



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 095 193**

② Número de solicitud: 9501444

⑤ Int. Cl.⁶: C12N 1/20

C02F 3/34

B09C 1/10

//(C12N 1/20

C12R 1:38)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **18.07.95**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.97**

Fecha de concesión: **04.08.97**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
06.06.97

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.09.97**

⑮ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.09.97

⑦ Titular/es: **Universidad Politécnica de Madrid
Avda. Ramiro de Maeztu, 7
Madrid, ES
Universidad Complutense de Madrid**

⑦ Inventor/es: **Alonso Sanz, Ramón;
Gómez y Miguel, Vicente;
Martín Fernández, Margarita;
Ferrer Muñoz, Estrella;
Fernández Alvarez, Javier y
Méns González, Gerardo**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Utilización de las cepas bacterianas del género pseudomonas PCH3 y GCH1 para la biorrestauración de suelos y purificación de aguas, conlaminadas por herbicidas del grupo de las acetamidas.**

⑤ Resumen:

La utilización de las cepas bacterianas del género *Pseudomonas* PCH3 y GCH1 para la biorrestauración de suelos y purificación de aguas, conlaminadas por herbicidas del grupo de las acetamidas, constituye un método biotecnológico susceptible de ser empleado en la restauración de suelos y aguas contaminadas con acetamidas y derivados aromáticos, procedentes de la actividad agrícola y/o industrial. Estas cepas bacterianas han demostrado su capacidad para degradar estos compuestos orgánicos. Su utilización en técnicas de biorrestauración "in situ", al ser inoculadas en el suelo contaminado, o "ex situ", inmovilizadas sobre soportes sólidos, como biocatalizadores de un reactor, constituyen una alternativa, o bien una etapa final, a los métodos físicoquímicos que se emplean actualmente.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 095 193 B1

DESCRIPCION

Utilización de las cepas bacterianas del género *Pseudomonas* PCH3 y GCH1 para la biorrestauración de suelos y purificación de aguas, contaminados por herbicidas del grupo de las acetamidas.

5

Objeto de la invención

La utilización de las cepas bacterianas del género *Pseudomonas* PCH3 y GCH1 para la biorrestauración de suelos y purificación de aguas, contaminados por herbicidas del grupo de las acetamidas, es una invención que se encuadra dentro de la Biotecnología y en concreto en el campo de la biodegradación de compuestos aromáticos tóxicos. La invención proporciona un método de biodegradación económico que llega hasta la total mineralización de dichos compuestos. Las cepas bacterianas en las que se ha comprobado esta propiedad son PCH3 y GCH1, aisladas por nosotros de suelos contaminados.

El procedimiento objeto de esta invención representa un método biotecnológico capaz de ser utilizado tanto en la biorrestauración de suelos contaminados por residuos tóxicos procedentes de compuestos aromáticos de origen industrial, como en la descontaminación y/o reciclado de aguas contaminadas por compuestos aromáticos, especialmente aquellas procedentes del riego de campos o parcelas tratados con herbicidas del grupo de las acetamidas. Así mismo, los campos o parcelas tratadas con estos herbicidas, son susceptibles de tratamiento "in situ" para su biorrestauración.

En las cepas PCH3 y GCH1 se ha estudiado la ruta degradativa, identificándose algunos de los metabolitos intermediarios en el catabolismo de los herbicidas del grupo de las acetamidas: Alacloro [2-cloro-2',6'-dietil-N-(metoximetil)acetani-nilida] y Propacloro (2-cloro-N-isopropilacetanilida).

25

Para una mayor eficacia en la purificación de aguas, estas cepas se pueden utilizar en biorreactores, en los que se utilice un catalizador consistente en:

- a) Soporte sólido, preferentemente estructurado con un silicato natural o de otra naturaleza.
- b) Alguna de las cepas anteriormente citadas, inmovilizadas en el soporte. Estas bacterias constituirán el centro activo del catalizador.

30

También cabe resaltar que el procedimiento objeto de esta invención representa una alternativa y/o un complemento a otros procedimientos de descontaminación de suelos y aguas, tales como métodos químicos, físicos, o de almacenamiento en vertederos controlados.

35

Antecedentes

De todos es sabida la importancia que a nivel mundial se está dando, por todos los gobiernos del mundo desarrollado, a realizar una política medioambiental acetada. Una de las prioridades dentro del amplísimo campo de la conservación del entorno natural en que el hombre ha de moverse, es la de descontaminación y/o purificación de aguas que pueda dar lugar a un reciclaje de las mismas para su reutilización. También tiene gran importancia la restauración de suelos o lugares contaminados en los que se han utilizado productos químicos, tales como herbicidas, necesarios para alcanzar una mayor productividad, pero que pueden ser un peligro a medio y largo plazo, dada su gran estabilidad por formar parte de su estructura distintos derivados de núcleos aromáticos. La degradación de estos compuestos por medios químicos comporta un coste muy elevado, así como otras prácticas habituales como movimiento de tierras o lavado de suelos, poco eficaces, ya que sólo consiguen diluir o arrastrar los compuestos contaminantes, y también implican una alteración del medio natural.

50

Por ello se van imponiendo las técnicas de biorrestauración "in situ" para descontaminación de suelos, por ser más eficaces y económicas. Del mismo modo, la inmovilización de bacterias supone un avance para poder biodegradar compuestos contaminantes arrastrados por las aguas y que quedan en suspensión, con el consiguiente peligro para hombres y animales.

55

Dentro de la gran variedad de herbicidas comercializados, nos hemos centrado en dos: propacloro y alacloro. El primero es muy utilizado en cultivos de plantas ornamentales; ambos se emplean en el control de malas hierbas gramíneas y dicotiledóneas en preemergencia de las mismas. Se aplican preferentemente en cultivos de soja, maíz, girasol, cebollas, coles y coliflores. Existen trabajos sobre biodegradación de estos compuestos: Villarreal y col., 1991 (Appl. Environ. Microbiol. 57: 2135 -2140), Novick y Alexander, 1985 (Appl. Environ. Microbiol. 49: 737-743), pero en ningún caso se produce la mineralización, si ocurre, de ninguno de dichos herbicidas por una única estirpe bacteriana; por el contrario, la biodegradación

60

tiene lugar por la acción de dos o varias estirpes que dan lugar a la cometabolización del compuesto, siendo, en un caso, estirpes de los géneros *Morallesa* y *Xantobacter*, y en otro “probablemente” una cepa de *Pseudomonas*.

5 Como es fácil comprender, es mucho más interesante contar con estirpes bacterianas que por sí solas sean capaces de utilizar dichos herbicidas como única fuente de carbono y energía, estudiando las rutas degradativas de estos compuestos y pudiendo así ser fácil y segura aplicación para efectuar técnicas de biorrestauración de suelos.

10 Igualmente será más eficaz el dirigir los esfuerzos a conseguir la inmovilización de una única estirpe bacteriana o de varias por separado, que la de dos o más diferentes al mismo tiempo, para así poder conseguir la biodegradación. Además, la utilización de cultivos puros permite una mayor control del proceso, y por tanto, mejores resultados finales.

15 Explicación y descripción de la invención

El proceso objeto de patente consiste en la utilización de las cepas bacterianas del género *Pseudomonas* PCH3 y GCH1 para la biodegradación de los herbicidas propacloro y alacloro (u otros del grupo de las acetamidas).

20 Ambas son estirpes por nosotros de suelos tratados con dichos herbicidas por la técnica de enriquecimiento de cultivos y se encuentran depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), sita en la Universidad de Valencia. Los números de acceso son:

- 25 1: C.E.C.T. 4586 para la cepa PCH3.
2: C.E.C.T. 4587 para la cepa GCH1.

- Las cepas PCH3 y GCH1 son capaces de crecer en propacloro y alacloro así como en otros compuestos: acetanilida, benzoato y N-isopropilánilina, N-etilacetamida y acetamida.

30 - Ambas cepas tienen características del género *Pseudomonas*: Gram-negativa con flagelos polares; oxidasa positiva; catalasa positiva; produce ácido aeróbicamente en un medio fermentador oxidante con glucosa, utilizando el test de identificación API (Analytical Profile Index).

35 - La Figura 1 muestra el crecimiento de la cepa PCH3 utilizando propacloro como única fuente de carbono a una concentración 1 μM (Δ), 1 mM (+) y 2.5 mM (*), con la consiguiente formación de biomasa, cuantificada por espectrometría a una $\lambda = 600$ nm. El tiempo de generación medio durante el crecimiento en propacloro (0,95 mM) a 30°C es de 2,0 h en el inicio de la fase exponencial, y 2,5 para una concentración de 2.5 mM. Disminuyendo la concentración de propacloro a 1 μM se consigue una producción de biomasa mucho más baja.

40 - La cepa PCH3 utiliza alacloro como única fuente de carbono en el mismo margen de concentraciones que el propacloro.

45 - La cepa GCH1 utiliza también ambos herbicidas, propacloro y alacloro, como única fuente de carbono. La Figura 2 muestra el rango de concentración utilizado por la cepa GCH1, utilizando propacloro como única fuente de carbono y energía: 10 μM (+), 0.5 mM (Δ), 1 mM (0) y 2 mM (*), con la consiguiente formación de biomasa.

50 - La Figura 3 muestra los niveles de mineralización conseguidos por la cepa PCH3, utilizando [^{14}C]propacloro, mediante la media de [^{14}C]CO₂, en suelos contaminados. Así mismo muestra la reducción de los niveles de propacloro, a la vez que se forma [^{14}C]CO₂.

55 - La Figura 4 recoge los niveles de mineralización conseguidos por la cepa PCH3, utilizando [^{14}C]alacloro. La disminución de los niveles del herbicida también se recogen en la figura.

La desaparición del xenobiótico no es una medida suficiente de biorremediación, porque pueden existir intermediarios en su ruta degradativa que sean igual o más tóxicos que el compuesto inicial. Por este motivo, es importante conocer la ruta degradativa del compuesto, identificando los diferentes productos obtenidos en su degradación, así como tratar de verificar si el microorganismo es capaz de llegar hasta la completa mineralización del xenobiótico, mediante la comprobación de la formación, en última instancia, de CO₂. Para ello, a los cultivos de PCH3 o GCH1 en medio mínimo PJC (Hareland y col.; 1975. J. Bacteriol. 121: 272-285) más propacloro o alacloro, como fuente de carbono, se añadieron 35 nmol del

compuesto xenobiótico marcado con ^{14}C . Se tomaron muestras a diferentes tiempos de incubación, para comprobar la concentración del compuesto. El CO_2 marcado, en el gas efluente, fue atrapado en NaOH 0,1 M. La radioactividad se determinó en un contador de centelleo. En muestras activadas, el 70% del total de carbono marcado que quedó después de la incubación fue CO_2 , mientras que en los controles estériles no se detectó CO_2 marcado.

Se analizaron los sobrenadantes procedentes de la centrifugación de los cultivos, mediante cromatografía de gases, indicando que el herbicida desaparece durante la incubación y simultáneamente aparecen intermediarios en el cromatograma, cuya concentración crece con el tiempo.

La identificación de los intermedios por su tiempo de retención, así como por su análisis por espectrometría de masas, sugiere que el empleo de estos compuestos como fuente de carbono por la cepa, puede comprender deshalogenación y posterior rotura del enlace N-C del núcleo aromático. También se ha comprobado la inmovilización de las células al soporte sólido, en este caso un silicato natural, mediante microscopía electrónica. La Figura 5 muestra las células de la cepa PCH3 inmovilizadas sobre sepiolita, en una microfotografía tomada por microscopía de scanning. La Figura 6 corresponde a células de la cepa GCH1 inmovilizadas por el mismo método.

- La inmovilización de ambas cepas PCH3 y GCH1 al soporte sólido, configura el catalizador de un biorreactor con capacidad para catabolizar herbicidas del grupo de las acetamidas.

- Como puede observarse en las figuras 5 y 6 las células mantienen su plena capacidad de división. Durante 60 días, las cepas inmovilizadas mantuvieron una capacidad degradativa de $0.75 \mu\text{moles} / \text{día}$.

La invención consiste en la utilización de las cepas PCH3 y GCH1 aisladas por nosotros de sitios contaminados, para la biorrestauración de lugares tratados con los herbicidas antes citados, ya que se ha comprobado la mineralización de estos compuestos por dichas cepas. Por otra parte, su inmovilización en los soportes sólidos existentes, permiten la descontaminación de aguas subterráneas, de superficie o de riego. La utilización de dichas cepas para la biorrestauración de los suelos o de diferentes lugares contaminados, necesitará de unos ensayos previos de optimización dependientes del tipo de suelo y de la concentración del contaminante que, como es lógico, no son objeto de esta patente, dada la gran variedad de casos diferentes que se pueden presentar.

Así mismo, la inmovilización de las cepas también necesitará de ensayos de optimización que dependerán, obviamente, de las características del agua a tratar: volumen, concentración del contaminante, flujo y tiempo de residencia, así como también del tipo de biorreactor que se utilice.

Exposición detallada de un modo de realización de la invención

A continuación se describe por medio de un ensayo de laboratorio, no limitativo de su alcance, un modo de realización de la invención, tanto con células en suspensión, como en células inmovilizadas.

Las cepas PCH3 y GCH1 empleadas, son las descritas en el apartado anterior. La cepa a utilizar en el ensayo, se cultiva en medio mínimo PJC a la temperatura de 30°C en un agitador termostatzado hasta la mitad de la fase exponencial. Antes de proceder a la centrifugación se mide espectrofotométricamente la DO 600 nm y se toma una muestra del cultivo para posteriormente realizar un recuento en placa. Estos datos nos permitirán conocer el tamaño del inóculo empleado en cada experimento. Las células son centrifugadas a 5000 rpm, durante 15 min. Una vez eliminado el sobrenadante, las células son lavadas dos veces con tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4 (estéril). Este paso elimina los restos de herbicida que podrían enmascarar los resultados de la biorrestauración.

Las células así preparadas y una vez establecida su titulación, se utilizan como inóculo en los ensayos de biorrestauración.

La utilización de una u otra cepa dependerá de la mejor adaptación de éstas a las condiciones de capa espacio o soluciones acuosas a descontaminar.

A.- Biorrestauración de suelos

El suelo en el que se realizaron los experimentos de descontaminación, era, en términos de textura, *Xerochrept calcixerolic* (USDA, 1992), arenoso con muy bajo nivel de materia orgánica. Se ensayó la capacidad degradativa de la cepa PCH3 en este suelo bajo en materia orgánica, con cantidades diferentes

de herbicida: 0,1 y 100 μg de propacloro por gramo de suelo húmedo. Los suelos fueron inoculados con las células preparadas tal y como se ha descrito en el párrafo anterior. Se prepararon controles idénticos a las muestras pero sin inóculo. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 1, encontrando cómo el propacloro se degradó en las muestras de suelos inoculadas con la cepa bacteriana independientemente de la concentración de xenobiótico, en un período de 8 días. La desaparición del herbicida del suelo estaba comprendida entre un 95-98%.

En el caso de una concentración de propacloro de 0,1 μg , el número inicial de CFU decrece con el tiempo, estabilizándose aproximadamente a 10^4 CFU/g de suelo. Sin embargo, con la concentración de propacloro más alta (100 $\mu\text{g/g}$) durante los primeros días, el número de CFU decreció, seguido de un incremento próximo a 5×10^9 CFU/g de suelo.

Los resultados obtenidos con alacloro son similares a los descritos anteriormente.

TABLA 1

Eliminación de herbicida en suelos contaminados con, propacloro, utilizando la cepa PCH3

Tamaño de Inóculo (CFU/g suelo)	μg Herbicida/ g suelo		Rendimiento %
	Inicial	Final	
No inoculado	100	99 ± 0.8	-
	100	< 1	99
1.5×10^6	0.1	0.082 ± 0.009	80
	100	< 1	99.5
1.6×10^7	0.1	0.085 ± 0.008	83

B.- *Descontaminación de aguas*

Los datos técnicos de esta aplicación de la invención se referirán a la cepa GCH1, ya que ambas cepas tienen capacidad degradativa sobre los compuestos anteriormente mencionados.

Las células se cultivan en medio mínimo PJC a la temperatura de 30 C, en un agitador termostatzado, hasta la mitad de la fase exponencial. El herbicida se utiliza como fuente de carbono a una concentración 0.5 mM. La centrifugación se realiza a 5000 rpm durante 15 min, a 4 C. Se procede al lavado de las células como se indicó anteriormente y a su titulación, para conocer el tamaño del inóculo.

Simultáneamente, se lleva a cabo la preparación del soporte sólido para inmovilizar las células. En este ensayo de laboratorio se ha utilizado un soporte de silicato natural, estructurado en celdillas. El soporte se esteriliza sumergido en medio mínimo PJC y se mantiene en suspensión durante 24 h, al término de las cuales se añade el inóculo. La inmovilización de las células en el soporte puede observarse en la Fig 6. Las células una vez inmovilizadas mantienen su capacidad de división así como su actividad degradativa durante un largo período de tiempo (4 meses). En este período la única fuente de carbono suministrada era herbicida, a una concentración 0.5 mM. Durante la realización de este ensayo piloto, se determinó la viabilidad de las células, así como los parámetros cinéticos del proceso de biotransformación para ambos herbicidas. La Tabla 2 resume los resultados obtenidos.

(La Tabla 2 pasa a la página siguiente)

ES 2 095 193 B1

TABLA 2

Viabilidad y parámetros cinéticos de células de la cepa GCH1 inmovilizadas sobre monolito, con distintos herbicidas como fuente de carbono

	Propacloro	Alacloro
Carga de biomasa*	300	200
Retención de biomasa	alta	alta
Fisiología	inalterada	inalterada
Estabilidad operativa		
células muertas	muy bajo	muy bajo
células vivas	muy alto	muy alto

* Basada en peso seco/g de soporte

Parámetros cinéticos				
	Cultivo en suspensión		Cultivo inmovilizado	
	Propacloro	Alacloro	Propacloro	Alacloro
K (ppm/cél. h)	8.35	9.63	7.74	8.74
T_{max} (h)	13.23	13.20	11.38	11.38
μ_{max} (h ⁻¹)	0.13	0.09	0.17	0.17
K_d (ppm)	127.41	126.39	131.25	131.25
K_p (g de proteína/mol)	280.81	233.17	265.34	214.46

REIVINDICACIONES

5 1. *Pseudomonas* PCH3 y *Pseudomonas* GCH1, depositadas en la CET con los números de acceso CECT 4586 y CECT 4587 respectivamente, con capacidad de utilizar acetanilida y derivados como fuente de carbono bajo condiciones aerobias.

10 2. Procedimiento para la eliminación biológica de acetanilida, derivados N-sustituídos de la misma, o de la sustitución del H en el grupo fenil de la misma, o de la sustitución del H en el carbono 2, así como acetamidas o derivados N-sustituídos de la anilina, obtenidos en la degradación (catabolismo) de los compuestos anteriormente citados, presentes en suelos o en aguas, **caracterizado** porque se utilizan los compuestos citados como sustratos para la biotransformación, mediante al menos una de las cepas del género *Pseudomonas* citadas en la reivindicación 1.

15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
– añadir los nutrientes necesarios para conseguir la optimización de la biotransformación.
– inocular el suelo o el agua contaminada a tratar con un cultivo de al menos uno de los microorganismos citados en la reivindicación 1, hasta conseguir la desaparición del contaminante.
20 – controlar los efectos sobre los ecosistemas naturales.

25 4. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque al menos uno de los microorganismos citados en la reivindicación 1 son inmovilizados sobre un soporte sólido, de naturaleza cerámica, sintética u orgánica.

30 5. Procedimiento según las reivindicaciones 2 y 4, **caracterizado** porque se aporta el microorganismo inmovilizado, como biocatalizador, a un biorreactor, regulándose las condiciones que optimizan el proceso de transformación de los compuestos contaminantes.

35

40

45

50

55

60

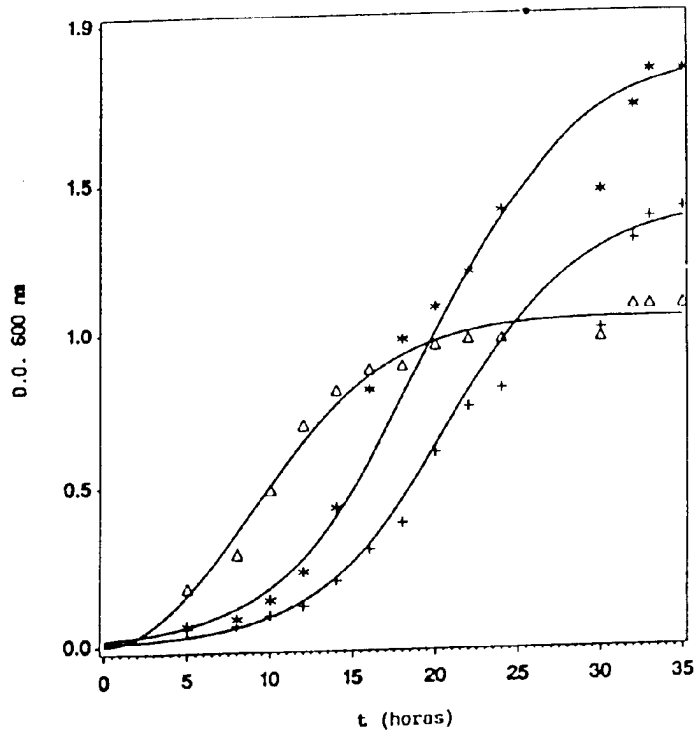


Fig.1

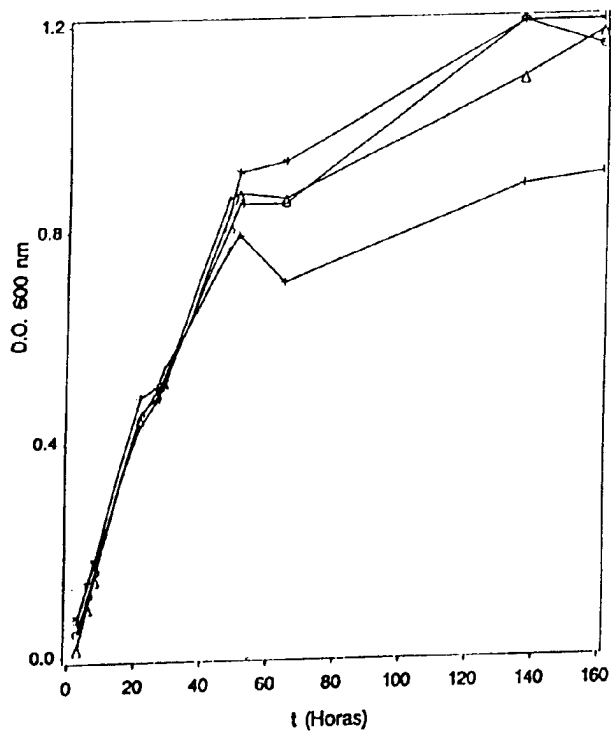
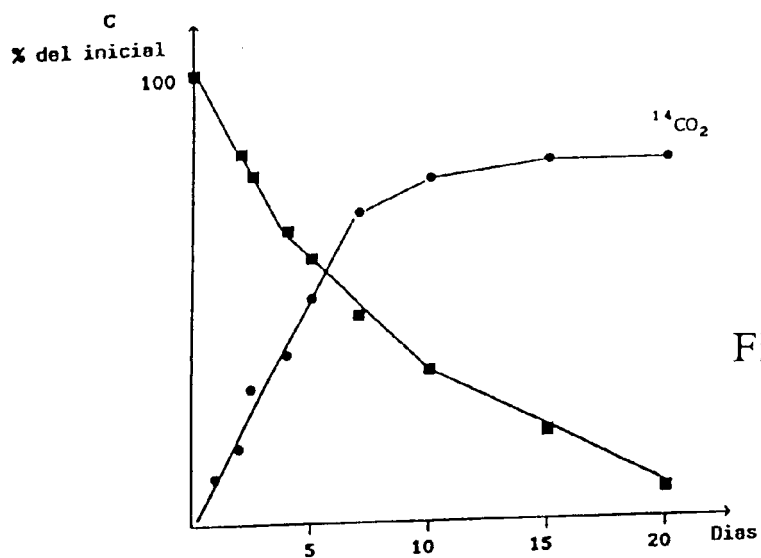
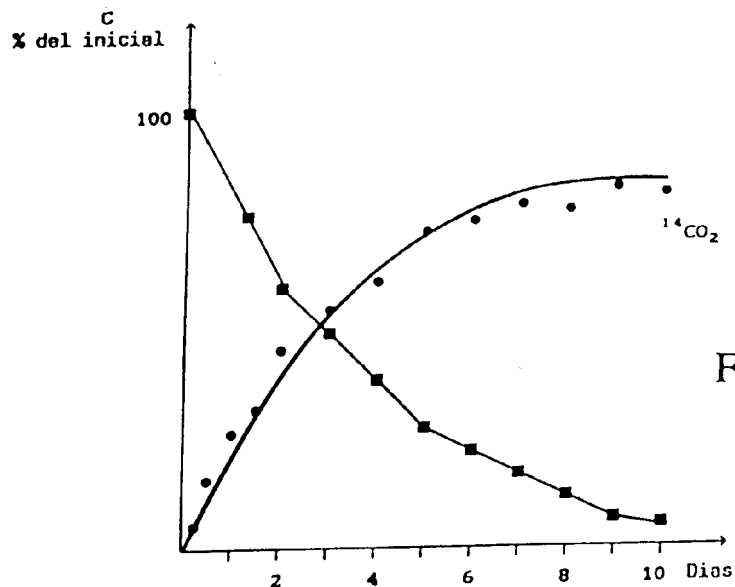


Fig.2



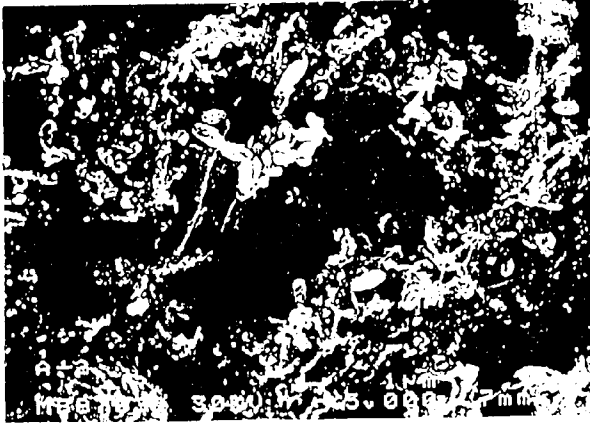


Fig.5

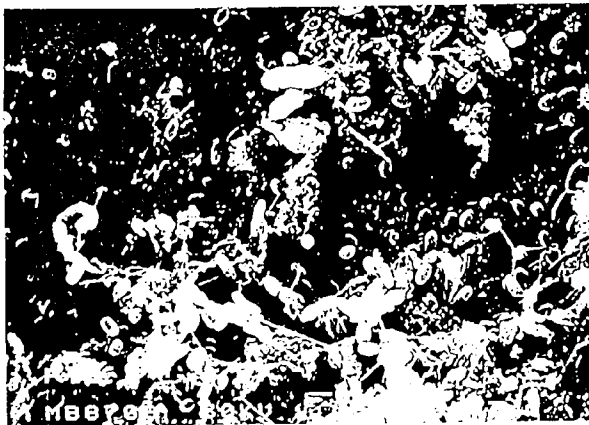


Fig.6



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: C12N 1/20, C02F 3/34, B09C 1/10 // (C12N 1/20, C12R 1:38)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES-8600171-A (CIBA-GEIGY AG.) 01.10.85 * Reivindicación 1; página 14 *	1-3
A	GIZZARELLI, S. et al. In vitro effect of the microflora from two soils of different origin on herbicide alachlor. Fresenius Environ. Bull. 1993. Vol. 2 (4), páginas 232-237	2,3
A	NOVICK, N.J. y ALEXANDER, M. Cometabolism of low concentrations of propachlor, alachlor and cycloate in sewage and lake water. Applied and Environmental Microbiology. 1985. Vol. 49 (4), páginas 737-743	2,3
A	ZABLOTOWICZ et al. Glutathione S-Transferasa activity in rhizosphere bacteria and the potencial for herbicide detoxification ACS Symp. Ser. 1994, 563 (Bioremediation through rhizosphere technology) páginas 184-198	2,3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

30.10.96

Examinador

A. Polo Díez

Página

1/1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N.º de publicación: 2 095 193 B1

② Número de solicitud: 9501444

⑤ Int. Cl.⁶: C12N 1/20

C02F 3/34

B09C 1/10

//(C12N 1/20

C12R 1:38)

CORRECCION DE ERRATAS DE FOLLETO DE PATENTE

Pág./INID	Errata/Omisión	Corrección
1, ⑤	Utilización de las cepas bacterianas del género Pseudomonas PCH3 y GCH1 para la biorrestauración de suelos y purificación de aguas, conlaminadas por hervicidas del grupo de las acetamidas.	Utilización de las cepas bacterianas del género Pseudomonas PCH3 y GCH1 para la biorrestauración de suelos y purificación de aguas, contaminadas por herbicidas del grupo de las acetamidas.