

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 765**

21 Número de solicitud: 201290055

51 Int. Cl.:

B09C 1/10 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.12.2010

30 Prioridad:

30.12.2009 CL 2234-2009

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.02.2013

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/IB2010/055961

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA
MARIA (100.0%)**

**Avda. España
1680 VALPARAISO CL**

72 Inventor/es:

**SEEGER PFEIFFER, Michael;
ROJAS ARAYA, Luis Antonio;
GONZÁLEZ VERGARA, Myriam Lydia y
YAÑEZ PRIETO, Carolina Elvira Mária**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **Bacteria recombinante capaz de remover especies químicas de mercurio (II); cadmio y cobre en presencia de otros metales pesados desde sitios contaminados; producto para la biorremediación; proceso de obtención del producto y método de aplicación para la biorremediación.**

57 Resumen:

Bacteria recombinante Cupriavidus metallidurans MSR33 con alta resistencia a metales pesados, capaz de remover especies químicas de mercurio (II), cadmio y cobre, en presencia de otros metales pesados desde sitios contaminados, que ha sido depositada bajo el número de acceso NRRL B-50299. Producto para la biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados, en donde el producto comprende un inóculo bacteriano de dicha cepa. Proceso de obtención del producto para la biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados. Método para la biorremediación de un ambiente contaminado con metales pesados, que utiliza a dicho producto para la biorremediación.

ES 2 396 765 A1

DESCRIPCIÓN

Bacteria recombinante capaz de remover especies químicas de mercurio (II), cadmio y cobre en presencia de otros metales pesados desde sitios contaminados, producto para la biorremediación, proceso de obtención del producto y método de aplicación para la biorremediación.

- 5 La presente invención se refiere a una bacteria biorremediadora *Cupriavidus metallidurans* MSR33, depositada bajo el número de acceso NRRL B-50299. Esta nueva cepa es capaz de remover mercurio inorgánico, compuestos organomercuriales, cadmio y cobre de suelos contaminados, aguas contaminadas o residuos industriales contaminados. Esta propiedad se debe a que ha incorporado nuevos genes *mer*, que le otorgan una alta resistencia a compuestos organomercuriales, mercurio inorgánico y cadmio, lo que se suma a la alta resistencia a otros metales pesados como el cobre, propia de la cepa bacteriana nativa. La invención también se refiere a un producto para la biorremediación que la comprende, a su procedimiento de obtención y al método de biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados como mercurio inorgánico, compuestos organomercuriales, cadmio y cobre con dicha cepa *Cupriavidus metallidurans* MSR33 NRRL B-50299.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 Los metales pesados tales como cobre, níquel, zinc y cobalto son nutrientes que cumplen funciones biológicas a concentraciones bajas, pero son tóxicos para los organismos a concentraciones elevadas. Otros metales como mercurio, cadmio, y plomo, no poseen funciones biológicas y a bajas concentraciones son tóxicos. El Ministerio del Medioambiente de Quebec, Canadá, ha establecido concentraciones máximas permitidas en suelos para mercurio de 0,2 µg/g, para cadmio 1,5 µg/g y para cobre de 40 µg/g. Los metales pesados presentes en suelos y aguas contaminadas, provienen de fuentes naturales y de contaminación antropogénica, ya sea por actividad minera u otras actividades como la producción de electricidad utilizando combustibles fósiles. La contaminación de aguas por mercurio ocurre principalmente por deposición atmosférica, como lluvias, y por efluentes provenientes de residuos industriales, en donde la principal forma corresponde al ión Hg^{+2} . La deposición de residuos mineros ricos en minerales, las fundiciones de cobre, las emisiones de incineraciones y de combustión de combustibles fósiles son actividades antropogénicas importantes que contaminan grandes extensiones de suelos con elementos tóxicos. De acuerdo a los antecedentes presentados en el año 2007 por la agencia de protección medioambiental de Estados Unidos (EPA), la minería de oro es responsable del 18% de las emisiones antropogénicas de mercurio a suelos. El mercurio iónico puede ser metilado por microorganismos para producir metilmercurio ($MeHg^+$). El metilmercurio es la especie más tóxica de mercurio (II) y representa un problema para la salud pública. Debido a su bioacumulación y biomagnificación en la cadena alimenticia representa riesgos para la salud humana. Dado los peligros asociados con la contaminación de mercurio, se han aumentado las restricciones de este metal en residuos industriales líquidos, en donde la concentración máxima permitida en Europa es ≤ 50 ng/g.

- 35 Las especies de mercurio son tóxicas. La exposición a mercurio puede provocar enfermedades neurológicas, daño cerebral e incluso la muerte. Dentro de la especie de $Hg(II)$, los compuestos organomercuriales son los más tóxicos. Una de las principales fuentes de contaminación por mercurio en suelos, es la minería y en particular la extracción de oro. Esta contaminación es producida por la minería de oro en gran escala y la minería artesanal, la cual se encuentra más distribuida en el mundo, utilizan mercurio para la extracción del metal precioso mediante la formación de amalgama. Como consecuencia de esto, el mercurio puede contaminar los suelos, lo que afecta a los seres humanos y el ambiente.

- 40 El cadmio no posee un ciclo redox reactivo. Su toxicidad se debería a la disminución de glutatión y a la interacción con los grupos sulfidilo en proteínas. La exposición a cadmio puede provocar afecciones pulmonares crónicas, renales, hipertensión y alteraciones óseas, dado que afecta el metabolismo del calcio, inhibiendo la activación de la vitamina D y produciendo una disminución en la absorción de éste y en la mineralización ósea. El cadmio en el medioambiente, se desplaza fácilmente desde el suelo a las plantas por la absorción de las raíces. De esta forma entra a la cadena alimenticia, lo que puede afectar la salud humana.

- 50 El cobre es un micronutriente esencial y está ampliamente distribuido en la naturaleza. El cobre es un componente esencial de muchas enzimas como las oxidasas. La exposición aguda o crónica por ingestión a sales de cobre puede producir necrosis hepática y la muerte. La contaminación de cobre en Chile proviene principalmente de la actividad minera y de la aplicación de pesticidas, fungicidas y alguicidas. En Chile, el problema de la contaminación con cobre es relevante. Como producto de la actividad minera, suelos agrícolas se han contaminado con niveles importantes de este metal, el cual puede ser transferido a los animales y al hombre a través de la cadena alimenticia.

- 55 Los metales pesados pueden ser removidos desde sitios contaminados por procesos fisicoquímicos tales como intercambio iónico por columnas, adsorbentes como carbón activado, precipitación química, procesos de filtración, etc. Estos procesos son generalmente poco selectivos y requieren tratamientos posteriores costosos o bien de regeneración. Además, estos procesos pueden llevar a la producción de compuestos aún más tóxicos, ya sea por procesos de concentración o de formación de nuevos productos por la aplicación de otros compuestos químicos

para la precipitación, coagulación y floculación. Para la remoción de mercurio los métodos biológicos como la biorremediación bacteriana son una alternativa atractiva. Esta alternativa, ha demostrado ser robusta con bajo costo relativo en escala industrial cuando se ha aplicado en residuos industriales líquidos de plantas de fabricación de cloro-alcálico. La remoción biológica de mercurio es altamente selectiva y eficiente y puede minimizar el volumen final de contaminante para su disposición final.

Los microorganismos como las bacterias participan en el ciclo global del mercurio reduciendo las formas químicas de Hg(II) (Hg^{+2} , MeHg^{+}) a la forma metálica Hg^0 . El mercurio reducido (Hg^0) es menos soluble en sistemas acuosos y por lo tanto está menos biodisponible, siendo esta forma la menos tóxica de todas las especies de mercurio. La aplicación biotecnológica de remoción de mercurio de aguas y suelos contaminados, consiste en biotransformar las especies de mercurio II en la forma metálica Hg^0 y recolectarlo desde la fase gaseosa en un medio oxidante. El sistema ofrece un mínimo volumen de mercurio recolectado en una solución oxidante el cual requiere un tratamiento posterior mínimo para evitar contaminación secundaria que consiste principalmente en precipitación química en medio alcalino o con sulfuro.

El proceso de reducción de las formas de mercurio a mercurio metálico está ampliamente distribuido en bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los genes responsables de la incorporación y reducción del metal se encuentran organizados en operones presentes en plásmidos y en transposones. Un operón *mer* típico de bacterias Gram negativas, que otorga resistencia a compuestos de mercurio, está constituido por los genes *merRTPABD*. Una condición de estrés a mercurio, induce la expresión de los genes estructurales *merTPAB*, bajo el control del regulador transcripcional codificado por el gen *merR*. *MerR* es un regulador de la transcripción del operón *mer* que actúa como represor o activador en ausencia o presencia de mercurio, respectivamente. *MerD* es una proteína sintetizada cuando el mercurio ya ha sido removido del interior de la célula y actuaría como un regulador a distancia. *MerP* corresponde a la proteína periplasmática que captura el mercurio extracelular y lo traspa a la proteína de membrana *MerT*, la cual cede el ión de mercurio a la proteína citosólica reductasa *MerA* que reduce el mercurio iónico hasta su estado metálico. *MerB* es la proteína encargada de romper el enlace Hg-C de compuestos organomercuriales y dejar disponible el ión mercurio para su reducción al estado metálico. Los operones *mer* que carecen del gen *merB*, son clasificados como de corto espectro, debido a que confieren una baja resistencia a mercurio y no confieren resistencia a compuestos organomercuriales. Los operones *mer* que poseen el gen *merB* son clasificados como de amplio espectro. Un reciente estudio ha logrado aislar el plásmido pTP6 desde un sitio contaminado con mercurio en el río Nura, Kazakhstan. Este plásmido contiene un complejo transposon *mer* como único elemento accesorio (Smalla K. et al. en "Increased abundance of IncP-1 beta plasmids and mercury resistance genes in mercury-polluted river sediments: First discovery of IncP-1 beta plasmids with a complex *mer* transposon as the sole accessory element". *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**(11):7253-7259). El plásmido pTP6 es un plásmido tipo IncP-1 que ha adquirido el transposon Tn50580, que contiene genes de resistencia a mercurio de amplio espectro. Los genes *mer* de resistencia a mercurio que contiene el transposon Tn50580 son *merR1*, *merT*, *merP*, *merA*, *merG*, *merB1*, *merR2*, *merB2*, *merD2* y *merE*.

La presencia de mercurio en sitios contaminados por actividad minera está acompañada por la presencia de otros metales pesados, tales como cadmio y cobre. Para procesos de remoción o de biorremediación de metales pesados tales como mercurio, cadmio y cobre, se requiere un microorganismo que posea multiresistencia a metales pesados.

Este problema técnico es el que soluciona la cepa de la invención, la bacteria *Cupriavidus metallidurans* MSR33, la que permite tanto la remoción de mercurio como de cadmio y cobre desde sitios contaminados con metales pesados. La cepa *Cupriavidus metallidurans* MSR33, es una bacteria recombinante generada por incorporación del plásmido pTP6 a la cepa nativa *Cupriavidus metallidurans* CH34. Este plásmido le otorga una resistencia a mercurio de amplio espectro y asimismo incrementa su resistencia a cadmio, manteniendo la resistencia a cobre de la cepa nativa. El plásmido pTP6 es un plásmido natural que contiene el transposon Tn50580 y genes de resistencia a mercurio de amplio espectro. Los genes *mer* de resistencia a mercurio que contiene el transposon Tn50580 son *merR1*, *merT*, *merP*, *merA*, *merG*, *merB1*, *merR2*, *merB2*, *merD2* y *merE*.

Cupriavidus metallidurans CH34 (antes llamada *Alcaligenes eutrophus*) es una bacteria nativa con alta resistencia a metales pesados (Mergeay et. al. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J Bacteriol* 1985, **162**:328-334). *Cupriavidus metallidurans* CH34 posee dos plásmidos: pMOL28 (171 kb) y pMOL30 (234 kb), que contienen varios determinantes genéticos de resistencia a metales pesados. Los genes involucrados en la resistencia a Hg(II), Co(II), Cr(VI), y Ni(II) están localizados en una región de 34 kb en el plásmido pMOL28, y los genes involucrados en la resistencia a Hg(II), Cd(II), Cu(II), Ag(I), Co(II), Pb(II) y Zn(II) en una región de 132 kb en el plásmido pMOL30. Cada plásmido posee determinantes de resistencia a mercurio de corto espectro, es decir sólo presentan una discreta resistencia a mercurio inorgánico. Los operones *merRTPAD* están presentes en los transposones Tn4378 (pMOL28) y Tn4380 (pMOL30). No se han descrito procesos de biorremediación de mercurio de sitios contaminados que utilizan *Cupriavidus metallidurans* CH34.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una cepa bacteriana biorremediadora, *Cupriavidus metallidurans* MSR33 NRRL B-50299, la cual es capaz de remover mercurio, cadmio y cobre de suelos contaminados, aguas contaminadas o residuos industriales contaminados con estos y otros metales pesados.

- 5 Dicha cepa bacteriana biorremediadora, *Cupriavidus metallidurans* MSR33, fue depositada con número de acceso NRRL B-50299 bajo el tratado de Budapest, con fecha 07 de Julio de 2009.

Esta nueva cepa es capaz de remover mercurio que se selecciona de las formas químicas inorgánicas y orgánicas de Hg(II). En especial, dichas formas de mercurio se seleccionan de cloruro mercúrico y cloruro de metilmercurio, donde ambos compuestos presentan la forma bivalente de metal, y cadmio y cobre se selecciona en su forma bivalente.

La cepa de la invención, *Cupriavidus metallidurans* MSR33 NRRL B-50299, es capaz de reducir el mercurio bivalente a mercurio metálico produciendo la volatilización de éste y al mismo tiempo producir una remoción del cadmio y el cobre presentes por bioadsorción y bioprecipitación en su forma bivalente.

- 15 Dicha cepa *Cupriavidus metallidurans* MSR33, es capaz de volatilizar distintas formas de mercurio en presencia de tioglicolato (mercaptoacetato) de sodio o potasio.

La presente invención también comprende un método para el tratamiento de remoción o de biorremediación de un ambiente contaminado con mercurio (en forma bivalente como mercurio inorgánico o mercurio orgánico), cadmio y cobre en presencia de otros metales pesados, en donde dicho método comprende las etapas de i) agregar la cepa *Cupriavidus metallidurans* MSR33a dicho ambiente contaminado, en donde dicha bacteria es capaz de reducir el mercurio a la forma metálica y volatilizar dicho elemento, y remover el cadmio y el cobre, y ii) incubar dicha bacteria en el ambiente contaminado durante un periodo de tiempo entre una hora y cuatro semanas para permitir la remoción de mercurio en su forma inorgánica como orgánica, el cadmio y el cobre comprendido en el medio, obteniéndose de esto modo la remoción o biorremediación del ambiente.

Además, la presente invención comprende un método para mejorar dicha biorremediación del ambiente contaminado con formas químicas de mercurio, cadmio y cobre en donde dicho método comprende las etapas de i) cultivar la cepa *Cupriavidus metallidurans* MSR33 en presencia de un agente inductor de los genes *merRTPABDE*, ii) incubar dicha bacteria en el ambiente contaminado durante un periodo de tiempo entre una hora y cuatro semanas en presencia de un agente reductor para permitir la reducción y volatilización de distintas formas de mercurio, la remoción de cadmio y cobre comprendido en el medio, obteniéndose de este modo la biorremediación del ambiente contaminado.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la curva de crecimiento de la cepa bacteriana *Cupriavidus metallidurans* MSR33 en medio mínimo Tris mineral en ausencia de mercurio. Se muestra también la curva de crecimiento de la cepa bacteriana *Cupriavidus metallidurans* CH34.

- 35 La Figura 2 muestra el efecto de la adición de 8 µg/g µgde Hg⁺² en la mitad de la fase exponencial sobre el crecimiento de la cepa bacteriana *Cupriavidus metallidurans* MSR33 en medio mínimo Tris mineral. Se muestra también el efecto de la adición de 8 µg/gµg de Hg⁺² sobre el crecimiento de la cepa bacteriana *Cupriavidus metallidurans* CH34.

40 La Figura 3 muestra el bioreactor donde se estudia la remoción de metales pesados en matrices de agua, lodo o suelo. Se adiciona la cepa *Cupriavidus metallidurans* MSR33 y se mantiene a 30°C, oxigenado y en agitación por un sistema de aireación. La recuperación del mercurio volatilizado se realiza en una trampa de HNO₃ al 10% que lo re-oxida.

La Figura 4 muestra la cinética de remoción de mercurio de un agua contaminada con 20 µg/g de Hg⁺² por *Cupriavidus metallidurans* MSR33. Concentración final de 5 x 10⁸ células/ml. Adicionalmente se estudia el efecto del compuesto tioglicolato sobre la remoción de mercurio.

La Figura 5 muestra la cinética de remoción de especies de mercurio (II) de un lodo contaminado con 40 µg/g de Hg⁺² y 20 µg/g de metilmercurio por medio de *Cupriavidus metallidurans* MSR33 a una concentración final de 5,2 x 10⁹ células/ml. Se estudió también el efecto de la cepa bacteriana *Cupriavidus metallidurans* CH34 sobre la remoción de especies de mercurio (II).

La Figura 6 muestra la cinética de remoción de especies de mercurio (II) desde un suelo contaminado con 23 µg/g de Hg⁺² y 2 µg/g de metilmercurio, en presencia de cobre y cadmio por *Cupriavidus metallidurans* MSR33. Concentración final de 5,5 x 10⁹ células/ml.

5 La Figura 7 muestra la cinética de remoción de cadmio 20 µg/g desde un suelo contaminado, en presencia de cobre y especies de mercurio (II) por *Cupriavidus metallidurans* MSR33. Concentración final de 5,5 x 10⁹ células/ml.

La Figura 8 muestra la cinética de remoción de cobre 68 µg/g desde un suelo contaminado, en presencia de cadmio y especies de mercurio (II) por *Cupriavidus metallidurans* CH34 MSR33. Concentración final de 5,5 x 10⁹ células/ml.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 La presente invención se relaciona con una cepa bacteriana biorremediadora *Cupriavidus metallidurans* MSR33, depositada bajo el número de acceso NRRL B-50299, capaz de remover o biorremediar distintas formas químicas de mercurio, cadmio y cobre en presencia de otros metales pesados desde sitios contaminados, con un producto para la biorremediación, con un proceso de obtención del producto y con el método de biorremediación de ambientes contaminados con distintas formas de mercurio, cadmio y cobre en presencia de otros metales pesados.

15 Como se utiliza en la presente invención, el término “volatilización”, representa la extracción de mercurio desde sitios contaminados y su posterior reducción de su estado bivalente a estado metálico que pasa a fase gaseosa mediante las enzimas codificadas por los genes *mer*.

Como se utiliza en la presente invención, el término “metal pesado”, representa al elemento químico metálico cuya densidad sea superior a 7 g/ml como lo es mercurio, cadmio y cobre.

20 Como se utiliza en la presente invención, el término “bioadsorción”, representa la extracción de metales pesados desde sitios contaminados por una bacteria y su incorporación a la membrana celular externa mediante adsorción.

Como se utiliza en la presente invención, el término “bioprecipitación”, corresponde a la extracción de metales pesados desde sitios contaminados por una bacteria y su incorporación al interior de la bacteria y posterior exportación de los metales pesados y precipitación con carbonatos y bicarbonatos en el exterior de la célula.

25 Como se utiliza en la presente invención, el término “biorremediación”, representa el método de tratamiento para tratar o remediar un ambiente o material considerado desecho contaminado, el cual se encuentra en un ambiente definido, en donde dicho tratamiento permite transformar dicho desecho en un material menos tóxico para el ambiente que lo comprende, o bien eliminar el desecho del medio por incorporación de 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.

30 Como se utiliza en la presente invención, el término “nativa”, representa una bacteria natural a la cual no se le ha incorporado ácido desoxirribonucleico externo.

35 Como se utiliza en la presente invención, el término “bacteria recombinante”, representa una bacteria que ha incorporado un ácido desoxirribonucleico externo por conjugación, transformación o traducción. El ácido desoxirribonucleico puede ser un plásmido circular el cual puede ser incorporado en una célula huésped mediante conjugación o transformación.

Como se utiliza en la presente invención, el término “*Cupriavidus metallidurans* MSR33 NRRL B-50299” se considera equivalente a “*Cupriavidus metallidurans* MSR33” a “MSR33” y a “NRRL B-50299”, y cualquiera puede emplearse indistintamente para referirse a la cepa de la invención.

40 La bacteria *Cupriavidus metallidurans* MSR33 es una bacteria derivada de *Cupriavidus metallidurans* CH34, con capacidades mejoradas para la biorremediación de metales pesados como mercurio y cadmio, manteniendo su capacidad para la biorremediación de cobre. La cepa MSR33 se obtuvo incorporando a la bacteria *Cupriavidus metallidurans* CH34 el plásmido natural pTP6, que es conocido en el estado del arte. La bacteria *Cupriavidus metallidurans* CH34, es una bacteria Gram negativa aislada en Bélgica a fines de los años 1970, caracterizada por su capacidad de tener resistencia a metales pesados tóxicos. Esta cepa es considerada uno de los microorganismos más versátiles capaces de tolerar concentraciones altas de metales pesados, como cobre, cadmio, zinc, plomo, plata, cromo y cobalto y concentraciones menores de mercurio. Los mecanismos de resistencia que posee, así como los genes que la codifican han sido ampliamente estudiados, y el genoma de esta bacteria ha sido recientemente secuenciado. La cepa CH34 es capaz de tolerar metales pesados, debido a que posee genes específicos que le otorgan resistencia a ellos, estos genes han sido bien caracterizados en el estado del arte, y se encuentran tanto en el cromosoma como en sus dos grandes plásmidos pMOL28 (171 kb) y pMOL30 (234 kb).

50

Por otra parte, tal como se describió anteriormente, el plásmido pTP6 transporta el transposon *Tn50580* que contiene los genes *mer*, responsables de la resistencia a mercurio inorgánico y mercurio orgánico. La incorporación del plásmido pTP6 en la cepa CH34 permitió generar la cepa MSR33, que posee un nuevo gen *merB*, que otorga resistencia a compuestos organomercuriales, además de genes adicionales de resistencia a mercurio tales como *merP*, *merT*, *merA* y *merD*, ya presentes en la cepa nativa y *merE* que probablemente está involucrado en la incorporación de mercurio al interior de la bacteria. Todos los genes *mer* incorporados están presente en el plásmido pTP6, el que no posee genes de resistencia a antibióticos ni genes catabólicos de compuestos orgánicos.

La cepa *Cupriavidus metallidurans* MSR33, fue generada por la incorporación del plásmido pTP6 a la cepa CH34 mediante conjugación biparental. Para el experto en el arte será evidente que existen otras formas de realizar la recombinación de *Cupriavidus metallidurans* CH34 con pTP6 para obtener la cepa de la invención *Cupriavidus metallidurans* MSR33. Todas ellas, conjugación, transformación, electroporación, podrían ser utilizadas para obtener *Cupriavidus metallidurans* MSR33 NRRL B-50299.

Ejemplo de obtención de la cepa *Cupriavidus metallidurans* MSR33

El plásmido pTP6 fue transferido a *Cupriavidus metallidurans* CH34 a través de una conjugación biparental, técnica conocida en el estado del arte. Se realizó una conjugación de las células dadoras, *Escherichia coli* JM109, que contienen el plásmido pTP6, y las células receptoras, *Cupriavidus metallidurans* CH34.

De esta manera se obtuvo la cepa recombinante, *Cupriavidus metallidurans* MSR33, la cual mostró una nueva resistencia a mercurio orgánico, una mayor resistencia a mercurio inorgánico y a cadmio, y mantuvo su resistencia a cobre.

Descripción de la cepa *Cupriavidus metallidurans* MSR33

La nueva cepa *Cupriavidus metallidurans* MSR33 posee el gen *merB*, que codifica para una proteína que proporciona resistencia a compuestos organomercuriales, posee genes adicionales de resistencia a mercurio, que son *merP*, *merT*, *merA* y *merD*, y un nuevo gen de transporte de mercurio *merE*. El aumento de la resistencia a metales pesados se comprobó mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en placas con medio Tris mineral suplementados con distintas concentraciones de metales y de metilmercurio como compuesto organomercurial. La incorporación del plásmido pTP6 conocido en el estado del arte permitió que la cepa MSR33 posea un CMI para Hg^{+2} de 24 $\mu g/g$, para metilmercurio de 18 $\mu g/g$, y para cadmio de 160 $\mu g/g$. La cepa nativa CH34 posee una CMI para mercurio de 10 $\mu g/g$, para cadmio de 100 $\mu g/g$ y no posee resistencia a compuestos organomercuriales. La CMI para cobre de la cepa MSR33 y la cepa nativa CH34 es de 240 $\mu g/g$ (Tabla 1).

La incorporación del gen *merB* en la cepa MSR33 se confirmó por la técnica de amplificación de genes denominada PCR, técnica conocida en el estado del arte. Utilizando partidores específicos se detectó el gen *merB* en el plásmido pTP6 extraído de la cepa MSR33.

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria a metilmercurio, mercurio, cadmio y cobre

Metales ($\mu g/g$)	Cepas	Aumento de resistencia	
		(veces)	
MSR33	CH34		
MeHg ⁺	18	< 1	>18,0
Hg ⁺²	24	10	2,4
Cd ⁺²	160	100	1,6
Cu ⁺²	240	240	-

La estabilidad del fenotipo de resistencia a mercurio de la cepa MSR33 se estudió durante cien generaciones, creciendo en medio LB líquido sin presión selectiva. Para esto se plaquearon colonias en medio sólido para posteriormente transferirlas a medio rico sólido PCA suplementado con Hg^{+2} 100 $\mu g/g$. Se determinó que el 100% de

las colonias recombinantes mantuvieron la resistencia a mercurio al cabo de 70 generaciones. El 80% de las colonias recombinantes mantuvo la resistencia a mercurio al cabo de 100 generaciones. Para confirmar que la resistencia se debía a la presencia del plásmido pTP6 y descartar un evento de recombinación, se realizó una extracción plasmidial desde colonias recombinantes a las 70 y 100 generaciones, observándose la presencia del plásmido pTP6 en todas las cepas seleccionadas.

Para caracterizar las nuevas capacidades de resistencia a mercurio, la cepa recombinante *Cupriavidus metallidurans* MSR33, fue crecida en medio mínimo suplementado con succinato como única fuente de carbono y de energía y en presencia o ausencia de mercurio. Asimismo, se creció la cepa nativa *Cupriavidus metallidurans* CH34.

La figura 1 muestra el crecimiento de la cepa MSR33 y de la cepa CH34 en medio mínimo Tris mineral. Las curvas de crecimiento son similares. Por otra parte, la adición de 8 µg/g de Hg⁺² en la mitad de la fase exponencial no afecta el crecimiento del recombinante MSR33 (figura 2); en contraste la misma adición de 8 µg/g de Hg⁺² en la mitad de la fase exponencial detiene el crecimiento de la cepa nativa CH34.

La presente invención, además, se refiere a un producto útil para la biorremediación de ambientes contaminados con compuestos de mercurio y otros metales pesados como cadmio y cobre, donde dicho producto comprende un inóculo bacteriano de la cepa *Cupriavidus metallidurans* MSR33. Dicho producto para biorremediación contiene un inóculo de la cepa bacteriana biorremediadora, *Cupriavidus metallidurans* MSR33 NRRL B-50299 de la presente invención, en una concentración comprendida en el rango desde alrededor de 10⁴ a 10¹² células/ml en medio de cultivo o en medio salino a pH neutro o en medio tamponado a pH neutro.

En una modalidad adicional, el producto útil para la biorremediación de ambientes contaminados con compuestos de sales de mercurio y otros metales pesados, comprende un inóculo bacteriano de la cepa *Cupriavidus metallidurans* MSR33, en donde las células bacterianas se encuentran liofilizadas, lo cual facilita su transporte y comercialización.

En una modalidad adicional, el producto útil para la biorremediación de ambientes contaminados con compuestos de mercurio y otros metales pesados, comprende un inóculo bacteriano de la cepa *Cupriavidus metallidurans* MSR33, en donde las células bacterianas se encuentran encapsuladas en alginato, dicha encapsulación permite proteger a las células bacterianas y disminuir su exposición a compuestos tóxicos, aumentando su estabilidad y viabilidad.

En una modalidad adicional, la presente invención tiene como objeto proveer un método de tratamiento para la biorremediación de un ambiente contaminado con compuestos inorgánicos y orgánicos de mercurio, cadmio y cobre. Ambientes tales como suelos, lodos, sedimentos y aguas contaminadas con una o ambas formas químicas de mercurio se encuentran incluidos en la presente invención.

En una de las modalidades de la invención, el método de biorremediación comprende la adición de un cultivo de la cepa *Cupriavidus metallidurans* MSR33, al medio contaminado con las especies de mercurio (II). En el método de la presente invención, se permite que transcurra un período de tiempo de una hora a cuatro semanas para que dicha cepa bacteriana biorremediadora volatilice mercurio y remueva otros metales pesados como cadmio y cobre desde el medio contaminado.

Por ejemplo, se puede agregar la cepa bacteriana biorremediadora de la presente invención a un medio contaminado con especies de mercurio (II) y otros metales pesados, en la forma de un inóculo que contiene entre alrededor de 10⁴ a 10¹² células/ml en medio de cultivo o en medio salino a pH neutro o en medio tamponado a pH neutro o cercano a la neutralidad. Luego dicha cepa bacteriana es incubada en dicho medio contaminado con especies de mercurio (II) y otros metales pesados durante un período de tiempo que puede ser, por ejemplo, desde 1 hora a 4 semanas, lo que dependerá de las características de la matriz a tratar para permitir que se volatilicen las especies de mercurio y se remuevan otros metales pesados presentes.

El proceso de biorremediación antes descrito, puede ser monitoreado de manera periódica, efectuando muestreos de la matriz contaminada, digestión de la muestra para la extracción de metales pesados por ejemplo con ácidos concentrados y calor y analizando la presencia de metales pesados por ejemplo mediante un método espectroscópico como emisión o absorción atómica.

En una modalidad adicional, la cepa bacteriana biorremediadora, de la presente invención, puede ser cultivada en presencia de un agente que tiene la particularidad de estimular la capacidad de remoción de metales pesados de dicha cepa bacteriana biorremediadora, *Cupriavidus metallidurans* MSR33, como por ejemplo un inductor de la expresión de los genes *mer*, lo cual resulta en una biorremediación más eficiente de los metales pesados. Por ejemplo, dicho agente inductor puede ser Hg⁺², Cd⁺² o ambos.

En una modalidad adicional, la cepa bacteriana biorremediadora, *Cupriavidus metallidurans* MSR33 de la presente invención, puede ser agregada a un medio contaminado con especies de mercurio (II) y otros metales pesados, tal como se ha descrito antes, en donde dicho inóculo de la cepa MSR33, es acompañado de un agente reductor que

tiene la particularidad de estimular la capacidad de remoción de metales pesados de dicha bacteria, lo cual resulta en una biorremediación más eficiente de las especies de mercurio. Por ejemplo, dicho agente reductor puede ser tioglicolato de sodio o de potasio.

- 5 De forma preferente el medio contaminado citado anteriormente corresponde a una matriz extraída del ambiente contaminado, y relocalizada en un sistema contenido. Se entiende por sistema contenido, un espacio en el cual la matriz contaminada no tiene contacto directo con el medioambiente colindante.

En la presente invención, el término “microcosmos”, representa a un cierto volumen de suelo, agua, lodo, sedimento dispuesto en un recipiente (frasco) cuyas variables relevantes tales como la humedad, densidad y la presencia o
10 ausencia de microorganismos y/o contaminantes como metales pesados son conocidas y controladas.

De acuerdo con lo anterior la cepa MSR33 de la invención ha solucionado el problema de biorremediar mercurio en presencia de otros metales pesados.

EJEMPLO 1: Remoción de mercurio inorgánico por *Cupriavidus metallidurans* MSR33 desde un agua contaminada.

Se evaluó la capacidad de biorremediación de la cepa MSR33 para remover mercurio inorgánico desde un agua
15 contaminada. Se realizaron cinéticas de remoción de mercurio inorgánico (Hg^{+2}) en una solución que contenía 20 $\mu g/g$ de Hg^{+2} en solución amortiguadora fosfato 50 mM utilizando un biorreactor. El sistema consistió en un frasco de plástico de 250 ml de volumen útil, aireado con una bomba de aire con un flujo constante de 300 ml/min, una salida del mercurio volatilizado y una trampa que contenía HNO_3 al 10% para su recuperación. El sistema fue mantenido a
20 $30^\circ C$ y se encuentra representado en la figura 3. Se incubaron cultivos en fase estacionaria temprana (turbidez a 600 nm de 1,1), equivalente a una concentración aproximada de 10^9 células por ml. La bacteria fue cultivada utilizando medio mínimo Tris mineral utilizando succinato como única fuente de carbono y energía y Hg^{+2} 2 $\mu g/g$ como inductor de los genes *mer*. Las células crecidas se concentraron 10 veces y se adicionaron a la solución contaminada con mercurio inorgánico en una relación 1:10. Se tomaron muestras las cuales se centrifugaron para sedimentar las bacterias y el sobrenadante fue utilizado para medir el mercurio inorgánico residual mediante un
25 equipo de plasma acoplado inductivamente (Perkin Elmer, Optima 2000 series) y generación de hidruro (CV-ICP-OES). Cada experimento fue realizado en triplicado en ausencia y presencia de tioglicolato 5 mM para evaluar su efecto reductor sobre la eficiencia en la biorremediación. Se observa que la cepa MSR33 es capaz de remover eficientemente el mercurio inorgánico mediante volatilización en un lapso de 2 horas en presencia de tioglicolato, y alcanza una remoción de un 82% en ausencia de tioglicolato. No existe remoción de mercurio en ausencia de la
30 cepa MSR33, ya sea en presencia o en ausencia de tioglicolato, por lo cual la presencia de la cepa MSR33 es la responsable de la remoción de mercurio (figura 4).

EJEMPLO 2: Remoción de mercurio inorgánico (Hg^{+2}) y mercurio orgánico ($MetilHg^+$) por *Cupriavidus metallidurans* MSR33 desde un lodo contaminado.

Se evaluó la capacidad de la cepa MSR33 para remover mercurio inorgánico desde un lodo contaminado. Se
35 realizaron cinéticas de remoción de mercurio inorgánico (Hg^{+2}) desde un lodo contaminado. Para ello se preparó un sistema de microcosmos consistente en 20 gramos de suelo de densidad de 2 g/cc conteniendo 67,6 mg/kg de cobre en un frasco de plástico de 500 ml. Se le adicionó 100 ml de tampón fosfato 50 mM para formar el lodo y permitir la aireación y agitación. Posteriormente se le adicionó 40 $\mu g/g$ de Hg^{+2} , 20 $\mu g/g$ de $MetilHg^+$, tioglicolato a una concentración final 5 mM. Se adicionó la cepa MSR33 a una concentración final de 10^9 células por ml. El
40 sistema fue mantenido en baño a $30^\circ C$ y el mercurio volatilizado fue recuperado en trampa de HNO_3 al 10%. El sistema fue aireado y agitado con bomba de aire a un flujo de 600 ml/min. El mercurio en el sobrenadante y en el lodo fue medido a las 0, 3, 5, 18 y 21 horas mediante HG-ICP-OES. Los experimentos fueron realizados en triplicado. Se observó en presencia de la cepa MSR33 una remoción total de las especies de mercurio (II) y metilmercurio en el sobrenadante y en el lodo al cabo de 18 horas. La cepa nativa CH34 no tuvo la capacidad de remoción de mercurio
45 (figura 5).

EJEMPLO 3: Remoción de mercurio inorgánico y metilmercurio por *Cupriavidus metallidurans* MSR33 desde un suelo contaminado además con cadmio y cobre.

Se evaluó la capacidad de biorremediación de mercurio inorgánico y metilmercurio de la cepa MSR33 de un suelo
50 contaminado con mercurio inorgánico (23 $\mu g/g$), metilmercurio (2 $\mu g/g$), cadmio (20 $\mu g/g$) y cobre (68 $\mu g/g$). Para ello se preparó un sistema de microcosmos consistente en 20 gramos de suelo de densidad de 2 g/cc con dichos metales pesados en un frasco de plástico de 500 ml. Se le adicionó 100 ml de medio de cultivo Tris sales minerales con una concentración de la cepa MSR33 crecida de 10^9 células/ml, para remover el mercurio inorgánico y metilmercurio, y para disminuir la densidad del suelo hasta un 10% formando un lodo homogéneo y permitir la agitación. El sistema fue mantenido en baño a $30^\circ C$. El sistema fue aireado y agitado con bomba de aire a un flujo

de 600 ml/min. El mercurio volatilizado fue capturado en trampa de HNO₃ al 10% para su re-oxidación. Se tomaron muestras de suelo, los cuales fueron secados, pesados y digeridos con ácidos para la cuantificación de mercurio (II) mediante CV-ICP-OES. Los experimentos fueron realizados en triplicado. Se observó que la cepa MSR33 realizó una remoción de un 77% de las especies de mercurio (II) al cabo de 72 horas. En ausencia de bacterias no hubo remoción de las especies de mercurio (II) (figura 6).

EJEMPLO 4: Remoción de cadmio por *Cupriavidus metallidurans* MSR33 desde un suelo contaminado además con cobre y especies de mercurio (II).

Se evaluó la capacidad de biorremediación de cadmio de la cepa MSR33 de un suelo contaminado con cadmio (20 µg/g), cobre (68 µg/g), mercurio inorgánico (23 µg/g) y metilmercurio (2 µg/g). Para ello se preparó un sistema de microcosmos consistente en 20 gramos de suelo de densidad de 2 g/cc con dichos metales pesados en un frasco de plástico de 500 ml. Se le adicionó 100 ml de medio de cultivo Tris sales minerales con una concentración de la cepa MSR33 crecida de 10⁹ células/ml para remover el cobre y para disminuir la densidad del suelo hasta un 10% formando un lodo homogéneo y permitir la agitación. El sistema fue mantenido en baño a 30°C. El sistema fue aireado y agitado con bomba de aire a un flujo de 600 ml/min. Se tomaron muestras de suelo, los cuales fueron secados, pesados y digeridos con ácidos para la cuantificación de cobre mediante ICP-OES. Los experimentos fueron realizados en triplicado. Se observó que cepa MSR33 realizó una remoción de un 75% de cadmio después de 72 horas. En ausencia de bacterias no hubo remoción de cadmio (figura 7).

EJEMPLO 5: Remoción de cobre por *Cupriavidus metallidurans* MSR33 desde un suelo contaminado además con cadmio y especies de mercurio (II).

Se evaluó la capacidad de biorremediación de cobre de la cepa MSR33. Se estudió la remoción de cobre de un suelo contaminado con cobre (68 µg/g), cadmio (20 µg/g), mercurio inorgánico (23 µg/g) y metilmercurio (2 µg/g). Para ello se preparó un sistema de microcosmos consistente en 20 gramos de suelo de densidad de 2 g/cc con dichos metales pesados en un frasco de plástico de 500 ml. Se le adicionó 100 ml de medio de cultivo Tris sales minerales con una concentración de la cepa MSR33 crecida de 10⁹ células/ml para remover el cobre y para disminuir la densidad del suelo hasta un 10% formando un lodo homogéneo y permitir la agitación. El sistema fue mantenido en baño a 30°C. El sistema fue aireado y agitado con bomba de aire a un flujo de 600 ml/min. Se tomaron muestras de suelo, los cuales fueron secados, pesados y digeridos con ácidos para la cuantificación de cobre mediante ICP-OES. Los experimentos fueron realizados en triplicado. Se observó que la cepa MSR33 realizó una remoción de un 68% de cobre después de 72 horas. En ausencia de bacterias no hubo remoción de cobre (figura 8).

REIVINDICACIONES

1. Una cepa bacteriana biorremediadora, caracterizada por que corresponde a la cepa Cupriavidus metallidurans MSR33, depositada bajo el número de acceso NRRL B-50299.
- 5 2. La cepa bacteriana biorremediadora de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizada por que contiene el plasmidio pTP6.
3. La cepa bacteriana biorremediadora de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizada por que contiene los genes de resistencia al mercurio merR1, merT, merP, merA, merG, merB1, merR2, merB2, merD2 y merE.
4. La cepa bacteriana biorremediadora de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizada por que es capaz de biorremediar metales pesados.
- 10 5. La cepa bacteriana biorremediadora de acuerdo a la reivindicación 4, caracterizada por que dicho metal pesado es mercurio en su forma inorgánica, mercurio en su forma orgánica, cadmio o cobre.
6. Un producto para la biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados, caracterizado por que comprende un inóculo bacteriano de la cepa Cupriavidus metallidurans MSR33, NRRL B-50299 de acuerdo a las reivindicaciones 1 y 2.
- 15 7. El producto para la biorremediación de acuerdo a la reivindicación 6, caracterizado por que dicho inóculo contiene alrededor de 104 a 1012 células/ml de la cepa Cupriavidus metallidurans MSR33.
8. El producto para la biorremediación de acuerdo a la reivindicación 6, caracterizado por que dicho inóculo contiene células liofilizadas de la cepa Cupriavidus metallidurans MSR33.
- 20 9. El producto para la biorremediación de acuerdo a la reivindicación 6, caracterizado por que dicho inóculo contiene células encapsuladas en alginato de la cepa Cupriavidus metallidurans MSR33.
10. El producto para la biorremediación de acuerdo a las reivindicaciones 6, 7, 8 ó 9 caracterizado por que dicho inóculo bacteriano ha sido cultivado en presencia de mercurio inorgánico o cadmio inorgánico en estado de oxidación bivalente como inductores de los genes mer.
- 25 11. Un método para la biorremediación de un ambiente contaminado con metales pesados, caracterizado por que dicho método comprende las etapas de:
 - a) agregar el producto de acuerdo a las reivindicaciones 6, 7, 8 ó 9 a dicho ambiente contaminado con metales pesados, en donde dicha cepa Cupriavidus metallidurans MSR33, NRRL B-50299, es capaz de remover un metal pesado o varios metales pesados;
 - 30 b) incubar dicho producto que contiene el inóculo bacteriano en dicho ambiente durante un periodo de tiempo de entre 1 hora hasta 4 semanas para permitir la remoción de metales pesados contenido en dicho ambiente.
12. Un método de acuerdo a la reivindicación 11, caracterizado por que dicho metal pesado es mercurio en su forma orgánica o inorgánica, cadmio o cobre.
- 35 13. Un método para la biorremediación de un ambiente contaminado con metales pesados de acuerdo a la reivindicación 11, caracterizado por que dicha incubación de dicho producto que contiene el inóculo bacteriano en dicho ambiente se realiza adicionalmente en presencia de un reductor como tioglicolato (mercaptoacetato) durante un periodo de tiempo de entre 1 hora hasta 4 semanas para permitir la remoción de especies de mercurio (II) contenido en dicho ambiente.
- 40 14. Un método para la biorremediación de un ambiente contaminado con especies de mercurio (II) de acuerdo a la reivindicación 11, caracterizado por que dicho método comprende las etapas de:
 - a) agregar el producto de acuerdo a las reivindicaciones 6, 7, 8 ó 9 a dicho ambiente contaminado con especies de mercurio (II) en presencia del reductor tioglicolato de sodio o potasio, en donde dicha bacteria es capaz de remover dichas especies de mercurio (II) e;
 - b) incubar dicho producto que contiene el inóculo bacteriano en dicho ambiente durante un periodo de entre 1 hora hasta 4 semanas para permitir la remoción de dichas especies de mercurio (II) contenido en dicho ambiente.
- 45 15. Un método para la biorremediación de un ambiente contaminado con cadmio de acuerdo a la reivindicación 11, caracterizado por que dicho método comprende las etapas de:

- a) agregar el producto de acuerdo a las reivindicaciones 6, 7, 8 ó 9 a dicho ambiente contaminado con cadmio, en donde dicha bacteria es capaz de remover dicho metal e;
 - b) incubar dicho producto que contiene el inóculo bacteriano en dicho ambiente durante un periodo de entre 1 hora hasta 4 semanas para permitir la remoción de dicho metal contenido en dicho ambiente.
- 5 16. Un método para la biorremediación de un ambiente contaminado con cobre de acuerdo a la reivindicación 11, caracterizado por que dicho método comprende las etapas de:
- a) agregar el producto de acuerdo a las reivindicaciones 6, 7, 8 ó 9 a dicho ambiente contaminado con cobre, en donde dicha bacteria es capaz de remover dicho metal e;
 - b) incubar dicho producto que contiene el inóculo bacteriano en dicho ambiente durante un periodo de entre 1 hora hasta 4 semanas para permitir la remoción de dicho metal contenido en dicho ambiente.
- 10 17. Proceso de obtención del producto de las reivindicaciones 6 a 10, caracterizado por que se cultiva la cepa *Cupriavidus metallidurans* MSR33, NRRL B-50299, hasta alcanzar una concentración de entre 10^4 a 10^{12} células/ml.
18. Proceso de acuerdo con la reivindicación 17 caracterizado por que dicho inóculo bacteriano ha sido cultivado en presencia de mercurio inorgánico en estado de oxidación bivalente como un inductor de los genes mer.
- 15 19. Proceso de acuerdo con la reivindicación 17 caracterizado por que dicho inóculo bacteriano ha sido cultivado en presencia de cadmio inorgánico en estado de oxidación bivalente como un inductor de los genes mer.

FIGURA 1

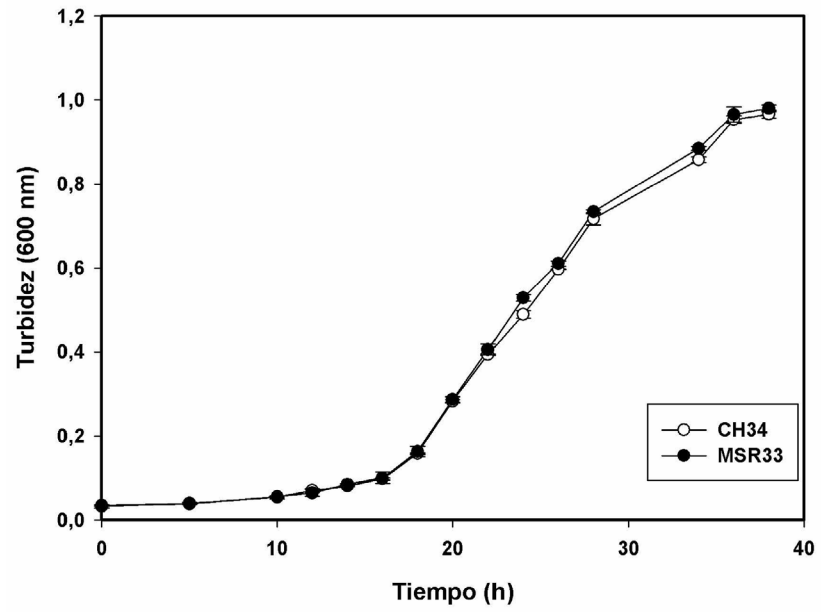


FIGURA 2

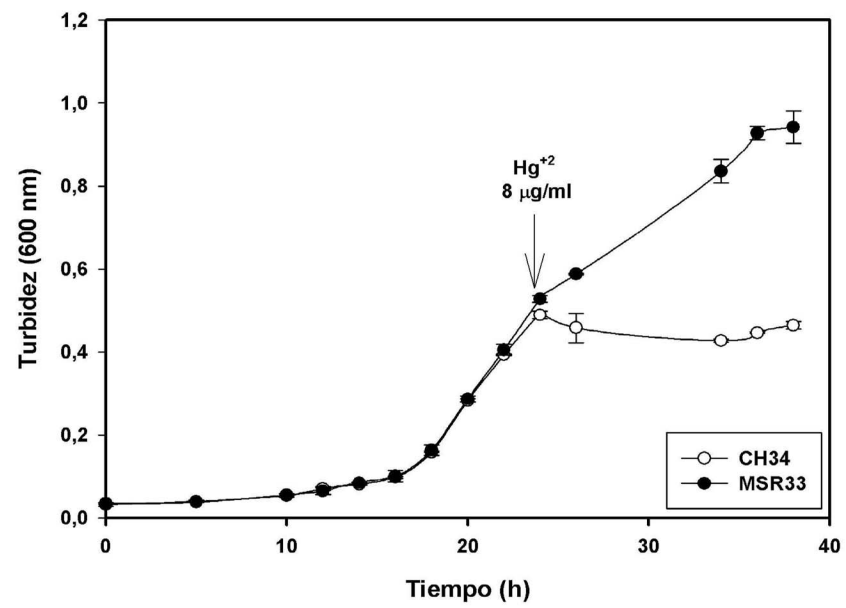


FIGURA 3

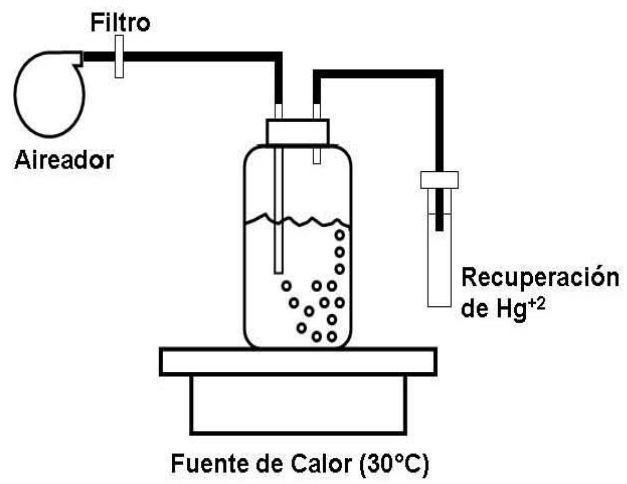


FIGURA 4

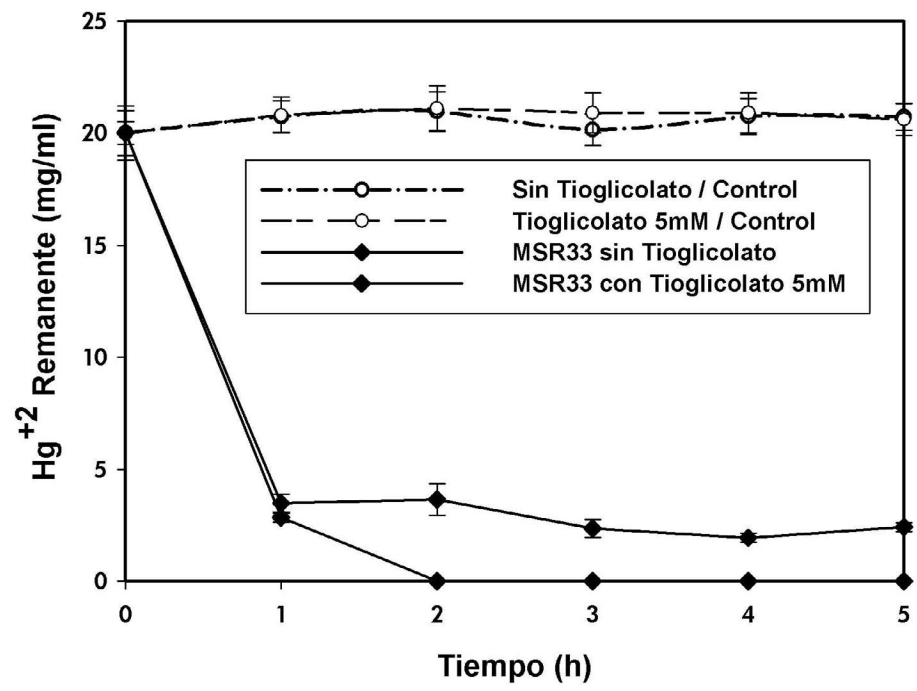


FIGURA 5

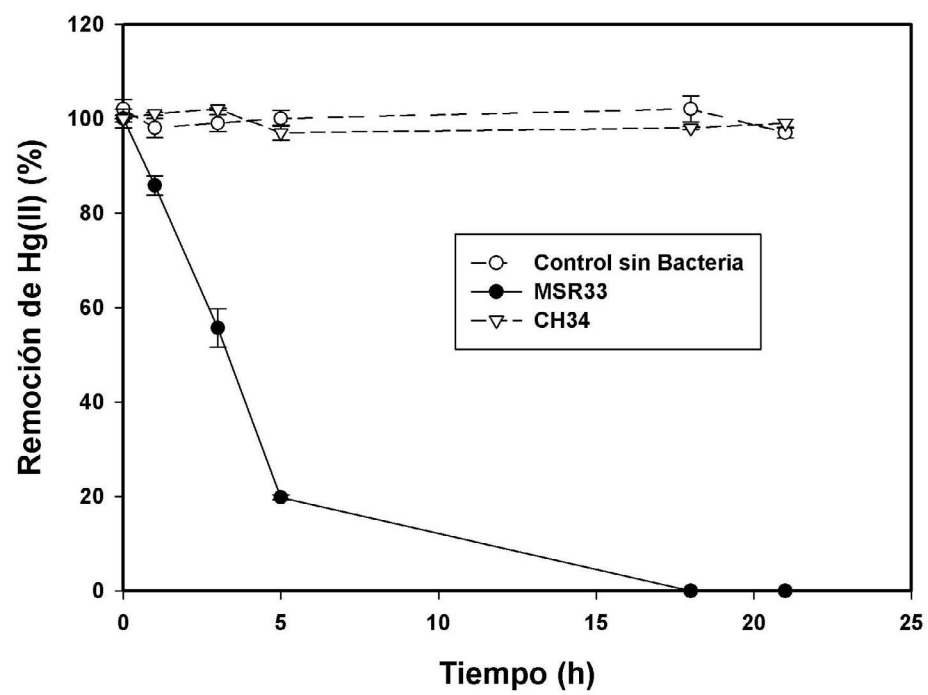


FIGURA 6

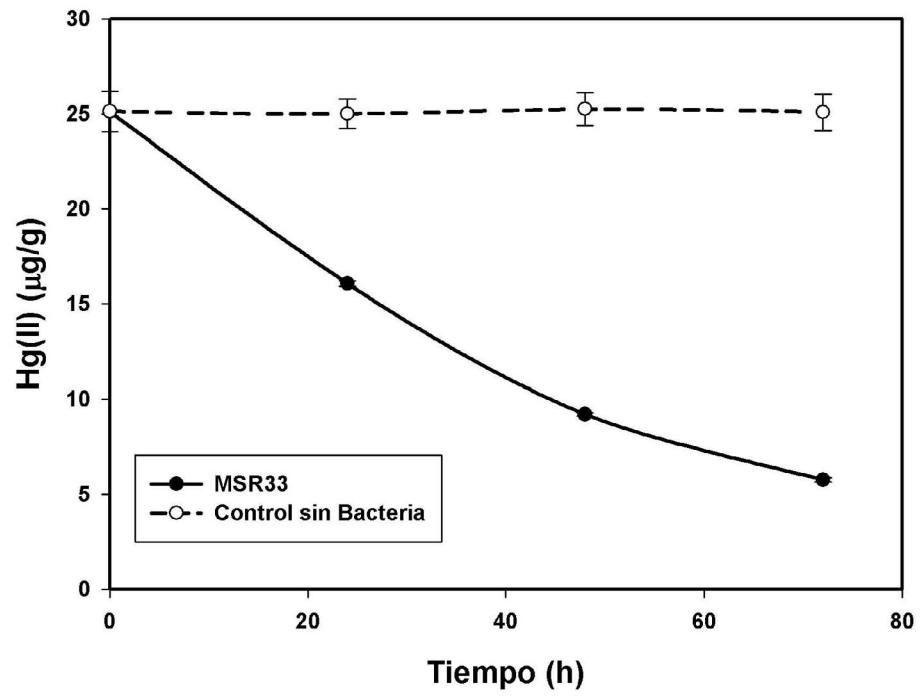


FIGURA 7

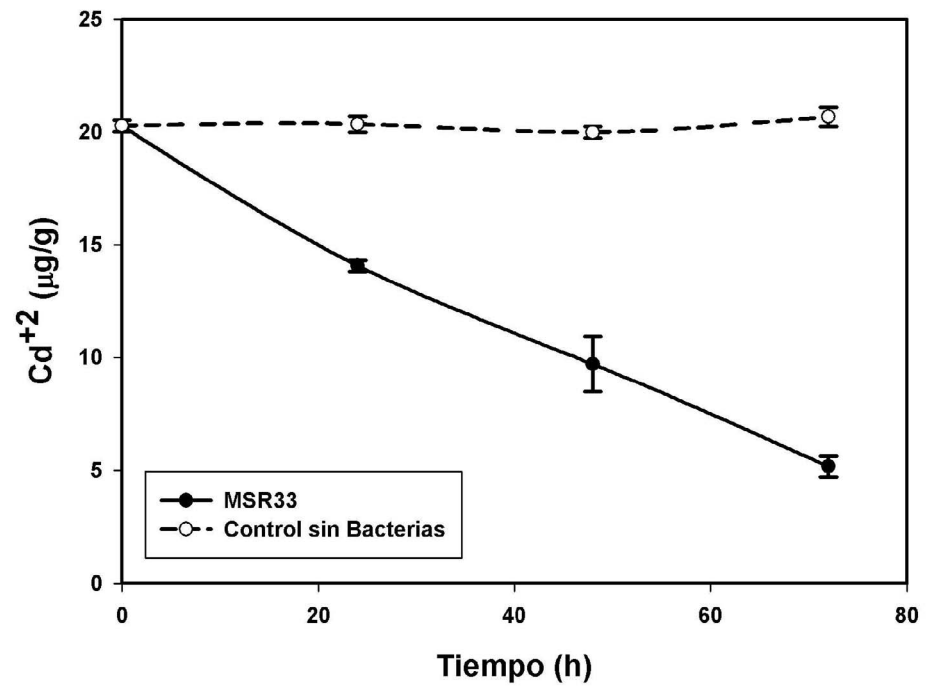


FIGURA 8

