



INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD

P200803484

(1) MODALIDAD:

PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD:

ADICION A LA PATENTE
 SOLICITUD DIVISIONAL
 CAMBIO DE MODALIDAD
 TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA
 PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:
 MODALIDAD
 N° SOLICITUD
 FECHA SOLICITUD

FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN LA O.E.P.M. **08 DIC 9 16:01**

FECHA Y HORA PRESENTACION EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACION:

MADRID

CODIGO

28

(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACION SOCIAL

NOMBRE

Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (CSIC) (70%)

NACIONALIDAD

Española

CODIGO PAIS

ES

DNI/CIF

Q2818002D

CNAE

PYME

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO **C/ Serrano, 117**

LOCALIDAD **Madrid**

PROVINCIA **Madrid**

PAIS RESIDENCIA **España**

NACIONALIDAD **Española**

TELÉFONO

FAX

CORREO ELECTRÓNICO

CODIGO POSTAL **28006**

CODIGO PAIS **ES**

CODIGO PAIS **ES**

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

CODIGO PAIS

**Benítez León
 Moreno Sánchez
 Nogales Vargas-Machuca**

**Emilio
 Beatriz
 Rogelio**

**Española
 Española
 Española**

**ES
 ES
 ES**

(8) EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCION DEL DERECHO:

INVENC. LABORAL CONTRATO SUCESION

(10) TITULO DE LA INVENCION:

COMPUESTOS POTENCIADORES DE LA ACTIVIDAD DE GLICOSIDASAS MUTANTES

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA: SI NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAIS DE ORIGEN

CODIGO PAIS

NUMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

(15) AGENTE /REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCION POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CODIGO) (RELLÉNESE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

ANGEL PONS ARIÑO (0499/05) GLORIETA RUBEN DARIO, 4 28010 MADRID

(16) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

DESCRIPCION N° DE PAGINAS: **15** DOCUMENTO DE REPRESENTACION
 N° DE REIVINDICACIONES: **8** JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD
 DIBUJOS. N° DE PAGINAS: **2** HOJA DE INFORMACION COMPLEMENTARIA
 LISTA DE SECUENCIAS N° DE PAGINAS: PRUEBAS DE LOS DIBUJOS
 RESUMEN CUESTIONARIO DE PROSPECCION
 DOCUMENTO DE PRIORIDAD OTROS: **Poder General 20081765**
 TRADUCCION DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

ANGEL PONS ARIÑO

(VER COMUNICACION)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACION SOBRE LA TASA DE CONCESION:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

HOJA DE INFORMACION COMPLEMENTARIA

NÚMERO DE SOLICITUD

P20080348 4

FECHA DE PRESENTACIÓN

PATENTE DE INVENCION

MODELO DE UTILIDAD

(5) SOLICITANTES:		APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL		NOMBRE	NACIONALIDAD	CÓDIGO PAÍS	DNI/CIF	CNAE	PYME
Universitá Degli Studi Di Milano-Bicocca (30%)					Italiana	IT			
(7) INVENTORES:		APELLIDOS		NOMBRE		NACIONALIDAD			
Di Gennaro				Patrizia		Italiana			
(12) EXPOSICIONES OFICIALES:				LUGAR		FECHA			
(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:		CÓDIGO PAÍS	NÚMERO		FECHA				
PAÍS DE ORIGEN									

MOD. 3102i - 2 - EJEMPLAR PARA EL SOLICITANTE

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



12

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

21

NÚMERO DE SOLICITUD

31 NÚMERO

DATOS DE PRIORIDAD

32 FECHA

33 PAÍS

22

FECHA DE PRESENTACIÓN

62

PATENTE DE LA QUE ES
DIVISORIA

71 SOLICITANTE (S)

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) (70%) , Universitá Degli Studi Di Milano-Bicocca (30%)

DOMICILIO C/ Serrano, 117 28006 Madrid (España)

NACIONALIDAD Española

72

INVENTOR (ES) Emilio Benitez León, Beatriz Moreno Sánchez, Rogelio Nogales Vargas-Machuca, Patrizia Di Gennaro

51

Int. Cl.

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

54

TÍTULO DE LA INVENCION

**USO DE VERMICOMPOST DE ALPERUJO PARA LA
DESCONTAMINACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON
HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS**

57

RESUMEN

**USO DE VERMICOMPOST DE ALPERUJO PARA LA DESCONTAMINACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON
HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS**

La presente invención se refiere al uso de vermicompost de alperujo como enmienda orgánica en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH). El vermicompost induce la expresión de genes implicados en la degradación de naftaleno (naftaleno-dioxigenasa, NDO) de comunidades bacterianas del suelo. En la presente invención, el naftaleno es utilizado como modelo químico para la degradación de PAH.

Uso de vermicompost de alperujo para la descontaminación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos

La presente invención se refiere al uso de vermicompost de alperujo como
5 enmienda orgánica en la biorremediación de suelos contaminados por
hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH). El vermicompost induce la
expresión de genes implicados en la degradación de naftaleno (naftaleno-
dioxigenasa, NDO) de comunidades bacterianas del suelo. En la presente
10 invención, el naftaleno es utilizado como modelo químico para la degradación
de PAH.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 Los hidrocarburos aromáticos son agentes contaminantes comúnmente
encontrados en el suelo y las aguas subterráneas como resultado de la
actividad industrial antrópica. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs)
son derivados aromáticos del benceno generados en erupciones volcánicas,
incendios forestales o en la combustión de derivados del petróleo o del carbón.
20 Los PAHs presentan un alto potencial de riesgo para la salud; siete de estos
compuestos son conocidos agentes carcinógenos (Harvey (1996). Polycyclic
Aromatic Compounds 9:1–23).

Los estudios de la degradación del naftaleno pueden ser de gran interés
25 porque el naftaleno es un agente contaminante común que sirve como modelo
químico para la degradación de PAHs.

El vermicompostaje es el proceso a través del cual las lombrices digieren
desechos de materia orgánica produciendo el llamado vermicompost. El
30 vermicompost de alperujo es el resultado de la digestión, por parte de las
lombrices, de un subproducto de las almazaras producido como consecuencia
de la extracción de aceite de oliva mediante un sistema de dos fases,
constituido por una mezcla de aguas de vegetación o alpechines; partes sólidas
de la aceituna, como el hueso, el mesocarpio y la piel; y restos grasos.

35 El vermicompost de alperujo favorece la retención de solventes clorados,
plaguicidas y metales pesados en el suelo, lo que reduce la entrada de estos

contaminantes a las aguas subterráneas y a los cultivos. Además, otra aplicación del producto obtenido por el procesamiento de residuos mediante las lombrices, consiste en su uso como biofungicidas (Melgar *et al.* (2003). Potencialidad del compostaje y vermicompost de alperujo para reducir la infección de semillas de guisante por *Pythium ultimum*: Resultados preliminares. Feria Internacional del aceite de oliva, Expoliva 2003).

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

10

La presente invención se refiere al uso de vermicompost de alperujo como enmienda orgánica en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH). El vermicompost induce la expresión de genes implicados en la degradación de naftaleno (naftaleno-dioxigenasa, NDO) de comunidades bacterianas del suelo. En la presente invención el naftaleno es utilizado como modelo químico para la degradación de PAH. Para ello, se siguieron dos aproximaciones: La primera fue evaluar el efecto de la adición de vermicompost de alperujo sobre un suelo históricamente contaminado por PAH procedente de un área industrial de Nápoles. En la segunda, se evaluó la respuesta de la población bacteriana originaria del vermicompost a diferentes concentraciones de naftaleno.

20

En la presente invención se demuestra la biosíntesis de enzimas implicadas en la degradación del naftaleno debido a la adición de vermicompost. Cuando el vermicompost se contamina artificialmente, todo el naftaleno también se degrada. El gen que codifica para la enzima naftaleno dioxigenasa (NDO) se expresa después de un mes de incubación en todos los tratamientos y además, en el suelo enmendado, la adición de vermicompost aumenta la expresión de dicha enzima con una biodegradación concomitante del naftaleno. En el vermicompost contaminado, la expresión es más alta a niveles más bajos de contaminación de naftaleno (10 µg/g) mientras que a niveles más elevados (100 µg/g) se produce un efecto tóxico sobre la comunidad bacteriana.

25

30

La biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos mediante el uso de enmiendas orgánicas de vermicompost de alperujo resultaría una reutilización de un residuo y la descontaminación de PAH de suelos históricamente contaminados.

35

En este sentido, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de vermicompost de alperujo para aumentar la expresión de enzimas bacterianas que degradan hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH).

5 La enzima que degrada hidrocarburos policíclicos aromáticos se selecciona, pero sin limitarse, de la lista que comprende naftaleno 1,2-dioxigenasa (NDO), 1,2-dihidroxi-1,2- dihidronaftaleno dehidrogenasa, 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenasa, 2-hidroxicromeno-2-carboxilato isomerasa, trans-o-
10 hidroxibenzilidenopiruvato hidratasa-aldolasa, salicilaldehído deshidrogenasa salicilato 5-hidroxilasa o salicilato hidroxilasa.

Los PAH son derivados poliméricos del benceno que se forman cuando la materia orgánica se somete a una temperatura alta durante un tiempo
15 suficiente. Los PAH son contaminantes o xenobióticos que persisten en suelos, sedimentos o material particulado suspendido en el aire. Son compuestos liposolubles que se forman como productos de la combustión del petróleo y residuos del procesamiento del carbón. Los PAH tienen propiedades tóxicas, mutagénicas o cancerígenas. El PAH de la presente invención se selecciona de
20 la lista que comprende naftaleno, 1-metilnaftaleno, 2-metilnaftaleno, fenantreno, antraceno, benzo(a)pireno, benzo(e)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, dibenzo(a,h)antraceno, o benzo(g,h,i)perileno, indeno(1,2,3-c,d)pireno.

Una realización preferida es el uso de vermicompost de alperujo donde la
25 enzima es naftaleno dioxigenasa (NDO), también es conocida como (naftaleno 1,2-dioxigenasa). La reacción inicial en la degradación de naftaleno mediada por NDO, es catalizada por un sistema enzimático multicomponente que agrega dos átomos de oxígeno al anillo aromático para formar cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno. Este sistema enzimático consiste en una reductasa, una
30 ferredoxina y un componente catalítico oxigenasa. El componente catalítico, llamado naftaleno 1,2-dioxigenasa (NDO), es un hexámero $\alpha_3\beta_3$. La subunidad α de la NDO (NDO α), contiene el sitio activo y la subunidad β más pequeña quizás tenga solamente un rol estructural. La enzima NDO consta de múltiples subunidades: una polipéptido-reductasa (Rd, peso molecular de
35 aproximadamente 37 KD); una polipéptido-ferredoxina hierro-azufre (Fd, peso molecular de aproximadamente 13 kD); y una proteína hierro-azufre-oxigenasa (ISP) terminal. La propia ISP consta de cuatro subunidades. Es conocido que la

ISP se une al naftaleno, y que en presencia de NADH, Rd, Fd y oxígeno lo reduce a cis-naftalen-dihidrodiol. La Fd es el polipéptido que limita la proporción en esta catálisis de oxidación del naftaleno.

- 5 Según otra realización preferida, el vermicompost de alperujo se usa para la descontaminación de suelos contaminados con PAH.

El término “suelo” tal como se entiende en la presente invención hace referencia al sistema estructurado, biológicamente activo, que tiende a
10 desarrollarse en la superficie de las tierras emergidas por la influencia de la intemperie y de los seres vivos. El término suelo comprende cualquier tipo de horizonte seleccionado de la lista que comprende horizonte de tipo A, B, C o D. Preferentemente se selecciona un suelo procedente del horizonte A (horizonte donde enraíza la materia orgánica o rizosfera). Además, en la presente
15 invención el tipo de suelo se selecciona de la lista que comprende suelos clasificados climáticamente, genéticamente o analíticamente. Preferentemente el tipo de suelo se selecciona de entre cualquier tipo de suelo clasificado climáticamente, es decir, el suelo se selecciona de la lista que comprende, sin limitarse, acrisol, alisol, andosol, anthrosol, arenosol, calcisol, cambisol,
20 chernozem, ferralsol, fluvisol, gleysol, greyzems, gypsisol, histosol, kastanozem, leptosol, lixisol, luvisol, nitisol, phaeozem, planosol, plintosol, podsoluvisol, podzol, regosol, slonchak, solonetz o vertisol.

Otra realización preferida es el uso de vermicompost de alperujo donde el PAH
25 es naftaleno, o cualquiera de sus derivados, o cualquiera de sus sales. El naftaleno ($C_{10}H_8$), conocido como naftalina, alquitrán blanco o alcanfor blanco. Este producto se usa habitualmente en la fabricación, entre otros, de plástico de cloruro de polivinilo (PVC) o bolas o escamas para ahuyentar las polillas. Esta realización preferida se refiere a naftaleno. El derivado de naftaleno es,
30 sin limitarse, metilnaftaleno, como por ejemplo, 1-metilnaftaleno ó 2-metilnaftaleno.

Una realización preferida más es el uso donde el vermicompost de alperujo se
35 adiciona en un porcentaje de entre 10 y 30% del peso seco total del suelo contaminado. Es decir, en un supuesto práctico, cada 10 Kg de peso seco contaminado se mezclan con una cantidad de entre 1 a 3 Kg de vermicompost de alperujo.

Según otra realización más preferida, el vermicompost de alperujo se adiciona en un porcentaje de entre 15 y 25%.

5 En otra realización preferida la concentración de naftaleno del suelo contaminado es menor o igual a 200 microgramos de naftaleno por gramo de suelo. En una realización más preferida la concentración de naftaleno del suelo contaminado es menor o igual a 100 microgramos de naftaleno por gramo de suelo.

10 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se
15 proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

20

FIG. 1. Muestra los perfiles de RNA-DGGE del vermicompost (VC), vermicompost contaminado (VC10 y VC100) y suelo enmendado con vermicompost (S) a 0, 7 y 30 días de incubación.

25 1=VC T₀; 2=VC10 T₀; 3=VC100 T₀; 4=S T₀; 5=VC T₇; 6=VC10 T₇; 7=VC100 T₇; 8=S T₇; 9=VC T₃₀; 10=VC10 T₃₀; 11=VC100 T₃₀; 12=S T₃₀

VC10 está contaminado con 10 µg/g de naftaleno y VC100 está contaminado con 100 µg/g de naftaleno.

30

FIG. 2. Muestra el índice de diversidad de Shannon (eje Y) para los perfiles RNA-DGGE del vermicompost (VC), vermicompost contaminado (VC10 y VC100) y en suelo enmendado con vermicompost (S) a 0, 7 y 30 días de incubación (eje X).

35

FIG. 3. Muestra el análisis clúster basado en el índice de similaridad de Raup y Crick (S) para los perfiles RNA-DGGE del vermicompost (VC), vermicompost contaminado (VC10 y VC100) y en suelo enmendado con vermicompost (S) a 0, 7 y 30 días de incubación.

5

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen el uso de vermicompost de alperujo para la descontaminación de suelos contaminados con NAH y el análisis de la expresión de la enzima naftaleno dioxigenasa.

15 EJEMPLO 1. Proceso de Vermicompostaje.

El proceso vermicompostaje, así como las características del alperujo y del vermicompost de alperujo se describen en Benítez *et al.*, (2004). Soil Biol. Biochem. 36, 1615-1623.

20

	Alperujo	Vermicompost
Carbono orgánico total (g kg ⁻¹)	521	392
Nitrógeno total (g kg ⁻¹)	8.1	15
C/N	64	27
Ácidos húmicos (g kg ⁻¹)	6.0	9.9
pH	5.1	8.6
Actividad deshidrogenasa (μg INTF g ⁻¹ h ⁻¹)	11	262
Actividad β-glucosidasa (μg PNP g ⁻¹ h ⁻¹)	2127	10964
Actividad fosfatasa (μg PNP g ⁻¹ h ⁻¹)	34525	9838
Actividad ureasa (μg NH ₃ g ⁻¹ h ⁻¹)	21	375
Polifenoles extractables (g kg ⁻¹)	20	3.0

EJEMPLO 2. Diseño experimental.

25 El suelo, históricamente contaminado, fue tomado del área industrial de Bagnoli (Nápoles, Italia). Las actividades industriales desarrolladas durante más de 50 años generaron un problema serio de contaminación en este sitio. En 1994, las actividades fueron paralizadas y un plan de recuperación de suelo comenzó a gestarse.

30

Fueron preparados dos sistemas de muestras:

a) Suelo contaminado por PAH enmendado con el 20% (peso seco) de vermicompost de alperujo (S). Muestras de suelo sin enmendar fueron utilizadas como control.

5 b) Vermicompost contaminado artificialmente con dos niveles diferentes de naftaleno, 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ (VC10) y 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ (VC100). El vermicompost sin contaminar fue utilizado como control (VC).

Tres réplicas de cada sistema de muestras fueron transferidas a potes de cristal y el contenido en agua fue llevado hasta el 80% de la capacidad de retención de agua del suelo. Las muestras fueron incubadas durante un mes a 25°C. Durante el tiempo de incubación, submuestras fueron tomadas a tiempo 0, siete días y un mes, y congeladas inmediatamente durante 2 minutos en Nitrógeno líquido y después almacenadas a -80°C hasta su análisis. Para la determinación de las pérdidas de naftaleno debido a la evaporación, 10 g de vermicompost y 50 g de suelo enmendado fueron esterilizados por tindalización (100°C, 1 h, 3 días). Luego, las muestras fueron irrigadas con agua desionizada para alcanzar la capacidad de campo del 80%, y además, las del vermicompost fueron contaminadas con 0.0122 g de naftaleno. Las muestras fueron incubadas durante un mes en tarros de vidrio esterilizados, los cuales fueron abiertos dos veces por semana bajo condiciones estériles.

EJEMPLO 3. Determinación de naftaleno.

25 El naftaleno fue extraído del suelo y del vermicompost por el método de extracción asistida por microondas con un sistema MarsX (CEM, Matthews, NC, los E.E.U.U.), funcionando a 200 psi y 130°C durante 7 minutos, usando una mezcla de hexano: acetona (1: 1). Luego, los frascos cerrados fueron guardados en hielo durante 30 minutos y después abiertos. Los extractos fueron filtrados con *Whatman 0.45 μm PTFE Membrane Polypropylene Housing*. Posteriormente se le agregó sulfato de sodio anhidro y fueron agitados durante 60 segundos.

35 Dichos extractos fueron analizados usando un cromatógrafo de gases *Trace GC Ultra (Thermo-Finnigan)*, con un inyector automático CTC y conectado a espectrómetro de masas *Trace DSQ (Thermo-Finnigan)*. Columna capilar: Columna capilar DB-5 (*J&W Scientific*) (30 m, 0,25 milímetros i.d., 0,25 milímetros

de espesor); temperatura inicial 45°C; isoterma durante 2 minutos; temperatura 20°C/min; temperatura final 270°C; isoterma durante 3 minutos; inyector (modo *splitless*) 260°C. La temperatura de la línea de transferencia y de la fuente iónica fueron 280 y 250 °C, respectivamente. El nitrógeno fue utilizado como gas portador, con un flujo 1 ml/min. Fue inyectado al cromatógrafo un 1 µL de volumen de cada muestra.

EJEMPLO 4. Extracción de ARN.

10

El ARN total fue extraído, de submuestras de 300 mg del suelo o 250 mg de vermicompost, con el kit total del aislamiento del ARN de *PowerSoil de MoBio (MoBio Laboratories Inc., Solana Beach, CA, USA)* siguiendo las instrucciones del fabricante con dos modificaciones importantes. La primera consistió en agregar 1 ml de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (24: 24: 1) después del paso 8 indicado por el fabricante, agitar durante 2 minutos y centrifugar a 2500 g durante 4 minutos. La fase superior fue transferida a un tubo limpio y se continuó con el paso 9 de las instrucciones. La segunda modificación se realizó después del paso 15. El *pellet* fue resuspendido en 5 ml de agua estéril, 500 µl d NaCl 5M, y 5.5 ml de isopropanol 100%, incubado a -20° C durante 15 minutos y después centrifugado a 2500 g durante 15 minutos. Esto redujo el tamaño del *pellet* y la cantidad de remanente que se utiliza en la columna. El ADN residual fue eliminado agregando ADNasa I usando la *RNase-Free DNase Set (Roche Applied Science, Penzberg, Germany)*, según las instrucciones del fabricante. El ARN fue disuelto en 20 µl de agua libre de ARNasa. Las muestras de ARN libre de ADNasa fueron cuantificadas en concentración y calidad usando el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (*NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware; USA*).

25

El ADN complementario (ADNcp) fue sintetizado a partir de 0.5 µg del ARN libre de ADNasa. La síntesis fue realizada a 50°C durante 30 minutos usando el kit *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Penzberg, Germany)* siguiendo las instrucciones del fabricante, después de lo cual las soluciones de ADNcp fueron almacenadas a -20°C.

35

EJEMPLO 5. Expresión de naftaleno dioxigenasa (NDO). PCR cuantitativa en tiempo real.

5 Para analizar la expresión de los genes que codifican la NDO, el ADNcp de las diversas muestras fue amplificado usando los cebadores específicos nahAc-7F y nahAc-7R que se describen en Park y Crowley (2006). Applied Microbiology and Biotechnology 72: 1322-1329. Las reacciones de PCR a tiempo real fueron realizadas con un *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (PE Applied Biosystems)*. La amplificación fue realizada en un volumen total de 21 μ l que
10 contenía 10.5 μ l 2x SYBR *green PCR master mix (PE Applied Biosystems)*, 500 nM de cada cebador y 1 μ l de ADNcp. Para cada ADNcp, los experimentos de PCR a tiempo real fueron realizados tres veces determinando el ciclo del umbral (CT) en triplicado. Las condiciones del ciclo de temperaturas fueron las siguientes: 2 minutos a 50°C para la prevención del remanente, 10 minutos a 95°C para la
15 activación de la enzima, seguido de 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 45 segundos a 72°C, cuando la señal de la fluorescencia fue medida. Una curva de melt fue medida al final de los 35 ciclos para comprobar la presencia de un único producto de la reacción de la polimerización en cadena.

20 Se llevaron a cabo reacciones de control sin ADNcp para asegurar la ausencia de dímeros de cebador no específicos. Para la normalización del ADNcp se eligió el gen de Eubacteria 16S rRNA, cebadores 27f y 519r que se describen en Hutter *et al.* (2003). Microbiology, 149, 67–75. Los cambios relativos en la expresión del gen de NDO fueron calculados usando un método descrito (Livak y Schmittgen (2001).
25 Methods 25: 402-408).

EJEMPLO 6. Análisis de PCR-DGGE.

30 La PCR fue realizada en muestras del ADNcp con los cebadores universales de DGGE (TIB@MOLBIOL, Berlín, Alemania) P1, P2, y P3 para amplificar la región hipervariable V3 de genes del rDNA 16S (Muyzer *et al.* (1993). Appl. Environ. Microbiol 59, 695-700). Dos amplificaciones sucesivas fueron realizadas de acuerdo con Muyzer *et al.*, (1993) con las modificaciones descritas (Moreno *et al.*
35 (2008). Environ. Sci. Poll. Res. Int. DOI 10.1007/s11356-008-0035-y). Los análisis de DGGE fueron conducidos usando 20 μ l de producto de PCR cargado en un gel de la urea-formamida-poliacrilamida de 30 a del 70%. Un *INGENYphorU System*

(*Ingeny International BV, The Netherlands*) fue usado a 75 V durante 17 horas a 58°C para separar los fragmentos. Los geles fueron teñidos con *Bio-Rad Silver Stain* según el protocolo de coloración estándar de ADN, fotografiados bajo luz UV a $\lambda=254$ nm y evaluados mediante un sistema de documentación de geles de UVIttec (*UVIttec Limited, Cambridge, UK*).

EJEMPLO 7. Análisis de datos.

Los datos de naftaleno y de la polimerización en cadena en tiempo real representan el promedio de tres extracciones de suelo diferentes. Los datos fueron tratados por análisis de la varianza usando el programa STATISTICA StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) y la prueba múltiple de Duncan fue utilizada para separar las medias con un nivel de significación total de 0.05. Los bandos de DGGE en diversos carriles fueron comparados con el software de análisis de UVImap (*UVIttec Limited, Cambridge, UK*). Los carriles fueron normalizados para contener la misma cantidad de señal total después de la corrección de fondo y las imágenes del gel fueron enderezadas y alineadas para dar una curva densitométrica. Los datos de las bandas de DGGE fueron utilizados para estimar dos índices de diversidad tratando cada banda como unidad taxonómica operacional individual. Para estos análisis, se presumió que cada banda representaba la capacidad de una especie bacteriana de ser amplificada (Ibekwe y Grieve (2004) *FEMS Microbiol. Ecol.* 48: 239-248) y la intensidad de las bandas fue reflejada como alturas de pico en la curva densitométrica.

El índice de Shannon de diversidad general H' (Shannon y Weaver (1963). *The mathematical theory of communication. The University of Illinois Press, Urbana, Illinois*) fue calculado según la siguiente ecuación:

$$H' = - \sum (P_i \log P_i)$$

donde $P_i = n_i/N$; n_i =altura de pico, N =sumatorias de todas las altura de picos de banda.

Para comprobar si las semejanzas observadas en muestras y entre muestras fueron diferentes a lo esperado, se aplicó el índice de similaridad de Raup y Crick SRC (Raup y Crick (1979) *J. Paleontol.* 53: 1213-1227). El SRC es la probabilidad de que una semejanza seleccionada al azar sea mayor o igual a la semejanza observada, y los valores de SRC mayores de 0.95 o menores de 0.05 significan semejanza o desemejanza, respectivamente, que no son distribuciones al azar de

la misma especie. SRC y el análisis cluster fueron calculados mediante el programa PAST (*Palaeontological statistics, version 1.82b*).

5 EJEMPLO 8. Resultados.

La evaporación de naftaleno en el vermicompost artificialmente contaminado fue de alrededor del 60% en un mes, mientras que no se detectó ninguna evaporación de naftaleno en el suelo enmendado. En el vermicompost artificialmente contaminado, los niveles de recuperación fueron del 75% y no se detectó naftaleno después de un mes de incubación (Tabla 1). En los suelos enmendados, cerca del 12% del naftaleno desaparecieron después de 30 días de incubación.

Tabla 1. Niveles de naftaleno en el vermicompost contaminado con $10 \mu\text{g g}^{-1}$ (VC10) y $100 \mu\text{g g}^{-1}$ (VC100), y en el suelo enmendado con vermicompost (S). Valores corresponden a la media de tres repeticiones \pm error estándar. Las letras indican diferencia significativa (S) o no significativa entre los valores iniciales y finales (NS) ($p < 0.05$).

	0 días	30 días	p<0.05
VC10	6,73 \pm 0,12	0,22 \pm 0,03	S
VC100	78,0 \pm 4,04	0,39 \pm 0,01	S
S	7,24 \pm 0,08	6,12 \pm 0,08	S

No se detectó expresión de la enzima naftaleno dioxigenasa (NDO) en ninguno de los tratamientos a tiempo cero y 7 días de incubación (Tabla 2). Sin embargo, la NDO se expresó después de un mes de incubación en todos los tratamientos. En el vermicompost contaminado, la expresión era mayor en los niveles inferiores la contaminación ($10 \mu\text{g g}^{-1}$), disminuyendo cuando el vermicompost fue contaminado con los niveles de $100 \mu\text{g g}^{-1}$ de naftaleno. De forma similar, en el suelo enmendado el vermicompost realizó la expresión de la enzima NDO después de solamente un mes de incubación.

Tabla 2. Expresión del gen NDO normalizada por el estándar interno (16S rRNA) en vermicompost (VC), vermicompost contaminado (VC10 y VC100) y en suelo enmendado con vermicompost (S) a 0, 7 y 30 días de incubación. NDO normalizada relativa al tiempo 0. Los valores corresponden a la media de tres repeticiones \pm error estándar

Tratamiento	NDO C _T	16S rRNA C _T	ΔC_T (NDO C _T - 16S rRNA C _T)	$\Delta\Delta C_T$ ($\Delta C_{T,Time} - \Delta C_{T,Time0}$)	NDO normalizada relativa al tiempo 0 ($2^{-\frac{\Delta\Delta C_T}{\Delta\Delta C_T}}$)
VC T ₀	32,55	22,53	10,02 ± 0,04	0,00 ± 0,04	1,00 ± 0,03
VC T ₇	32,60	22,62	9,98 ± 0,04	-0,04 ± 0,04	1,03 ± 0,03
VC T ₃₀	32,52	22,57	9,95 ± 0,02	-0,07 ± 0,02	1,05 ± 0,02
VC10 T ₀	33,30	7,67	25,62 ± 0,03	0,00 ± 0,03	1,00 ± 0,02
VC10 T ₇	33,37	7,88	25,49 ± 0,04	-0,13 ± 0,04	1,10 ± 0,03
VC10 T ₃₀	24,12	8,70	15,42 ± 0,05	-10,21 ± 0,05	1182 ± 37,1
VC100 T ₀	34,26	8,63	25,62 ± 0,01	0,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01
VC100 T ₇	34,33	8,79	25,54 ± 0,02	-0,08 ± 0,02	1,06 ± 0,02
VC100 T ₃₀	25,53	8,53	17,00 ± 0,05	-8,62 ± 0,05	394 ± 14,0
S T ₀	32,42	6,96	25,46 ± 0,03	0,00 ± 0,03	1,00 ± 0,02
S T ₇	32,40	7,02	25,38 ± 0,04	-0,08 ± 0,04	1,06 ± 0,03
S T ₃₀	25,14	7,54	17,60 ± 0,05	-7,86 ± 0,05	232 ± 8,18

La comparación de las comunidades bacterianas metabólicamente activas en los vermicomposts contaminados y en los suelos enmendados mostró perfiles marcadamente diversos a través del gel de RNA-DGGE dependiendo del tiempo de incubación (FIG. 1).

La diversidad estructural de la comunidad bacteriana fue examinada por el índice de diversidad de Shannon (H') (FIG. 2). En todos los casos, H' aumentó levemente después de 7 días de incubación y disminuyó luego a los 30 días.

Los valores de SRC encontrados comparando los vermicomposts contaminados con naftaleno se resumen en la Tabla 3. No se detectó semejanza significativa entre los diferentes vermicompost (SRC<0,05), mientras que muestras incubadas durante el mismo tiempo fueron significativamente iguales (SRC>0,95). Para el resto de los perfiles comparados de DGGE, la semejanza no fue mayor que la esperada por casualidad (0,95> SRC>0,05). La FIG. 3 muestra el dendrograma generado por los análisis cluster Raup y Crick. Una vez más fueron evidenciados tres grupos claros de muestras, las cuales compartieron tiempo de incubación.

20

Tabla 3. Similaridad (SRC) para los perfiles RNA-DGGE del vermicompost (VC) y vermicompost contaminado (VC10 y VC100) a 0, 7 y 30 días de incubación.

	VC T ₀	VC10 T ₀	VC100 T ₀	VC T ₇	VC10 T ₇	VC100 T ₇	VC T ₃₀	VC10 T ₃₀
VC10 T ₀	1							
VC100 T ₀	0.990	1						
VC T ₇	0.540	0.707	0.175					
VC10 T ₇	0.825	0.397	0.082	1				
VC100 T ₇	0.907	0.660	0.245	0.977	0.997			
VC T ₃₀	0.177	0.652	0.380	0.412	0.092	0.292		
VC10 T ₃₀	0.310	0.362	0.627	0.112	0.037	0.052	0.995	
VC100 T ₃₀	0.322	0.075	0.507	0.475	0.037	0.197	0.985	1

- 5 Por el contrario, una desemejanza significativa (SRC<0.05) se observó entre el suelo enmendado pasados 30 días de incubación y los otros dos tratamientos que incluyeron suelo contaminado. El dendrograma generado por el análisis cluster Raup y Crick muestra como dichos suelos fueron agrupados (FIG. 3).
- 10 Tabla 4. Similaridad (SRC) para los perfiles RNA-DGGE del suelo enmendado con vermicompost a 0, 7 y 30 días de incubación.

	S T0	S T7	S T30
S T0	1		
S T7	0.227	1	
S T30	0.030	0	1

- 15 El efecto de la adición de vermicompost a los suelos contaminados con PAH fue inducir los mecanismos genéticos de degradación en la comunidad bacteriana autóctona e incorporar nuevas especies bacterianas capaces de degradar el naftaleno. De hecho, el vermicompost cambió la estructura de la comunidad bacteriana metabólicamente activa en el suelo contaminado, y una selección de especies bacteriana fue evidenciada en los geles de DGGE
- 20 después de un mes de incubación. La especialización de la comunidad bacteriana pareció ocurrir durante el período de incubación de 30 días. La

diversidad bacteriana aumentó durante los primeros 7 días y disminuyó luego en el vermicompost no contaminado. El efecto de la incubación fue, por tanto, estimular la comunidad bacteriana metabólicamente activa hasta que los nutrientes disponibles fueron consumidos. La tendencia fue similar cuando el vermicompost fue contaminado artificialmente o utilizado como enmienda del suelo contaminado, revelando que el efecto del vermicompost predominó sobre el grado de contaminación del naftaleno. De hecho, el vermicompost fue el factor principal en la agrupación filogenética de los suelos enmendados, y éstos fueron agrupados con el vermicompost según el tiempo de incubación (FIG. 3).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de vermicompost de alperujo para aumentar la expresión de enzimas bacterianas que degradan hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH).
2. Uso de vermicompost de alperujo según la reivindicación 1 donde la enzima es naftaleno dioxigenasa (NDO).
- 10 3. Uso de vermicompost de alperujo según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para la descontaminación de suelos contaminados con PAH.
- 15 4. Uso de vermicompost de alperujo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el PAH es naftaleno, o cualquiera de sus derivados, o cualquiera de sus sales.
- 20 5. Uso de vermicompost de alperujo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde el vermicompost de alperujo se adiciona en un porcentaje de entre 10 y 30% del peso seco total del suelo contaminado.
- 25 6. Uso según la reivindicación 5 donde el vermicompost de alperujo se adiciona en un porcentaje de entre 15 y 25%.
- 30 7. Uso de vermicompost de alperujo según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 donde la concentración de naftaleno del suelo contaminado es menor o igual a 200 microgramos de naftaleno por gramo de suelo.
8. Uso de vermicompost de alperujo según la reivindicación 6 donde la concentración de naftaleno del suelo contaminado es menor o igual a 100 microgramos de naftaleno por gramo de suelo.

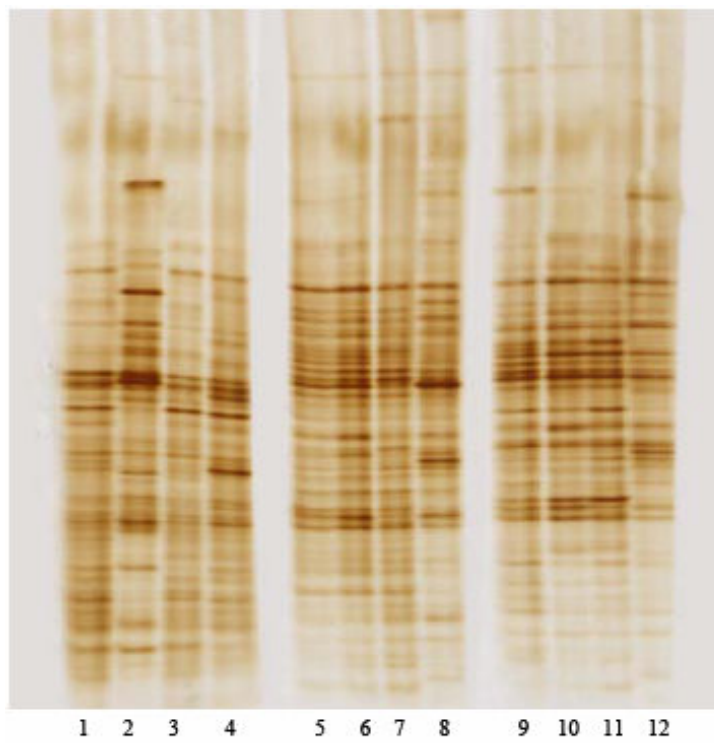


FIG. 1

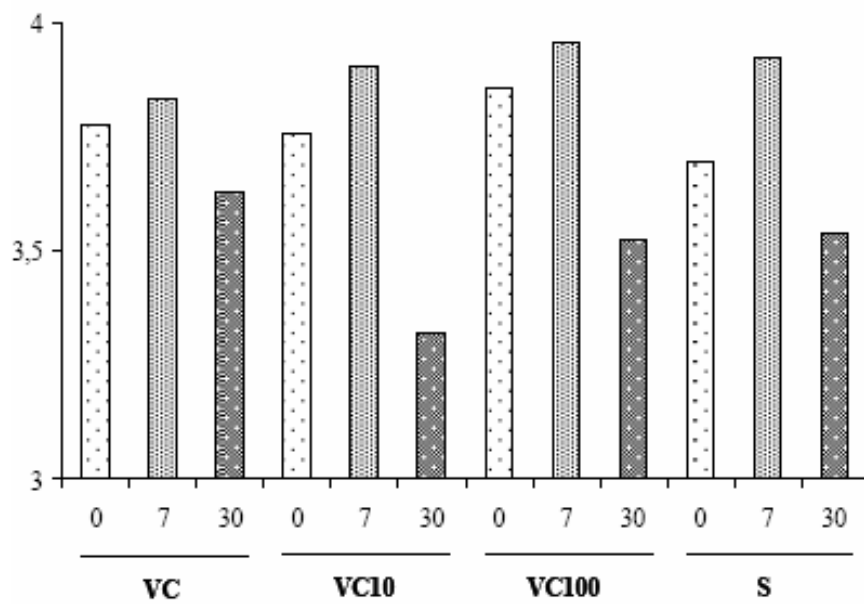


FIG. 2

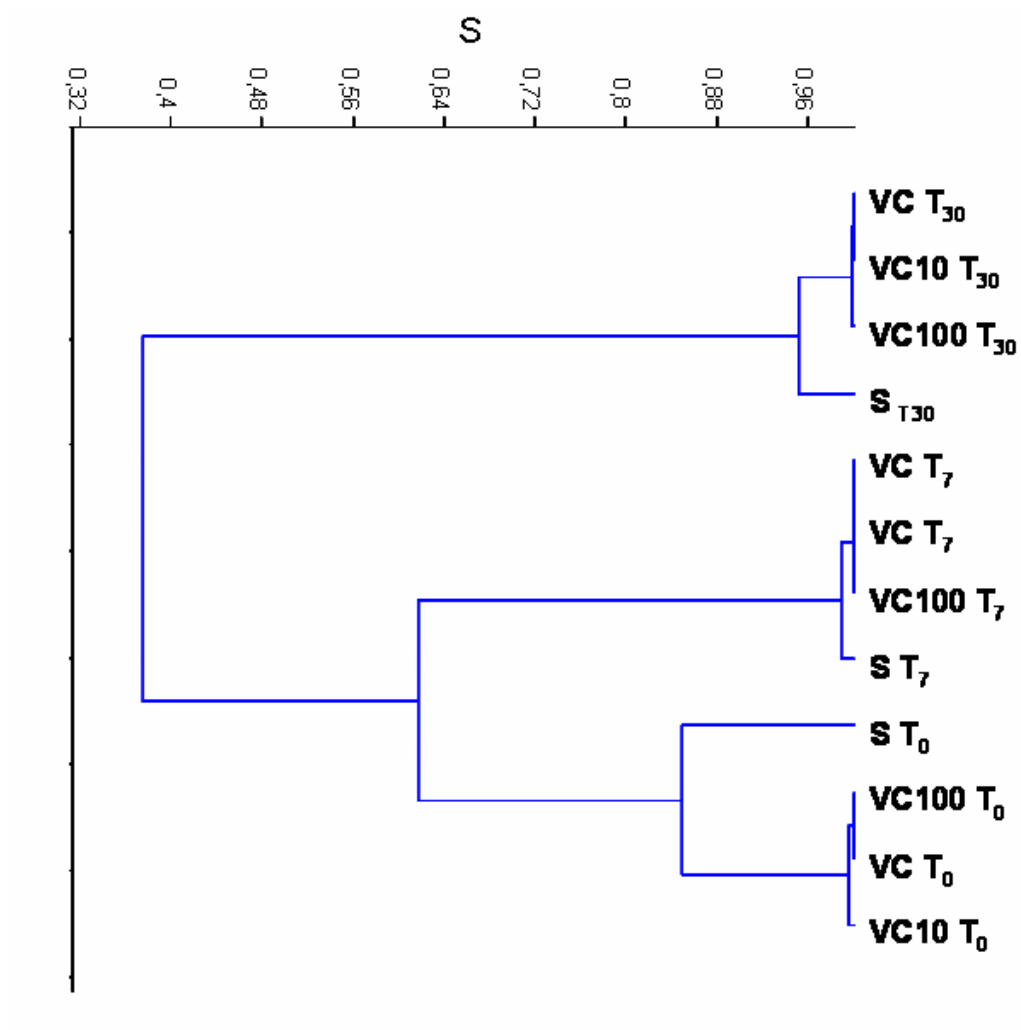


FIG. 3