, con el lleno de los requisitos exigidos en el Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

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

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

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

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 28 AGO. 2008
jfernand

Continúa en la página siguiente...

92

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 8 68859

Se recuerda al interesado que debe presentar, dentro de los dieciséis meses siguientes contados a partir de la fecha de presentación de la solicitud cuya prioridad se invoca, copia de la misma certificada por la autoridad que la expidió y, en los casos en que haya lugar, la traducción simple del capítulo reivindicatorio. El incumplimiento de éste plazo, acarreará la pérdida de la prioridad invocada.