

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 752**

21 Número de solicitud: 201431971

51 Int. Cl.:

A01H 15/00 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

31.12.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.06.2016

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA - ESTUDI GENERAL
(100.0%)**

**Avenida Blasco Ibáñez 13
46010 Valencia ES**

72 Inventor/es:

**GONZÁLEZ BIOSCA, Elena;
BARRENO RODRÍGUEZ, Eva;
DELGADO SANTANDER, Ricardo y
FLORES MARTÍN, Raquel**

54 Título: **Obtención de extractos liquénicos y uso de los mismos para mejorar la recuperación de microorganismos asociados a líquenes**

57 Resumen:

Obtención de extractos liquénicos y uso de los mismos para mejorar la recuperación de microorganismos asociados a líquenes.

La presente invención se refiere un extracto liquénico y el uso del mismo para mejorar la recuperación de microorganismos asociados a líquenes. Así, la invención va dirigida a un método para mejorar u optimizar el aislamiento y/o cultivo de microorganismos asociados a líquenes que comprende el procesado de talos liquénicos lavados o lavados y machacados en un medio de cultivo que comprende el extracto liquénico de una población de la especie de líquen de la que se quieren aislar los microorganismos. También se describen el método de obtención del extracto liquénico y la composición que comprende el extracto liquénico así obtenido.

ES 2 575 752 A1

DESCRIPCIÓN

Obtención de extractos liquénicos y uso de los mismos para mejorar la recuperación de microorganismos asociados a líquenes

5

La presente invención se refiere a la obtención de extractos liquénicos y al uso de los mismos para mejorar la recuperación o aislamiento de los microorganismos asociados a talos liquénicos. Así, la invención proporciona un nuevo método para la obtención de extractos liquénicos y la preparación de nuevos medios de cultivo enriquecidos con dichos extractos liquénicos que imitan los nutrientes presentes en los talos liquénicos. Por lo tanto, la presente invención pertenece al área de la Microbiología, en concreto, al campo de las técnicas microbiológicas para el aislamiento de microorganismos.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

15

El líquen es un organismo simbiótico formado por, al menos, un hongo (micobionte) y una microalga verde o una cianobacteria (ficobionte). Mientras los hongos se encargan del abastecimiento de agua y sales minerales, las microalgas o las cianobacterias proporcionan los productos fotosintéticos, como los glúcidos. Se calcula que existen aproximadamente 14.000 especies agrupadas en 600 géneros.

20

Adicionalmente, existen microorganismos asociados a las simbiosis liquénicas, tales como bacterias y virus, así como otros hongos y microalgas, cuyo aislamiento e identificación es deseable tanto desde el punto de vista ecológico o ambiental, como desde el punto de vista biotecnológico debido a la gran cantidad y diversidad de aplicaciones que pueden tener dichos microorganismos. Sin embargo, actualmente

25

existen muchas dificultades para aislar dichos microorganismos asociados a las simbiosis liquénicas así como para recuperarlos en números elevados. Esto es debido, entre otras causas, a que se usan medios de cultivo sintéticos que no reproducen las condiciones nutritivas de los talos liquénicos, se analizan mayoritariamente muestras congeladas, o no se hacen análisis microbiológicos

30

adecuados de las muestras de los talos liquénicos

Cardinale *et al.* 2006 (FEMS Microbiol. Ecol., 57: 484-495) llevaron a cabo un análisis molecular de las comunidades bacterianas heterótrofas asociadas a varias especies de líquenes mediante métodos dependientes e independientes del cultivo. En el análisis bacteriológico utilizaron once muestras de talos liquénicos congelados de ocho especies distintas recolectadas en Austria, siendo una de ellas *Pseudevernia furfuracea*, y dos medios de cultivo sintéticos para el cultivo de las bacterias

35

liquénicas. Como resultado, obtuvieron tan sólo algunas decenas de colonias bacterianas a partir de nueve de los once talos liquénicos analizados, evidenciando la dificultad para la recuperación de bacterias liquénicas, tanto de la superficie (ectoliquénicas) como del interior (endoliquénicas) de los talos liquénicos. Dichos
5 autores no aportaron datos cuantitativos sobre las bacterias cultivables aisladas en unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo (UFC/g).

Liba *et al.*, 2006 (J. Appl. Microbiol., 101: 1076-1086) también hicieron aislamientos de bacterias heterótrofas (principalmente bacterias fijadoras de nitrógeno) asociadas a
10 distintas especies de líquenes, pero las recuperaron mediante un paso previo de enriquecimiento en medio líquido. Pese al enriquecimiento aislaron pocas bacterias con dicha capacidad y al utilizar un medio de cultivo líquido tampoco dieron datos cuantitativos sobre las UFC/g.

Selbmann *et al.*, 2010 (Polar Biol., 33: 71–83) realizaron un estudio de las bacterias cultivables asociadas a líquenes antárticos con muestras de talos liquénicos conservadas mediante congelación. La congelación de los talos liquénicos, especialmente en ausencia de agentes crioprotectores, disminuye tanto la viabilidad como la cultivabilidad de los microorganismos en los medios de cultivo. Por ello, de los
20 dieciséis talos liquénicos de las distintas especies y géneros analizados, sólo consiguieron aislar bacterias en cinco de ellos y en números muy bajos en comparación con los obtenidos con la presente invención. Como en los dos estudios anteriores, los autores no aportaron datos concretos de UFC/gr.

Grube *et al.* 2009 (ISME J., 3: 1105-1115) describieron el aislamiento de densidades bacterianas considerables (10^7 - 10^4 UFC/g) en algunas especies de líquenes mediante el uso de un medio pobre en nutrientes desarrollado para el recuento de bacterias de aguas oligotróficas. Las especies liquénicas que crecen sobre suelos (terricolas) presentaron mayores niveles poblacionales bacterianos (10^7 UFC/g, ya que habitan
30 ambientes en los que las poblaciones microbianas suelen ser mucho más altas (10^8 - 10^9 células bacterianas/g) que las que crecen sobre rocas (10^4 UFC/g). Sin embargo, Grube *et al.* 2009 no emplearon medios de cultivo concretos que simulasen las condiciones nutritivas de los talos liquénicos analizados. Más recientemente, el grupo de Grube y colaboradores (Grube *et al.*, 2014 ; ISME J.; doi:10.1038/ismej.2014.138)
35 han descrito más de 800 especies bacterianas en el liquen modelo *Lobaria pulmonaria* mediante técnicas ómicas independientes del cultivo. Estos autores han propuesto

que dichas bacterias poseen la capacidad de contribuir en múltiples aspectos de la simbiosis líquénica, entre los que se incluyen distintas funciones esenciales, tales como: i) proporcionar nutrientes, especialmente nitrógeno, fósforo y azufre, ii) conferir protección frente factores de estrés biótico (como patógenos) y abiótico, iii) contribuir a la fotosíntesis mediante la provisión de vitamina B12, iv) contribuir al crecimiento de hongos y algas líquénicas mediante la provisión de hormonas, v) detoxificación de metabolitos tóxicos, y vi) degradación de las partes más viejas del talo líquénico (reciclaje de nutrientes). No obstante, para confirmar todas estas funciones potenciales, así como estudiar sus posibles aplicaciones biotecnológicas, es necesario disponer de bacterias cultivables y para ello se requiere el método de la presente invención.

Lasken & McLean, 2014 (Nat. Rev. Genet. 15: 577-584) describen un nuevo método basado en las secuencias de nueva generación o NGS (de sus iniciales en inglés *New Generation Sequences*) para la identificación de especies microbianas que todavía no han podido ser cultivadas mediante las técnicas rutinarias de cultivo microbiológico, seguida de la secuenciación parcial o completa del gen ribosómico 16S. Sin embargo, esta técnica de estudio basada sólo en el análisis de secuencias de ADN es independiente del cultivo de los microorganismos líquénicos, y aunque resulta útil para estudios de diversidad, no permite obtener cultivos puros de los mismos, lo cual es un requisito necesario tanto para la descripción de nuevos taxones microbianos como para su caracterización bioquímica, fisiológica y metabólica por sus posibles aplicaciones biotecnológicas. Especialmente complejo y difícil es el aislamiento y caracterización de microorganismos que están asociados a simbiosis mutualistas cíclicas, como es el caso de los talos líquénicos.

Por lo tanto, sigue existiendo en el estado de la técnica la necesidad de proporcionar una solución a este problema todavía no resuelto, como es la provisión de un método de cultivo que no sólo pueda emplearse en el aislamiento e identificación de microorganismos asociados a talos líquénicos cuyo cultivo no ha sido posible hasta ahora o presenta grandes dificultades con los métodos habituales, sino que además sirva para incrementar significativamente la recuperación y aislamiento de microorganismos líquénicos, tanto en cantidad como en diversidad.

35 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los inventores de la presente invención han descubierto que la adición de un extracto liquénico procedente de talos de una misma población de una especie liquénica en un medio de cultivo permite, sorprendentemente, tanto el aislamiento como el cultivo de microorganismos asociados a la población de la especie de líquen de la que se ha
5 obtenido dicho extracto liquénico con una mayor eficacia que si el aislamiento y el cultivo se llevan a cabo en un medio de cultivo estándar sin extracto liquénico.

Las ventajas de la presente invención frente a los distintos métodos que existen en el estado de la técnica para aislar microorganismos asociados a una población de una
10 especie de líquen incluyen:

- Permite incrementar el número de microorganismos recuperados tras el cultivo, tanto oligotrofos como copiotrofos y tanto en cantidad como en diversidad, gracias a que se emplea un medio de cultivo que simula las condiciones nutritivas existentes en el talo
15 liquénico a partir del que se quieren aislar los microorganismos de interés.

- Permite incrementar la recuperación de microorganismos asociados a líquenes, ya que los análisis microbiológicos se realizan a partir de muestras de talos liquénicos frescos.

- Permite incrementar el número de microorganismos recuperados tras el cultivo, tanto
20 ecto- como endoliquénicos, gracias a un lavado extensivo de talo/s liquénico/s que permite, a su vez, la eliminación de la etapa de desinfección de dichos talos liquénicos que afecta negativamente a la recuperación de dichos microorganismos.

En base a este descubrimiento, se han desarrollado una serie de aspectos inventivos
25 que serán descritos en detalle a continuación.

Método de obtención del extracto liquénico de la invención

Tal como se ha explicado previamente, la presente invención se basa en el empleo de
30 un extracto procedente de talos de una misma población de una especie liquénica en un medio de cultivo para aislar o cultivar con mayor eficacia los microorganismos asociados a dicha especie liquénica. Por lo tanto, la puesta en práctica de la invención comprende obtener dicho extracto liquénico.

Así, en un aspecto, la invención se relaciona con un método para obtener un extracto liquénico, de aquí en adelante “método para obtener el extracto liquénico de la invención”, que comprende:

- (a) recolectar al menos un talo liquénico de una especie liquénica de interés,
- 5 (b) lavar y proceder a la disrupción del talo liquénico con una solución isotónica estéril, y
- (c) esterilizar por filtración el producto obtenido tras llevar a cabo la etapa b).

Las distintas etapas que comprenden este método permiten obtener un extracto liquénico que conserva, de forma inalterada, todos los componentes y nutrientes naturales que están presentes en la especie liquénica, lo que le diferencia de otros métodos descritos en el estado de la técnica.

Así, en una primera etapa, el método para obtener el extracto liquénico de la invención comprende recolectar al menos un talo liquénico de una especie liquénica de interés.

En la presente descripción, se entiende por “especie liquénica” o “liquen” al organismo (talo, holobionte) que surge de la simbiosis entre, al menos, un hongo heterótrofo (micobionte) y uno o más organismos fotosintéticos que pueden ser microalgas verdes o cianobacterias (fotobiontes). La base de la simbiosis mutualistas es la integración morfológica, metabólica y genética entre los simbiosistas (talos), donde el hongo adquiere los carbohidratos necesarios para su metabolismo a partir de los fotobiontes, mientras que el hongo proporciona agua, elementos minerales y moléculas señal (p. ej. NO) para la protección de las algas en el agresivo medio aéreo. La nomenclatura de las especies liquénicas se hace mediante el nombre del hongo simbiote.

En la presente invención se entiende por “talo liquénico” o “talo” al cuerpo vegetativo del liquen, que está compuesto por al menos un hongo (micobionte) y uno o varios fotobiontes (microalgas y/o cianobacterias) y otros microorganismos asociados (bacterias, virus y otros hongos o algas u otros organismos), no diferenciado en un eje caulinar con hojas y en raíces, y que no presenta verdaderos tejidos.

Como entiende el experto en la materia, la especie liquénica recolectada puede estar formando parte de una población de una especie liquénica. Así, en una realización particular de la etapa (a), los talos liquénicos recolectados pertenecen a la misma población de la especie liquénica. En la presente invención, se entiende por

“población” o “población biológica” al conjunto de organismos o individuos de la misma especie que coexisten en un mismo espacio y tiempo, y que comparten ciertas propiedades biológicas, las cuales producen una alta cohesión reproductiva y ecológica del grupo. La cohesión reproductiva implica el intercambio de material genético entre los individuos. La cohesión ecológica se refiere a la presencia de interacciones entre ellos, resultantes de poseer requerimientos similares para la supervivencia y la reproducción, al ocupar un espacio generalmente heterogéneo en cuanto a la disponibilidad de recursos.

5

10

Métodos para la recolección de, al menos, un talo liquénico de la especie liquénica de interés son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y son práctica de rutina para el experto en la materia. En la recolección pueden emplearse bisturís, navajas, cuchillos, tijeras, guantes, pinzas, etc. Y, una vez recogido, se puede almacenar en bolsas, placas Petri o tubos de plástico para su traslado al laboratorio.

15

El procesado de la especie liquénica puede llevarse a cabo a partir de talos frescos o congelados. Así, en una realización particular, el talo liquénico es preferentemente fresco y, en su defecto, puede estar congelado. En el caso de emplear talos frescos, estos pueden procesarse directamente tras su recogida o pueden mantenerse refrigerados (por ejemplo, alrededor de los 4°C) hasta que sean procesados, dentro de un plazo de unos pocos días. El término “fresco” incluye tanto talos recién recolectados como talos refrigerados. Alternativamente, tras la recolección del talo éste puede ser congelado en caso de que el almacenamiento hasta su procesado vaya a ser más prolongado. En este caso, el experto en la materia entiende que antes de emplear el talo congelado para obtener el extracto liquénico éste tiene que ser descongelado. Técnicas para congelar y descongelar talos liquénicos son ampliamente conocidas en el estado de la técnica y son práctica de rutina para el experto en la materia.

20

25

30

Tras la recolección del talo liquénico, el método comprende el lavado y la posterior disrupción del talo liquénico con una solución isotónica estéril [etapa b)].

35

Tanto el lavado como la disrupción del talo se llevan a cabo con una solución isotónica estéril. Cualquier solución isotónica estéril puede usarse en el lavado y disrupción del talo liquénico. En la presente invención se entiende por “solución isotónica” a la composición que comprende varias sales disueltas en agua con la finalidad de crear

una solución salina con una concentración de sales equivalente al tejido biológico. En una realización particular, dicha solución isotónica estéril es la solución Ringer. La solución Ringer típica comprende, en general, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio y bicarbonato sódico (este último usado para equilibrar el pH). Por ejemplo, una típica solución isotónica estándar comprende 5 g de NaCl, 0,42 g de KCl, 0,25 g de CaCl₂ y 0,2 g de bicarbonato sódico disuelto en un litro de agua destilada.

Adicionalmente, la solución isotónica estéril empleada en el presente método puede estar suplementada con un agente surfactante. En la presente invención, se entiende por “agente surfactante” o “tensioactivo” o “detergente” a la sustancia que influye por medio de la tensión superficial en la superficie de contacto entre dos fases. La clasificación se fundamenta en el poder de disociación del tensioactivo en presencia de un electrolito y de sus propiedades fisicoquímicas. Los agentes surfactantes pueden ser iónicos o no-iónicos; y dentro de los iónicos según la carga que posea la parte que presenta la actividad de superficie serán: aniónicos, catiónicos y anfóteros. Cualquier agente surfactante puede emplearse en el contexto de la presente invención. No obstante, en una realización particular, el agente surfactante es polisorbato 20 o monooleato de polioxietileno sorbitan, comúnmente conocido como Tween 20®.

Para la obtención del extracto liquénico primero se realiza un lavado breve, con agua destilada estéril, del talo liquénico recolectado para eliminar las impurezas más gruesas (polvo, tierra, etc). Después el talo se somete a un lavado más prolongado con una solución isotónica estéril, por ejemplo, durante 30 minutos a 200 r.p.m a temperatura ambiente. Tras dicho lavado del talo, se procede a la disrupción del mismo. En la presente invención se entiende por “disrupción” a la rotura del talo liquénico en fragmentos más pequeños. La disrupción puede llevarse a cabo mediante dilacerado, machacado, triturado, etc. No obstante, en una realización particular, la disrupción del talo liquénico se lleva a cabo mediante triturado.

En la presente invención se entiende por “dilacerado” a la técnica que comprende fragmentar el talo liquénico en trozos más pequeños. El dilacerado de los talos liquénicos puede hacerse, por ejemplo, mediante el empleo de cuchillas, bisturís, etc.

En la presente invención se entiende por “machacado” a la técnica que comprende golpear algo para deformarlo, aplastarlo o reducirlo a fragmentos pequeños sin llegar

a triturarlo. El machacado de los talos liquénicos se puede hacer, por ejemplo, mediante el empleo de un mortero o con una maza en una bolsa de plástico.

5 En la presente invención se entiende por “triturado” a la técnica que comprende moler o desmenuzar el talo liquénico sin llegar a reducirlo enteramente a polvo. El triturado del talo liquénico puede hacerse, por ejemplo, mediante una máquina trituradora.

10 Una vez llevada a cabo la etapa (b) se obtiene un producto que comprende el talo liquénico lavado y fragmentado en la solución isotónica, junto con los compuestos y sustancias bioactivos/as liberadas y disueltas en dicha solución. Dicho extracto liquénico será sometido a una esterilización por filtración [etapa c) del método para obtener el extracto liquénico de la invención].

15 El empleo en el presente método de un proceso físico de filtración sin uso de calor ni de compuestos químicos (por ejemplo, disolventes), permite que no se alteren las propiedades de las sustancias liquénicas que se han extraído en la etapa b) del método. Obteniendo así un extracto liquénico que conserva de forma intacta todos los compuestos y sustancias bioactivos/as presentes en la especie liquénica en su estado fresco. Por este motivo, el uso del extracto liquénico obtenido mediante el presente
20 método es óptimo para cultivar y/o aislar microorganismos asociados a una población de una especie liquénica de interés. Este aspecto se explicará en detalle más adelante en la presente descripción.

25 La esterilización por filtración se logra por el paso de un líquido o un gas a través de un material capaz de retener los microorganismos presentes. Existen varios tipos de filtros y cualquiera de ellos puede usarse en la presente invención. Ejemplos de filtros incluyen, sin limitar a, filtros de profundidad y los filtros de superficie o filtros de membrana.

30 Los filtros de profundidad están elaborados por un material fibroso (papel, asbesto o fibra de vidrio) dispuesto al azar, de manera que dentro de la estructura del filtro se crean vías tortuosas donde pueden quedar retenidos la mayoría de los contaminantes presentes. Dadas sus características, los filtros de profundidad se usan principalmente como prefiltros, ya que permiten eliminar las partículas grandes pero no la eliminación
35 total de los microorganismos. Así, en una realización particular, la esterilización por filtración comprende el empleo de un pre-filtro.

Los filtros de superficie son filtros elaborados generalmente a partir de acetato de celulosa o nitrato de celulosa y contienen poros de tamaño uniforme. Al conocer el tamaño de poro que presentan, se pueden seleccionar filtros capaces de retener los microorganismos de la solución. En una realización particular, el tamaño de poro del filtro es de entre 0,22 y 0,45 μm . Para una filtración esterilizante óptima se pueden usar combinaciones de un filtro de profundidad (pre-filtro), con un tamaño de poro de, por ejemplo, 0,8 μm , con un filtro de superficie que tenga un tamaño de poro, por ejemplo, de 0,22 μm . En otra realización todavía más particular, la esterilización por filtración de la etapa c) se lleva a cabo con un prefiltro (con tamaño de poro de 0,8 μm) y un filtro, en donde el tamaño de poro del filtro es de entre 0,22 y 0,45 μm .

Cualquier especie líquénica puede emplearse para obtener el extracto líquénico de la invención. El talo líquénico está constituido por hongos liquenizantes junto con los fotobiontes. Ejemplos de hongos liquenizantes que conforman una especie líquénica incluyen, sin limitar a, los Lecanoromycetes que contienen 14.000 especies conocidas de las cuales el 95 % están formando líquenes (ascolíquenes), estableciendo simbiosis mutualistas con microalgas verdes (clorolíquenes) o cianobacterias (cianolíquenes); solo unos pocos establecen simbiosis interna con algas y cianobacterias al mismo tiempo (cefalodios). En el trabajo de Miadlikowska *et al.*, 2014 (Mol Phylogenet Evol 79: 132–168) aparecen relacionados los géneros de los hongos de esta clase que liquenizan, en resumen 1139 taxones, 317 géneros, 66 familias, 17 órdenes y 5 subclases: Acarosporomycetidae, Lecanoromycetidae, Ostropomycetidae, Umbilicariomycetidae y “Candelariomycetidae”. Solo un pequeño porcentaje de los Basidiomycetes son capaces de liquenizar (basiolíquenes) y los géneros más comunes (*Omphalina*, *Dyctionema*, etc.) aparecen relacionados en las publicaciones de Lutzoni, 1997 (Syst Biol. 46 (3): 373-406) y de Hodkinson *et al.*, 2014 (Fungal Divers. 64 (1): 165-179).

Algunos ejemplos más pormenorizados de especies líquénicas pueden ser *Acarospora spp.*, *Cladonia spp.*, *Evernia spp.*, *Flavoparmelia spp.*, *Melanelia spp.*, *Pamotrema spp.*, *Platismatia spp.*, *Pseudevernia spp.*, *Ramalina spp.*, *Tephromela spp.*, *Usnea spp.* o *Xanthoparmelia spp.*, No obstante, en una realización particular, la especie líquénica se selecciona del grupo que consiste en *Pamotrema spp.*, *Pseudevernia spp.* y *Ramalina spp.*

35

Ejemplos de *Ramalina* spp. incluyen, pero no se limitan a, *R. asahinae*, *R. bourgaeana*, *R. canariensis*, *R. farinacea*, *R. fastigiata*, *R. fraxinea*, *R. implectens*, *R. subgeniculata*,

- 5 Ejemplos de *Parmotrema* spp. incluyen, pero no se limitan a, *P. arnoldii*, *P. austrosinense*, *P. crinitum*, *P. hypoleucinum*, *P. perlatum*, *P. pseudotinctorum*.

- Ejemplos de *Pseudevernia* spp. incluyen, pero no se limitan a, *P. ceratea*, *P. cirrhata*, *P. consocians*, *P. furfuracea*, *P. furfuracea* var. *ceratea*, *P. furfuracea* var. *furfuracea*,
10 *P. isidiophora*, *P. kamerunensis*, *P. mauritiana*.

Ejemplos de *Evernia* spp. incluyen, pero no se limitan a, *E. divaricata*, *E. illyrica*, *E. furfuracea*, *E. mesomorpha*, *E. prunastri*

- 15 Ejemplos de *Parmelia* spp. incluyen, pero no se limitan a, *P. barrenoae*, *P. saxatilis*, *P. serrana*, *P. sulcata*.

- Ejemplos de *Usnea* spp. incluyen, sin limitar a, *U. barbata*, *U. dasypoga*, *U. filipendula*, *U. florida*, *U. hirta*, *U. rubicunda*, *U. rubiginosa*, *U. scabrida*, *U. sphacelata*, *U. strigosa*,
20 *U. subfloridana*.

- Ejemplos de *Cetraria* spp. -en sentido amplio- y *Karnefeltia* incluyen, pero no se limitan a, *C. aculeata*, *C. crespoae*, *C. islandica*, *C. ericetorum*, y *C. iberica* (*Karnefeltia merrillii*).

25

Extracto liquénico de la invención y sus usos

- En otro aspecto, la invención se relaciona con un extracto liquénico, de aquí en adelante “extracto liquénico de la invención”, obtenido mediante el método de
30 obtención del extracto liquénico descrito anteriormente.

- El extracto liquénico de la invención se caracteriza porque comprende de forma intacta todos los compuestos y sustancias bioactivos/as presentes en la especie liquénica en su estado fresco o natural. Esta característica es consecuencia del
35 método de obtención empleado pues, tal como se ha explicado, en el método de obtención se emplea un proceso físico de esterilización (esterilización por filtración)

que no altera las propiedades físicas, químicas o biológicas de los compuestos y sustancias presentes en el líquen.

5 Como entiende el experto en la materia, el extracto líquénico de la invención puede estar formando parte de una composición que además de comprender dicho extracto líquénico, comprende otros compuestos o sustancias que pueden potenciar o facilitar el crecimiento o aislamiento de los microorganismos. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición, de aquí en adelante “composición de la invención”, que comprende el extracto líquénico de la invención. Ejemplos de otros compuestos o
10 sustancias que pueden estar presentes en la composición de la invención incluyen, sin limitar a, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, vitaminas, antifúngicos o antibacterianos según interese, etc.

15 En el contexto de la presente invención, la composición puede ser líquida o sólida. En una realización particular, la composición es un medio de cultivo.

La presencia en el extracto líquénico de la invención de los compuestos y sustancias bioactivos/as presentes en la especie líquénica en su estado fresco o natural permite que, si este extracto líquénico es añadido a un medio de cultivo, se puedan aislar y
20 cultivar microorganismos asociados a dicha especie líquénica con mayor eficacia que si el medio de cultivo no comprende el extracto líquénico.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del extracto líquénico de la invención y/o de la composición de la invención, para aislar y/o cultivar
25 los microorganismos asociados a una especie líquénica de interés, en donde el extracto líquénico es obtenido a partir de, al menos, un talo líquénico de la especie líquénica de la que se quiere aislar el/los microorganismo/s. En una realización particular, el cultivo se lleva a cabo en un medio mínimo suplementado con, al menos, un extracto líquénico obtenido a partir de talos de la misma población que el/los talo/s
30 de la especie líquénica de la que se quiere aislar el/los microorganismo/s. El término “población” ha sido definido previamente.

En una realización particular, el microorganismo asociado a la especie líquénica se selecciona del grupo que consiste en bacterias, algas, hongos filamentosos, levaduras
35 y virus de los microorganismos líquénicos anteriores.

Ejemplos de hongos no liquenizantes asociados a líquenes incluyen, sin limitar a, a miembros de filo *Ascomycota* (Bates *et al.*, 2012. *The Lichenologist* 44(1): 137–146, doi:10.1017/S0024282911000648. Los hongos liquenizantes se han mencionado previamente.

5

Ejemplos de algas incluyen, sin limitar a, las microalgas verdes. Las microalgas verdes que suelen asociarse con los Ascolíquenes y Basidiolíquenes son, dentro de las Chlorophyta, de las clases *Trebouxiophyceae* y *Ulvophyceae*, (por ejemplo: *Trebouxia*, *Asterochloris*, *Coccomyxa*, *Dictyochloropsis s.l.* *Chlorella*, *Elliptochloris*, *Phycopeltis*, *Trentepohlia*, etc.) o cianobacterias de los órdenes Chroococcales, Nostocales, y Stigonematales (por ejemplo: *Nostoc*, *Rhizonema*, *Scytonema*, *Stigonema*, etc.) [Friedl T. & Büdel B. 2008. Photobionts. En: Nash T. H. (Ed.), *Lichen biology*, Segunda edición. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 9-26].

10

15

Ejemplos de virus de microorganismos liquénicos incluyen, sin limitar a, Ivy (hiedra) latent Cytorhabdovirus y Apple (manzano) mosaic virus (ApMV). Ambos son tipos de virus de ARN de doble cadena encontrados en algas liquénicas del género *Trebouxia* (Petrzik, K. *et al.*, 2014. *Eur. J. Plant Pathol.*, 138(3): 549-559].

20

Ejemplos de bacterias incluyen, sin limitar a, las pertenecientes entre otros a los Ordenes *Actinomycetales*, *Bacillales*, *Burkholderiales*, *Caulobacterales*, *Rhizobiales*, *Rhodospirillales*, *Pseudomonadales*, *Sphingomonadales* y *Xanthomonadales* (Cardinale *et al.*, 2006; Cardinale *et al.*, 2008 (FEMS Microbiol. Ecol. 66:63–71) Liba *et al.*, 2006 ; Grube & Berg 2009 (Fungal Biology Reviews 23: 72–85.); Grube *et al.*, 2009, 2014; Hodkinson & Lutzoni 2009 (Symbiosis, 49: 163–180.); Selbman *et al.*, 2010 ; Bates *et al.*, 2011 (Appl. Environ. Microbiol. 77(4) : 1309-1314 ; Lasken & McLean, 2014).

25

30

En otra realización particular, la especie liquénica de interés se selecciona del grupo que consiste en *Pamotrema* spp., *Pseudevernia* spp. y *Ramalina* spp. Ejemplos de otros géneros y especies liquénicas que pueden emplearse en la presente invención han sido descritos previamente en el método de obtención del extracto liquénico de la invención.

35

Método para aislar microorganismos asociados a una especie liquénica de interés

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para aislar microorganismos asociados a una especie líquénica de interés, de aquí en adelante “método de aislamiento de la invención”, que comprende

- 5 (a) recolectar al menos un talo líquénico de la especie líquénica de la que se quieren aislar los microorganismos, en condiciones de asepsia,
- (b) Lavar de forma extensiva el talo líquénico recolectado en la etapa (a), con solución isotónica.
- (c) Llevar a cabo la disrupción del talo líquénico lavado en la etapa (b), y
- 10 (d) cultivar, en un medio de cultivo mínimo suplementado con, al menos, el extracto líquénico de la invención:
- (i) el producto obtenido de la disrupción del talo líquénico de la etapa (c), y/o
 - (ii) la solución de lavado recuperada tras el lavado extensivo de la etapa (b) en donde,
- en el caso de que se cultiven (i) y (ii), se cultivan de forma independiente, y
 - 15 - el extracto líquénico se obtiene a partir del especie líquénica de interés de la que se quieren aislar los microorganismos.

En una primera etapa, el método de aislamiento de la invención comprende recolectar al menos un talo líquénico de la especie líquénica de la que se quieren aislar los

20 microorganismos, en condiciones de asepsia.

La recolección del talo de la especie líquénica de interés tiene que hacerse en condiciones asépticas, es decir, en las condiciones de recogida adecuadas para que los líquenes no resulten contaminados con otros microorganismos ajenos al propio

25 líquen. Como entiende el experto en la materia, pueden recogerse uno o más talos de la misma especie líquénica. Los líquenes pueden crecer en una gran variedad de sustratos, tales como la corteza de los árboles, la superficie de las rocas, el suelo, materiales artificiales (vidrio, uralita, tejas, cemento, etc.), etc., por lo que para obtener los talos líquénicos primero hay que recogerlos de su entorno. Para ello, pueden

30 emplearse bisturís, navajas, cuchillos, tijeras, guantes, pinzas, etc. y una vez recogidos los talos, se pueden almacenar en bolsas, placas Petri o tubos de plástico para su traslado al laboratorio. Con la finalidad de conseguir dichas condiciones asépticas de recogida, todo el material anteriormente mencionado puede ser esterilizado o descontaminado antes de ser usado. Una vez recogido el/los talo/s

35 líquénico/s de su entorno, estos son llevados al laboratorio para ser procesados.

Una característica esencial del método de aislamiento de la invención es que el extracto liquénico empleado en el medio de cultivo tiene que haberse obtenido de la misma especie liquénica de la que se quiere aislar el/los microorganismo/s. Por ejemplo, si el objetivo es aislar los microorganismos asociados a la especie liquénica *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf, el extracto liquénico con el que se suplementará el medio mínimo se obtendrá a partir del talo/s de una especie de *P. furfuracea*. Otro ejemplo puede ser *Ramalia farinacea* (L.) Ach. o *Parmotrema* spp., en dichos casos los medios de cultivo se suplementarían con extractos liquénicos de los respectivos líquenes.

10

En una realización particular de la etapa (a), los talos liquénicos recolectados pertenecen a la misma población de la especie liquénica. El término población ha sido descrito previamente. Así, en el aislamiento de microorganismos asociados a líquenes, se puede añadir al medio mínimo un extracto liquénico obtenido a partir de talos de líquenes de la misma población que los líquenes de los que se quieren aislar y cultivar los microorganismos.

15

En una segunda etapa, el método de aislamiento de la invención comprende lavar de forma extensiva con una solución isotónica el talo liquénico recolectado en la etapa (a). En la presente invención se entiende por "lavar de forma extensiva" o "lavado extensivo" al lavado cuya duración abarca desde los 60 hasta los 90 minutos. En una realización particular, el lavado extensivo del talo liquénico comprende el lavado durante al menos, aproximadamente 60 minutos, preferiblemente, aproximadamente 90 minutos. Cualquier solución isotónica estéril puede emplearse en el lavado del talo liquénico recolectado en la etapa a). No obstante, en una realización particular, el lavado se lleva a cabo con una solución isotónica estéril que comprende un agente surfactante. En otra realización particular, la solución isotónica estéril es solución Ringer. En otra realización todavía más particular el agente surfactante es Tween 20. Tanto definiciones como ejemplos de soluciones isotónicas y agentes surfactantes han sido descritos previamente en la presente descripción y son aplicables al presente aspecto inventivo.

20

25

30

Opcionalmente, tras el lavado extensivo del talo liquénico con solución isotónica, y la separación del mismo de la solución de lavado obtenida en la etapa (b) se puede proceder a eliminar del talo posibles restos del lavado con agua destilada estéril mediante, por ejemplo, un enjuagado.

35

A continuación, se lleva a cabo la disrupción del talo liquénico. El término “disrupción” ha sido definido previamente en la presente descripción. La disrupción puede llevarse a cabo mediante machacado, dilacerado, triturado, etc. No obstante, en una realización particular, la disrupción del talo liquénico se lleva a cabo mediante machacado en un tampón de maceración antioxidante estéril (AMB de sus iniciales en inglés *Antioxidant Maceration Buffer*) y en condiciones de asepsia. El efecto técnico asociado a este procedimiento de machacado es la obtención de mayor cantidad de microorganismos aislados que mediante el empleo de las otras técnicas de disrupción (triturado/dilacerado). Asimismo, el empleo de tampón de maceración antioxidante previene las posibles reacciones de oxidación que pudieran ocurrir durante el procesado del material y que pudieran inhibir el crecimiento microbiano.

Una vez llevadas a cabo las etapas (a) a (c) del método de aislamiento de la invención se lleva a cabo la etapa (d) que comprende cultivar, en un medio de cultivo mínimo suplementado con, al menos, el extracto liquénico de la invención:

- (i) el producto obtenido de la disrupción del talo liquénico de la etapa (c), y/o
 - (ii) la solución de lavado recuperada tras el lavado extensivo de la etapa (b)
- en donde,
- en el caso de que se cultiven (i) y (ii), se cultivan de forma independiente, y
 - el extracto liquénico se obtiene a partir del especie liquénica de interés de la que se quieren aislar los microorganismos.

La puesta en práctica del método de la invención requiere que el medio mínimo esté suplementado con un extracto liquénico obtenido a partir de talos de la especie liquénica de interés, es decir, a partir de talos del liquen del que se quieren aislar los microorganismos. Por ejemplo, tal como se ha explicado previamente para aspectos inventivos anteriores, si el objetivo es aislar los microorganismos asociados a la especie liquénica *P. furfuracea*, el extracto liquénico con el que se suplementará el medio mínimo se obtendrá a partir de talo/s de dicha especie. Otro ejemplo puede ser *R. farinacea* o *Parmotrema* spp., en dichos casos los medios de cultivo se suplementarían con extractos liquénicos de las respectivas especies liquénicas. En una realización particular, la etapa de cultivo (d) se lleva a cabo en un medio mínimo suplementado con, al menos, un extracto liquénico obtenido a partir de talos de la misma población que el/los talo/s de la especie liquénica recolectado según la etapa (a). El término población ya ha sido definido previamente.

En la presente invención se entiende por “medio mínimo” a cualquier medio de base mineral que comprende los compuestos básicos para permitir el crecimiento de los microorganismos. Ejemplos de medios mínimos incluyen, sin limitar a, medio mínimo
5 AB (Chilton *et al.*, 1974, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71:3672-3676): K_2HPO_4 , 3 g; NaH_2PO_4 1 g; NH_4Cl 1 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,3 g; KCl 0,15 g; $CaCl_2$ 0,01 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2,5 mg, por 1 L de agua destilada; glucosa 0,5%), medio M9, medio MBMA, medio M63 y medio MA. Más detalles pueden encontrarse en Santander *et al.*, 2014 (FEMS Microbiol. Ecol. 90(3): 895-907, doi: 10.1111/1574-6941.12444). Para llevar a cabo el
10 método de aislamiento de la invención no es necesario que el medio mínimo lleve una fuente de carbono, pues basta con la presencia del extracto liquénico de la invención. No obstante, en una realización particular, el medio mínimo comprende una o más fuentes de carbono que, en otra realización todavía más particular, dicha fuente de carbono es glucosa y/o manitol al 0,5 %.

15

Asimismo, dependiendo del tipo de microorganismo que se quiera aislar (bacterias, algas, hongos filamentosos o unicelulares (levaduras) y/o virus), el medio de cultivo mínimo puede estar suplementado con otros componentes. Por ejemplo, si el microorganismo que se quiere aislar mediante el método de aislamiento de la
20 invención es una bacteria liquénica (es decir, asociada a un líquen), el medio de cultivo tendrá que ir suplementado con otros compuestos que eviten el crecimiento de otros microorganismos que puedan interferir con el crecimiento de la bacteria. Así, el medio mínimo de cultivo puede ir suplementado con, al menos, un antifúngico. En la presente invención se entiende por “antifúngico” a toda sustancia que tiene la
25 capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte. Ejemplos de antifúngicos incluyen, sin limitar a, polienos (e.g. anfotericina B), pirimidinas (e.g. fluorocitosina), imidazoles (e.g. miconazol), triazoles (e.g. fluconazol), cardinas y cicloheximida. En una realización particular, el cultivo del paso (d) se lleva a cabo en un medio de cultivo mínimo suplementado al menos con el
30 extracto liquénico y con al menos un antifúngico, preferiblemente, natamicina.

Por otro lado, si el microorganismo que se quiere aislar del talo liquénico es un virus asociado a un microorganismo liquénico (bacterias, algas, hongos filamentosos o levaduras), entonces el medio de cultivo estará suplementado con un césped del
35 microorganismo liquénico para que el virus pueda crecer. Así, en otra realización particular, el cultivo del paso (d) se lleva a cabo en un medio de cultivo mínimo

suplementado al menos con el extracto liquénico y con el microorganismo liquénico de interés.

5 En una realización particular, el microorganismo asociado a la especie liquénica de interés se selecciona del grupo que consiste en bacterias, algas, hongos filamentosos, levaduras y virus de los microorganismos liquénicos antes mencionados. Ejemplos de hongos y algas asociados a talos liquénicos ya han sido descritos en párrafos anteriores.

10 Ejemplos de especies liquénicas que pueden emplearse para aislar microorganismos asociados a ellas han sido mencionados en aspectos inventivos anteriores. En una realización particular, el talo liquénico de la especie liquénica se selecciona del grupo que consiste en *Pamotrema* spp., *Pseudevernia* spp. y *Ramalina* spp.

15 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. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y
20 no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 **Figura 1. Especie de liquen fruticuloso, *Pseudevernia furfuracea*, en corteza de *Pinus sylvestris*.** Barra de escala = 1 centímetro.

Figura 2. Mejora de la recuperación de bacterias asociadas a *Pseudevernia furfuracea* con un protocolo de aislamiento modificado y medio de cultivo mínimo. Se muestra la media de los recuentos de bacterias cultivables (UFC/g) ectoliquénicas (barras blancas) y endoliquénicas de *P. furfuracea* (barras grises) en los medios de cultivo KB, BBM y MMS después de 7 días de incubación a 25°C. Las muestras de talos liquénicos se tomaron en la primavera de 2012 de varios ejemplares de *Pinus sylvestris* de la Sierra de Javalambre (Teruel, España). Cada barra representa el valor medio de los recuentos en cada medio de cultivo de tres talos
30 diferentes analizados en experimentos independientes. La desviación estándar de los datos se indica mediante líneas verticales.
35

Figura 3. Comparación del crecimiento de cepas bacterianas de *Pseudevernia furfuracea* en medio mínimo enriquecido con líquen versus sin líquen con o sin fuentes de carbono. Imágenes representativas que muestran el crecimiento de cepas bacterianas seleccionadas aisladas de *P. furfuracea* en el medio AB suplementado o no con glucosa (G), manitol (M), o ambos (GM) y/o extracto de líquen (L) después de 96 horas de incubación a 25°C. Algunos detalles del crecimiento diferencial de algunas cepas bacterianas se indican con asteriscos negros. Todas las cepas ensayadas crecieron en el medio de cultivo control KB (datos no mostrados).

Figura 4. Efecto de los medios de cultivo enriquecidos con extracto de líquen y el tiempo de incubación sobre el crecimiento de cepas bacterianas de *Pseudevernia furfuracea*. El gráfico de columnas apiladas de crecimiento de 139 cepas bacterianas de *P. furfuracea* en el medio mínimo AB suplementado o no con fuentes de carbono (glucosa, G; manitol, M; o glucosa y manitol, GM) y/o extracto de líquen (L) después de 24 horas (a) y 96 horas (b) de incubación a 25°C. El crecimiento de bacterias en cada medio ensayado se comparó con el control en el medio KB, que se fijó arbitrariamente en un crecimiento del 100%. Los resultados del crecimiento se agruparon en tres categorías (no crecimiento, crecimiento en el punto de inoculación y crecimiento incrementado). Los datos mostrados proceden de un experimento realizado por duplicado. Las diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los dos medios de cultivo se indican mediante asteriscos situados arriba de las columnas apiladas. También se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre 24 horas (a) y 96 horas (b) de incubación.

Figura 5. Efecto de los medios enriquecidos con líquen en la recuperación de bacterias asociadas a *Pseudevernia furfuracea* de una muestra de talo. Se muestra la media de los recuentos de bacterias cultivables (UFC/g) ectoliquénicas (a) y endoliquénicas de *P. furfuracea* (b) en los medios de cultivo AB, ABG y ABGM enriquecidos o no con extracto de líquen y en el medio KB, después de 3 días de incubación a 25°C. La muestra de talo se tomó en la primavera de 2012 de un ejemplar de *Pinus sylvestris* de la Sierra de Javalambre (Teruel, España). Cada barra representa el valor medio de los recuentos realizados por duplicado en cada medio de cultivo de la misma muestra de talo. La desviación estándar de los datos se indica mediante líneas verticales. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes arriba de las barras de error (* $p < 0,005$; ** $p < 0,01$).

Figura 6. Efecto de los medios enriquecidos con líquen y el tiempo de incubación en la recuperación de bacterias asociadas a *Pseudevernia furfuracea* de muestras compuestas de distintos talos. Se muestra la media de los recuentos de bacterias cultivables (UFC/g) ectoliquénicas (Figuras 6a, 6c) y endoliquénicas de *P. furfuracea* (b, d) de muestras compuestas por cinco talos distintos, en los medios de cultivo enriquecidos con líquen con alto (ABGML) y bajo (ABL) contenido de nutrientes, en el medio sin líquen con alto contenido en nutrientes (ABGM) y en el medio rico en nutrientes KB, al aumentar el tiempo de incubación hasta 15 días a 25°C. Las muestras de talos liquénicos se tomaron en el otoño de 2012 (Figuras 6a, 6b) y en el verano de 2013 (Figuras 6c, 6d) de varios ejemplares de *Pinus sylvestris* de la Sierra de Javalambre (Teruel, España). Cada punto representa el valor medio de los recuentos realizados por triplicado en cada medio de cultivo de la misma muestra compuesta de distintos talos. La desviación estándar de los datos se indica mediante líneas verticales.

Figura 7. Efecto de dos antifúngicos sobre el crecimiento de hongos filamentosos de muestras de *Pseudevernia furfuracea*. Se muestran dos ejemplos representativos del efecto de la cicloheximida (C) y la natamicina (N) en el medio rico en nutrientes KB sobre el crecimiento de dos hongos filamentosos, aislados frecuentemente de muestras de talos liquénicos, tras 7 días de incubación a 25°C

Figura 8. Efecto de la cicloheximida (C) y la natamicina (Nat) en la recuperación de bacterias de *Pseudevernia furfuracea*. Se muestra la media de los recuentos de bacterias cultivables (UFC/ml) ectoliquénicas de *P. furfuracea* tanto en medio de cultivo rico en nutrientes (KB) como medio mínimo (ABGM), suplementados con cicloheximida o natamicina. H, hongos filamentosos que invaden las placas de medio de cultivo en un periodo de 3-5 días. H', hongos filamentosos que invaden las placas de medio de cultivo en un periodo superior a 7 días. Cada barra representa el valor medio de los recuentos en cada medio de cultivo de dos talos diferentes de *P. furfuracea* analizados por duplicado. La desviación estándar de los datos se representa mediante líneas verticales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (**p<0,01; ***p<0,0001).

Figura 9. Efecto del tiempo de lavado en la recuperación de bacterias ectoliquénicas de *Pseudevernia furfuracea*. Se muestra la media de los recuentos

de bacterias cultivables (UFC/ml) ectoliquénicas de *P. furfuracea* tanto en medio de cultivo rico en nutrientes (KB) como medio mínimo (ABGM), ambos suplementados con natamicina, tras 3 días de incubación a 25°C. Cada símbolo representa el valor medio de tres recuentos en cada medio de cultivo de una composición de talos de *P. furfuracea*. La desviación estándar de los datos se representa mediante líneas verticales.

Figura 10. Efecto de distintos tratamientos de desinfección y del procesado de los talos liquénicos en la recuperación de bacterias endoliquénicas de *Pseudevernia furfuracea*. Se muestra la media de los recuentos de bacterias cultivables (UFC/ml) endoliquénicas de *P. furfuracea* tanto en medio de cultivo rico en nutrientes (KB) como medio mínimo (ABGM), ambos suplementados con natamicina, tras 7 días de incubación a 25°C. Los detalles sobre el tipo y/o tiempo de desinfección ensayado se muestran en la figura. Los tipos de procesado comparados fueron dilacerado (Dil.) *versus* machacado (Mach.). Cada barra representa el valor medio de tres recuentos en cada medio de cultivo de una composición de talos de *P. furfuracea*. La desviación estándar de los datos se representa mediante líneas verticales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$).

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que ponen de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1

Aislamiento de bacterias asociadas a especies liquénicas mediante el uso de un extracto liquénico

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de líquenes, lugar del muestreo y toma de muestras

Los talos del liquen *Pseudevernia furfuracea* (Figura 1) se obtuvieron de una zona de bosque de *Pinus sylvestris* en las montañas de la Sierra de Javalambre, situada en la comarca Gúdar-Javalambre, en la provincia de Teruel (Aragón, España). Los muestreos iniciales se llevaron a cabo en mayo de 2012. A partir de entonces, se

tomaron nuevas muestras en el mismo lugar. En cada muestreo, las muestras de líquenes se recogieron a partir de al menos cinco árboles seleccionados al azar dentro de un área de unos 50 metros. Se recogieron especímenes fisiológicamente activos que se retiraron cuidadosamente de la corteza de los árboles utilizando guantes estériles, transfiriéndose después a placas Petri de plástico estériles que se almacenaron en bolsas de plástico individuales. Los distintos talos liquénicos muestreados se transportaron al laboratorio y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento dentro de las 24 horas después del muestreo. La temperatura de cada muestreo se registró *in situ* y los datos de humedad se obtuvieron de la Agencia Española de Meteorología (AEMET).

Análisis bacteriológico

Para el aislamiento de bacterias asociadas a *P. furfuracea*, las muestras de talos liquénicos se analizaron inicialmente como sigue. Brevemente, cada talo individual se lavó en agua destilada estéril 1 minuto y con ayuda de un bisturí estéril se cortaron submuestras de 0,2 g en placas Petri estériles. Estas submuestras se dilaceraron en solución salina estéril (0,9% NaCl en agua destilada, pH 7,0) (SS) y a continuación se realizaron diluciones decimales seriadas en solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS) (10 mM, pH 7,0 (NaCl 8 g; KCl 0,2 g; Na₂HPO₄ • 12H₂O 2,9 g; KH₂PO₄ 0,2 g; agua destilada hasta 1 L). Tanto de las muestras de dilacerado de talo como de sus diluciones se sembraron alícuotas de 100 µl en el medio sólido no selectivo King B (KB) (King *et al.*, 1954; J. Lab. Clin. Med. 44:301-307) utilizado rutinariamente para el aislamiento de bacterias asociadas a plantas, tras suplementarlo con cicloheximida (50 mg / mL) (Biosca *et al.*, 2003; Phytopathology 93: 485-492, modificado según Ishimaru & Klos, 1984, Phytopathology. 74:1342–1345) para evitar el crecimiento de hongos. Las placas se incubaron durante una semana a 25°C en condiciones de oscuridad y las colonias bacterianas que aparecieron en ellas se contaron para determinar las unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) de talo. Las colonias morfológicamente diferentes se purificaron en el mismo medio y crioconservaron a -80°C en 25% (v/v) de glicerol estéril.

Modificación del protocolo del aislamiento de bacterias para mejorar la recuperación de bacterias asociadas a *P. furfuracea*

Para tratar de mejorar la recuperación de bacterias asociadas al líquen *P. furfuracea* se ensayaron dos modificaciones del protocolo de aislamiento de bacterias mediante el análisis de tres muestras de talo diferentes en experimentos independientes. En

primer lugar, para incrementar la recuperación, mayoritariamente, de bacterias
ectoliquénicas, tras un breve lavado de 1-2 minutos en SS estéril, las muestras se
sometieron a un lavado extensivo en matraces de 250 mL con 50 mL de solución de
Ringer estéril (Schaad *et al.*, 1990; *Methods in Phytobacteriology*. Z. Klement, K.
5 Rudolph & D.C. Sands (eds.) Akadémia Kiadó, Budapest, pp. 153-190.) suplementada
con un 0,05% del surfactante Tween 20 (RST), con agitación durante 90 minutos a
200 r.p.m. a temperatura ambiente (Biosca *et al.*, 2011; En: IV International
Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, BioMicroWorld
2011). En segundo lugar, para aumentar la recuperación de bacterias endoliquénicas,
10 estos mismas muestras de talos lavados se sometieron a una desinfección en
superficie (con etanol 70% (v/v) durante 1 minuto), se lavaron dos veces durante 5
minutos en agua destilada estéril y se dilaceraron en 3 mL de tampón de maceración
antioxidante (AMB) (Gorris *et al.*, 1996; *Acta Hortic.* 411: 47–51); para prevenir el
estrés oxidativo que se pudiera producir durante el procesado de los talos liquénicos y
15 que podría afectar al aislamiento de bacterias liquénicas. Cada muestra de dilacerado
de talo se agitó ligeramente durante 5-10 minutos en hielo antes de proceder a su
siembra en las placas de medio de cultivo. Tanto de las muestras de lavado de talos
como las de dilacerado de talos y sus respectivas diluciones, se sembraron alícuotas
de 100 µl por duplicado en placas de KB. Dado que algunas bacterias liquénicas,
20 como *Methylobacterium* sp., crecieron durante el aislamiento de microalgas de *P.*
furfuracea en el medio mínimo BBM (de las iniciales en inglés *Bold's Basal Medium*)
utilizado para el crecimiento de microalgas (Bischoff & Bold, 1963. *Some soil algae*
from enchanted rock and related algal species. Phycological Studies IV., Univ. No.
6318, Texas, p. 1- 95) en estudios anteriores, este medio de cultivo junto con el medio
25 Metanol Sales Minerales (MMS) (Green, 2006. *Methylobacterium*. *Prokaryotes* 5, pp.
257-265), selectivo para *Methylobacterium*, se incluyeron en estos ensayos después
de añadirles cicloheximida, como se ha descrito anteriormente. Todas las placas
inoculadas se incubaron durante una semana a 25°C en condiciones de oscuridad,
anotándose el número de colonias bacterianas que se desarrollaron en todos los
30 medios de cultivo. Las poblaciones de bacterias endoliquénicas y endoliquénicas
cultivables se estimaron calculando los valores medios de UFC/g de muestras de talos
lavados y talos desinfectados y dilacerados, respectivamente. De cada medio de
cultivo se seleccionaron al azar colonias con diferente morfología colonial y se
purificaron y crioconservaron como se ha mencionado anteriormente.

35

Desarrollo de medios de cultivo enriquecidos con extracto de líquen

Para aumentar aún más la recuperación de bacterias cultivables asociadas a *Pseudevernia furfuracea*, se trató de simular las condiciones nutricionales de este líquen mediante el desarrollo de varios medios de cultivo mínimos enriquecidos con extractos de talos de *P. furfuracea*. Para este propósito, se incluyó el medio mínimo AB (Chilton *et al.*, 1974, citado *ad supra*), que se suplementó o no con glucosa (G) (fuente de carbono principal de fotobionte) (ABG) y/o manitol (M) fuente de carbono principal del micobionte) (ABM y ABGM), y/o extractos de líquenes (L) (ABL, ABLG, ABLM y ABLGM). Los diferentes medios de cultivo AB se prepararon añadiendo al medio glucosa y/o manitol esterilizados por filtración (cada uno a 0,5% (p/v) de acuerdo con Cardinale *et al.* (2006, citado *ad supra*) y/o extractos de líquen fresco (también al 0,5% (v/v)). Para la preparación de los extractos de líquen, los talos de *P. furfuracea* se lavaron brevemente con agua destilada estéril, después se lavaron con RST estéril durante 30 minutos a 200 r.p.m. a temperatura ambiente, a continuación se trituraron en RST (5%) (p/v) en una licuadora y se esterilizaron por filtración (incluyendo el uso de prefiltros de policarbonato con un tamaño de poro de 0,8 micras, Millipore). También se utilizaron para algunos ensayos los medios mínimos BBM y MMS suplementados o no con extractos de líquen. Todos los medios de cultivo sólidos se prepararon con agar bacteriológico al 1,5% (p/v) (Pronadisa) y se suplementaron con cicloheximida como se ha descrito anteriormente.

Evaluación de los medios de cultivo enriquecidos con líquen en el crecimiento de aislados bacterianos de *P. furfuracea*

Para investigar el efecto de la adición de extracto de líquen a los medios mínimos sobre el crecimiento de una colección de aislados bacterianos de *P. furfuracea*, inicialmente se ensayaron 20 cepas en el medio AB (suplementado o no con fuentes de carbono y/o extracto de líquen) y BBM y MMS (con y sin extracto de líquen). En base a estos resultados, se seleccionó el medio AB como medio mínimo basal (modificado o no con la glucosa y/o manitol y/o extracto de líquen) para la realización de nuevos ensayos con una colección de 139 cepas bacterianas líquénicas obtenidas en este estudio y en otros de nuestro laboratorio. Además, a efectos comparativos, se incluyeron ocho cepas bacterianas heterótrofas de referencia de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (*Bacillus cereus* CECT 495, *Enterobacter cloacae* CECT 194, *Enterococcus faecalis* CECT 481, *Escherichia coli* CECT 101, *Micrococcus luteus* CECT 245, *Pseudomonas fluorescens* CECT 378, *Salmonella enterica* CECT 443 y *Serratia marcescens* CECT 159). Todas las cepas se inocularon en todos los

medios enriquecidos o no con liquen, utilizando el medio KB, en el que habitualmente se purificaron, como control de crecimiento, que se fijó arbitrariamente como un crecimiento del 100%. Los inóculos bacterianos se prepararon a partir de cultivos crecidos en placas de KB a 25°C durante 48 horas y se resuspendieron en PBS estéril (aproximadamente a 10⁸ UFC/ml). Estos inóculos bacterianos se inocularon con un multi-inoculador (Denley multipunto inoculador), al menos por duplicado, en todos los medios anteriormente mencionados. Por otra parte, para determinar el efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento bacteriano, las placas se incubaron durante 96 horas a 25°C y el crecimiento y la coloración se registraron después de 24 horas y 96 horas de incubación. Para el análisis estadístico posterior, los resultados de crecimiento se agruparon en dos (no crecimiento versus crecimiento) o tres categorías (no crecimiento, crecimiento en el punto inoculado y mayor crecimiento (crecimiento abundante en el punto inoculado)).

Mejora de la cultivabilidad de las bacterias asociadas a *P. furfuracea* a partir de muestras de talo individuales

Con el fin de evaluar el protocolo de aislamiento de bacterias y los medios de cultivo enriquecidos con liquen en la mejora de la cultivabilidad tanto de bacterias ectoliquénicas como endoliquénicas de talos de *P. furfuracea*, se analizaron nuevas submuestras de talo (0,2 g) según a la metodología descritas anteriormente. A continuación, se sembraron alícuotas (100 µl) de lavado de talo y dilacerado de talo por duplicado en los medios enriquecidos o no con extracto de liquen (con o sin glucosa o glucosa y manitol) y el medio KB, y se incubaron a 25°C durante 3 días. Tras la incubación, las colonias bacterianas se contaron en todos los medios de cultivo, y las poblaciones de bacterias cultivables ectoliquénicas y endoliquénicas se estimaron mediante el cálculo de los valores medios de UFC/g de lavado de talo y dilacerado de talo lavado y desinfectado, respectivamente. Una selección aleatoria de las colonias que mostraron diferentes morfologías en las placas de aislamiento se purificaron y criopreservaron como ya se ha mencionado. El lavado y dilacerado de talo restantes también se criopreservaron para posteriores análisis.

Mejora de la cultivabilidad de las bacterias asociadas a *P. furfuracea* a partir de muestras compuestas por distintos talos

Para validar la metodología desarrollada en este estudio en distintas muestras de talos, se tomaron nuevas muestras de líquenes de la misma localidad muestreada en mayo de 2012, pero de diferentes ejemplares recolectados de *P. sylvestris*, en dos

muestreos adicionales en octubre de 2012 y septiembre de 2013. En este caso, para cada muestreo realizado se analizaron muestras de 1 g compuestas por distintos talos de *P. furfuracea* (submuestras de 0,2 g de cinco talos de diferentes pinos), en lugar de analizar talos individuales. Los recuentos de bacterias cultivables ectoliquénicas y endoliquénicas de *P. furfuracea* se determinaron por triplicado en los medios de cultivo enriquecidos con liquen, ABLGM, con alto contenido nutrientes (con dos fuentes de carbono, glucosa y manitol) y ABL con bajo contenido nutrientes (sólo con los nutrientes del extracto de liquen), y en el medio sin liquen con alto contenido en nutrientes ABGM y el medio rico en nutrientes KB, estos últimos con propósitos comparativos. Las placas se incubaron como se ha descrito anteriormente y el número de colonias que aparecieron en ellas se registró a distintos intervalos de tiempo hasta 15 días, a no ser que el número de colonias fuera demasiado alto o aparecieran hongos filamentosos en las placas de los medios de cultivo. Además, para estudiar el efecto del medio de aislamiento en la diversidad de las bacterias recuperadas, también se registraron las diferentes morfologías coloniales observadas en los diferentes medios de cultivo al final del experimento. Las colonias que mostraron distintos fenotipos se seleccionaron al azar, se purificaron mayoritariamente en placas de KB y se criopreservaron como se ha descrito anteriormente.

20 Optimización del protocolo de aislamiento para mejorar la recuperación de bacterias asociadas a *P. furfuracea*

Con objeto de avanzar en la optimización del método de recuperación de bacterias líquénicas desarrollado, se ensayaron dos modificaciones adicionales del protocolo de aislamiento de bacterias mediante el análisis de nuevas muestras de talos en experimentos independientes. En primer lugar, para reducir el crecimiento de hongos filamentosos contaminantes que dificultan la recuperación de las bacterias de crecimiento más lento, se seleccionó otro antifúngico distinto al habitual y se comparó el efecto de ambos antifúngicos sobre el crecimiento de una selección de 7 hongos filamentosos que crecen frecuentemente en las placas de aislamiento de bacterias a partir de las muestras de talos líquénicos. La cicloheximida (50 mg/L) es el antifúngico más ampliamente utilizado para reducir o evitar el crecimiento de hongos durante el aislamiento de bacterias de muestras ambientales, y la natamicina (21,6 mg/L, según Pedersen, 1992, Appl. Environ. Microbiol. 58(3):1064-1066), descrito como un antifúngico más eficaz que la cicloheximida, sin riesgos para la salud (se usa en la industria de alimentos) y sin efectos sobre el crecimiento bacteriano, a diferencia de la cicloheximida. Dichos ensayos se realizaron inicialmente en placas del medio de

cultivo general rico en nutrientes KB, donde los hongos seleccionados crecen rápidamente. A continuación, se ensayó el efecto de la adición de dichos antifúngicos en la recuperación de bacterias liquénicas tanto en KB como en el medio mínimo (ABGM).

5

En segundo lugar, con el fin de aumentar la recuperación de bacterias endoliquénicas que parecían verse afectadas por el paso de desinfección: i) se evaluó el efecto del tiempo de lavado en la recuperación de bacterias ectoliquénicas tanto en el medio de cultivo rico en nutrientes (KB) como en el medio mínimo (ABGM), ambos suplementados con natamicina, y ii) se ensayó el efecto de la desinfección de los talos liquénicos con etanol 70% (v/v) a dos tiempos distintos (30 segundos y 1 minuto) o con peróxido de hidrógeno al 8% (v/v) durante 5 minutos, incluyendo submuestras que se procesaron sin someterse a ningún tratamiento de desinfección. Al mismo tiempo, también se investigó el efecto del tipo de disrupción de los talos en el tampón antioxidante AMB, comparando el procesado de los mismos mediante dilacerado (anteriormente explicado) frente al machacado, en el interior de una bolsa de plástico esterilizada, con una maza de goma (Ordax *et al.*, 2009, J. Appl. Microbiol. 107(1):106-16). En ambos casos, tras la disrupción de los talos, se procedió a la incubación de los mismos en hielo picado, durante 5-10 minutos. Tras dicha incubación, se realizaron diluciones decimales seriadas de los extractos en AMB, sembrándose alícuotas de 100 µl por duplicado tanto directamente de dichos extractos como de sus respectivas diluciones en los medios de cultivo KB y ABGM con natamicina. Todas las placas inoculadas se incubaron durante una semana a 25°C en condiciones de oscuridad, anotándose el número de colonias bacterianas que se desarrollaron en los medios de cultivo. En este caso, las poblaciones de bacterias endoliquénicas cultivables se estimaron calculando los valores medios de UFC/g.

10

15

20

25

Análisis estadístico

Los datos de los recuentos de bacterias cultivables se expresaron como las medias de dos o tres determinaciones por cada análisis bacteriológico y medio de cultivo, y se normalizaron mediante transformación logarítmica. La significación estadística de las diferencias observadas entre dos medias normalizadas se evaluó mediante un test paramétrico t de Student y en el caso de tres o más medias con un análisis ANOVA seguido de un análisis post-*hoc* de Bonferroni o de Dunnet. Las variables categóricas se compararon mediante la prueba de Chi-cuadrado. El análisis multivariante se realizó por medio de un modelo de regresión logística para determinar el efecto de la adición de extracto de líquen a los medios de cultivo, el tiempo de incubación y el protocolo de aislamiento de bacterias, en el crecimiento de aislados bacterianos de *P. furfuracea*. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron significativos. Los datos se analizaron con el programa SPSS 19.0 (SPSS Statistics IBM).

15 RESULTADOS

Aislamiento de bacterias

i) Análisis inicial

20 El aislamiento de *Methylobacterium* sp. en el medio mínimo BBM utilizado para el aislamiento de microalgas de *Pseudevernia furfuracea* fue el comienzo de una investigación para estudiar las bacterias cultivables asociadas a la especie de líquen *P. furfuracea*. Un análisis bacteriológico preliminar de muestras del talo de *P. furfuracea*, mediante el dilacerado de talos individuales en SS estéril, mostró resultados similares, sólo crecieron escasas colonias en el medio de cultivo no selectivo KB después de 7 días de incubación, rindiendo bajos recuentos bacterianos (10^2 UFC/g de talo fresco). Debido al bajo número de colonias bacterianas recuperadas, se siguieron dos aproximaciones para tratar de mejorar la recuperación de bacterias asociadas a *P. furfuracea*. En primer lugar, se modificó el método de aislamiento de bacterias a partir de las muestras de talo y, en segundo lugar, se desarrollaron medios de cultivo enriquecidos con extracto de líquen (ver debajo).

ii) Mejora de la recuperación de bacterias asociadas a *P. furfuracea* mediante modificación del protocolo de aislamiento de bacterias.

35 Para mejorar la recuperación de bacterias asociadas a de *P. furfuracea*, se ensayaron dos modificaciones en el protocolo de aislamiento: un lavado extensivo de las

muestras de talo con un agente tensioactivo (Tween 20) para incrementar la recuperación de bacterias ectoliquénicas, y el uso de un tampón de antioxidante (AMB) para dilacerar las muestras de talo y mejorar el aislamiento de las bacterias endoliquénicas. En primer lugar, cuando se comparó el aislamiento de bacterias endoliquénicas de talos desinfectados y dilacerados en el tampón antioxidante AMB frente a SS, los resultados mostraron que los recuentos bacterianos medios en KB fueron mayores en AMB (10^3 UFC/g de talo fresco) (Figura 2) que en SS (10^2 UFC/g de talo fresco) (datos no mostrados), para el mismo período de incubación (7 días). Además, las colonias bacterianas aisladas con AMB aparecieron antes en placas del medio KB después de 3 a 5 días de incubación.

En segundo lugar, al comparar el aislamiento de bacterias ectoliquénicas, estimadas por el lavado de talos frescos, frente a las endoliquénicas de dilacerado de talos (Figura 2), los recuentos medios de bacterias cultivables fueron más bajos para las ectoliquénicas que para las endoliquénicas en los tres medios de cultivo ensayados. En el medio KB, los recuentos medios de bacterias ectoliquénicas fueron de $3,3 \times 10^2$ UFC/g de talo fresco lavado, siendo inferiores a los obtenidos con bacterias endoliquénicas (1×10^3 UFC/g de talo fresco dilacerado), después de 7 días de incubación (Figura 2). Curiosamente, la inclusión de los medios mínimos BBM y MMS con propósitos comparativos, rindió recuentos de bacterias endoliquénicas significativamente más altos (de 1,8 hasta $2,1 \times 10^3$ UFC/g de talo fresco dilacerado, respectivamente) que los obtenidos en el medio rico en nutrientes KB (1×10^3 UFC/g de talo fresco dilacerado) después de 7 días (Figura 2), pero las colonias fueron más pequeñas y aparecieron de 2 a 4 días más tarde que en las placas de KB. Del mismo modo, los recuentos medios de bacterias ectoliquénicas de talos frescos lavados también fueron más altos en BBM ($6,7 \times 10^2$ UFC/g) que en las placas de KB ($3,3 \times 10^2$ UFC/g), pero no en el medio MMS ($1,3 \times 10^2$ UFC/g) (Figura 2). El crecimiento en medio mínimo sin fuente de carbono (BBM) o sólo con metanol (MMS) fue probablemente a expensas de los nutrientes presentes en los lavados o de los dilacerados de talos utilizados como inóculo en las placas de aislamiento. No hubo soporte estadístico para las diferencias encontradas entre los recuentos bacterianos medios obtenidos en KB, BBM y MMS ($p > 0,05$), ni para las observadas entre bacterias ectoliquénicas frente a las endoliquénicas en cada medio de cultivo, probablemente debido a la variabilidad de los recuentos obtenidos con diferentes talos.

35

iii) Los medios de cultivo enriquecidos con líquen mejoran el crecimiento de cepas bacterianas de *P. furfuracea*.

Debido a que el aumento de la recuperación de colonias bacterianas de talos líquénicos en medio mínimo podría ser debido al extracto de líquen utilizado como inóculo durante el aislamiento bacteriano, también se ensayó el efecto de la adición de extracto de líquen al medio mínimo (suplementado o no con fuentes de carbono) en el crecimiento de una colección de cepas bacterianas de *P. furfuracea*. Los resultados de experimentos preliminares con 20 cepas bacterianas cultivadas en los medios ABG, ABM, ABGM, BBM y MMS enriquecidos o no con extracto de líquen, mostraron un crecimiento más rápido y mayor en los medios de cultivo enriquecidos con líquen, con mejores resultados con los medios AB con respecto a los medios BBM y MMS (datos no mostrados). En la Figura 3 se muestran imágenes representativas del crecimiento de cepas bacterianas aisladas de *P. furfuracea* en el medio mínimo AB suplementado o no con fuentes de carbono y/o extracto de líquen. Para algunas de las cepas ensayadas se observó un crecimiento mayor en todos los medios de cultivo enriquecidos con líquen y con fuentes de carbono en comparación con los medios de cultivo sin líquen, suplementados sólo con fuentes de carbono. Además, para algunas cepas, el crecimiento fue mayor en el medio con alto contenido en nutrientes, ABLGM, enriquecido con extracto de líquen y con glucosa y manitol. Curiosamente, la fuente de carbono utilizada en el medio de cultivo AB no sólo afectó al crecimiento de algunas cepas, sino también a la pigmentación de algunas de ellas; pues en el medio AB con glucosa (sola o con manitol) algunas cepas mostraron una pigmentación más fuerte (de color amarillento o rosáceo), independientemente de la presencia de extracto de líquen.

25

Para confirmar estos resultados iniciales, se realizaron más experimentos con todos los medios de cultivo AB utilizando 139 cepas bacterianas aisladas de *P. furfuracea* y ocho cepas bacterianas de referencia de fuentes no líquénicas. El efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento bacteriano también se investigó después de 24 horas y 96 horas de incubación. Como se muestra en la Figura 4, cuando cada uno de los medios de cultivo enriquecidos con líquen se comparó con los medios correspondientes sin extracto de líquen, y los resultados de crecimiento se agruparon en tres categorías: i) no crecimiento, ii) crecimiento en el punto inoculado y iii) aumento del crecimiento, se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) tanto después de 24 horas (Figura 4a) como tras 96 horas (Figura 4b) de incubación. Así, creció un mayor porcentaje de cepas en los medios de cultivo enriquecidos con líquen

35

frente a los medios de cultivo sin líquen, y tras 96 horas frente a 24 horas de incubación. Por otra parte, también se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los diferentes medios de cultivo enriquecidos con líquen, con un mayor porcentaje de cepas mostrando un mayor crecimiento en el medio ABLGM con alto contenido de nutrientes (20,4%), seguido por los medios de cultivo ABLM (19,7%) y ABLG (16,4 %), y un menor porcentaje en el medio con bajo contenido en nutrientes ABL (2,7%), después de 96 horas de incubación (Figura 4b).

Cuando los resultados se analizaron agrupándolos en dos categorías (crecimiento *versus* no crecimiento), el crecimiento en los medios enriquecidos con líquen frente a los medios de cultivo sin líquen, la prueba de Chi-cuadrado reveló que el porcentaje de cepas que crecieron en un medio de cultivo enriquecido con líquen (91,7%) fue significativamente mayor ($p < 0,001$) que en el mismo medio sin extracto de líquen (66%) después de 96 horas de incubación. Además, las cepas de líquenes crecieron significativamente antes ($p < 0,001$) en presencia de extracto de líquen (75,3% después de 24 horas) que en los medios de cultivo sin líquen (38,3% después de 24 horas de incubación). En este sentido, un análisis de regresión logística reveló que el uso de un medio de cultivo con extracto de líquen con respecto a un medio de cultivo sin líquen multiplica por cinco la probabilidad de que las bacterias asociadas líquenes crezcan (Razón de probabilidades (*odds ratio*) = 5,2, 95% intervalo de confianza = 4,2 a 6,4; $p < 0,001$) (Tabla 1), independientemente del período de incubación y del protocolo de procesamiento utilizado para el aislamiento de bacterias.

Tabla 1. Modelo de regresión logística de la probabilidad de crecimiento bacteriano

| Factores | β (SE) | Razón de probabilidades (<i>odds ratio</i>) (95% IC) | Valor P |
|--------------------------|--------------|--|---------|
| Medio con líquen | | | |
| Si | 1,64 (0,1) | 5,18 (4,21-6,37) | < 0,001 |
| No* | | | |
| Tiempo de incubación | | | |
| 96 horas | 1,19 (0,1) | 3,28 (2,68-4,01) | < 0,001 |
| 24 horas* | | | |
| Protocolo de aislamiento | | | |
| Dilacerado | 0,14 (0,12) | 1,15 (0,91-1,4) | 0,25 |
| Lavado* | | | |
| Constante | -1,69 (0,16) | | |

*Categoría de referencia

Como era de esperar, el tiempo de incubación multiplica por 3 la probabilidad de que las bacterias asociadas a líquenes crezcan (Razón de Momios (*odds ratio*) = 3,3, intervalo de confianza del 95% = 2,7-4,0, $p < 0,001$) (Tabla 1), independientemente de la presencia de extracto de liquen en el medio y del protocolo para el aislamiento de bacterias. Sin embargo, el protocolo utilizado para el aislamiento de bacterias a partir de talo liquénico (lavado frente dilacerado) no tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento bacteriano ($p > 0,05$) (Tabla 1).

10

Además, cuando el crecimiento de las cepas bacterianas de referencia no liquénicas en los medios de cultivo enriquecidos con liquen se comparó con el de los medios de cultivo sin liquen, de nuevo un mayor porcentaje de cepas crecieron en los medios de cultivo enriquecidos con liquen (78,1%) frente a los que no contenían extracto de liquen (59%) después de 96 horas de incubación. Además, una cepa de referencia auxótrofa fue capaz de crecer en todos los medios de cultivo enriquecidos con liquen pero no en ninguno de los medios de cultivo sin liquen ensayados. Sin embargo, en contraste con los resultados obtenidos con las cepas bacterianas aisladas de *P. furfuracea*, no se encontraron diferencias significativas entre los medios de cultivo enriquecidos con liquen frente a los que no contenían extracto de liquen ($p > 0,05$).

20

iv) Los medios de cultivo enriquecidos con liquen mejoran la cultivabilidad de las bacterias asociadas a talos individuales de *P. furfuracea*.

El siguiente paso fue ensayar los medios enriquecidos con liquen y el protocolo modificado de aislamiento de bacterias con nuevas submuestras del talo de *P. furfuracea*. Como se muestra en la Figura 5, justo después de 3 días de incubación a 25°C, las bacterias ectoliquénicas y endoliquénicas del talo de *P. furfuracea*, se recuperaron en números más altos en todos los medios de cultivo enriquecidos con liquen (los recuentos medios variaron de $9,5 \times 10^3$ a $1,8 \times 10^4$ UFC/g de talo fresco lavado y $3,9$ a $5,7 \times 10^4$ UFC/g de talo fresco dilacerado), seguido por los medios de cultivo sin liquen (recuentos medios variaron de 5×10^3 a $1,0 \times 10^4$ UFC/g de talo fresco lavado (excepto para el medio AB donde no se recuperaron colonias) y desde $9,5 \times 10^3$ a $3,7 \times 10^4$ UFC/g de talo fresco dilacerado), y por lo general, en números más bajos en las placas KB (los recuentos medios variaron de 7×10^3 UFC/g de talo fresco lavado a $1,0 \times 10^4$ UFC/g de talo fresco dilacerado) utilizado para fines comparativos. Por otra parte, los recuentos bacterianos en los medios de cultivo mínimos con alto

30

35

contenido en nutrientes (con y sin extracto de liquen) fueron más altos que los
 obtenidos en los medios de cultivo mínimos con bajo contenido en nutrientes,
 especialmente cuando se compararon con el medio de cultivo AB, tanto para bacterias
 ectoliquénicas como endoliquénicas (Figura 5), que también crecieron antes en los
 5 medios de cultivo mínimos con alto contenido en nutrientes sin liquen que en el medio
 mínimo AB. En este sentido, las colonias endoliquénicas en el medio de cultivo AB
 sólo se observaron después de 3 días de incubación, obteniéndose los recuentos
 medios de colonias más bajos. En el caso de los medios ABL, con bajo contenido en
 nutrientes, y AB, las colonias bacterianas crecieron más lentamente que en los otros
 10 medios de cultivo, al igual que las colonias de hongos filamentosos contaminantes que
 crecieron menos que en otros medios de cultivo. Estas diferencias fueron más
 pronunciadas con respecto al medio KB rico en nutrientes.

A pesar de que los recuentos bacterianos en los medios enriquecidos con liquen
 15 fueron superiores a los obtenidos con los medios de cultivo sin liquen, no hubo
 diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los recuentos medios obtenidos en cada
 medio de cultivo ensayado, ni entre bacterias ectoliquénicas y endoliquénicas para
 cada medio de cultivo ($p > 0,05$). Sin embargo, cuando los valores medios de UFC/g
 obtenidos tanto con bacterias ectoliquénicas (Figura 5a) como endoliquénicas (Figura
 20 5b) se analizaron mediante la agrupación de los medios de aislamiento en dos
 categorías (medios enriquecidos con liquen frente a medios de cultivo sin liquen), los
 resultados revelaron recuentos bacterianos significativamente más altos en los medios
 mínimos con extracto de liquen que en estos mismos medios sin liquen, y que en el
 medio KB ($p < 0,05$) (Figuras 5a y 5b). Cuando se contrastaron los recuentos medios
 25 obtenidos con bacterias ectoliquénicas frente a bacterias endoliquénicas después de 3
 días de incubación a 25°C, de nuevo los tamaños poblacionales de bacterias fueron
 significativamente más altos en el dilacerado del talo que en la superficie del talo
 ($p < 0,001$).

30 v) Mejora de la cultivabilidad de las bacterias asociadas a *P. furfuracea* a partir de
 muestras compuestas por distintos talos mediante el uso de medios de cultivo
 enriquecidos con liquen y períodos de incubación prolongados.

En base a los dos resultados anteriormente mencionados, decidimos evaluar dos
 medios de cultivo enriquecidos con liquen, ABLGM (alto contenido en nutrientes) y
 35 ABL (bajo contenido en nutrientes), junto con el protocolo de aislamiento de bacterias
 mejorado, para aumentar la cultivabilidad de un rango más amplio de bacterias

asociadas a *P. furfuracea*, utilizando muestras compuestas por distintos talos de muestreos adicionales realizados en el otoño de 2012 y el verano de 2013, incluyendo los medios de cultivo sin líquen ABGM y KB con propósitos comparativos. Además, para favorecer la recuperación de bacterias de crecimiento lento en el medio ABL con bajo contenido en nutrientes, el período de incubación se prolongó hasta 15 días.

La influencia del período de incubación y del medio de aislamiento en la recuperación de bacterias asociadas a *P. furfuracea* se investigaron mediante la determinación del incremento en el número de colonias, tanto de bacterias ectoliquénicas y endoliquénicas, a partir de muestras compuestas por distintos talos, a lo largo del tiempo. Como se muestra en la Figura 6, en general, los recuentos bacterianos medios aumentaron rápidamente dentro de los primeros 3 días de incubación, de manera similar a los resultados mostrados en la Figura 5 con un talo individual. Los recuentos bacterianos continuaron aumentando con períodos de incubación más largos hasta que el número de colonias se estabilizó después de aproximadamente 7 a 15 días dependiendo del medio de aislamiento utilizado, sin tener en cuenta el protocolo de aislamiento bacteriano y la muestra (compuesta por distintos talos) analizada. En general, el medio de cultivo ABL, con líquen y bajo contenido en nutrientes, alcanzó los mayores conteos después de 15 días de incubación, seguido por el medio con líquen y alto contenido en nutrientes ABLGM y el medio de cultivo ABGM sin líquen, en los que los recuentos se estabilizaron un poco antes en algunos casos. En el medio de cultivo rico en nutrientes KB los recuentos de bacterias se estabilizaron mucho antes (en una semana) (Figura 6). De nuevo, en el medio ABL, con bajo contenido en nutrientes, las colonias bacterianas fueron más pequeñas y los hongos filamentosos crecieron más despacio y en menor número que en los medios de cultivo con mayor cantidad de nutrientes ABLGM, ABGM y KB. En general, los recuentos bacterianos medios en los medios enriquecidos con líquen ABLGM y ABL fueron mayores que los obtenidos con los medios de cultivo ABGM, sin líquen, y KB, independientemente de la muestra analizada, del protocolo de aislamiento de bacterias y del período de incubación (Figura 6).

Al comparar los valores medios de UFC/g de las bacterias ectoliquénicas, estimados en talos lavados, frente a los de las bacterias endoliquénicas en los talos dilacerados, estos fueron mayores ($P < 0,05$) para las bacterias ectoliquénicas, independientemente de la muestra analizada, del período de incubación y del medio de cultivo utilizado para el aislamiento (Figura 6), siendo diferentes a los obtenidos con los talos individuales muestreados en la primavera de 2012. Curiosamente, al comparar la

5 cultivabilidad de las bacterias ectoliquénicas frente a la de las bacterias
 endoliquénicas entre los dos medios de cultivo enriquecidos con liquen, los recuentos
 bacterianos fueron más altos en el medio ABLGM, con alto contenido en nutrientes,
 que en el medio ABL, con bajo contenido en nutrientes, para las bacterias
 10 ectoliquénicas (Figuras 6a y 6c), independientemente de la muestra analizada y del
 período de incubación. En este sentido, los recuentos bacterianos medios de bacterias
 ectoliquénicas oscilaron desde $1,7$ hasta $6,5 \times 10^4$ UFC/g en el medio ABLGM y $1,3$ a
 $5,6 \times 10^4$ UFC/g en el medio ABL, después de 15 días de incubación (Figuras 6a y 6
 c). Por el contrario, el medio ABL con bajo contenido en nutrientes rindió mayores
 15 recuentos bacterianos que el medio ABLGM, con alto contenido en nutrientes, para las
 bacterias endoliquénicas (Figuras 6b y 6d), independientemente de la muestra
 analizada y del tiempo de incubación. Así, al final del periodo experimental, los
 números medios de bacterias endoliquénicas variaron desde $4,8$ hasta $7,9 \times 10^3$
 UFC/g en el medio de ABL y de 1 a $1,5 \times 10^3$ UFC/g en el medio ABLGM (Figuras 6b y
 20 6d). También se observaron estas diferencias entre bacterias ectoliquénicas frente a
 las endoliquénicas dependiendo del medio de aislamiento en el caso del medio sin
 liquen ABGM y del medio rico en nutrientes KB, en los que los valores medios de
 UFC/g fueron de nuevo menores que en los medios enriquecidos con liquen. En el
 medio de cultivo ABGM los recuentos medios de bacterias fueron más altos que en el
 25 medio KB (Figuras 6a y 6c), en el caso de las bacterias ectoliquénicas mientras que
 sucedió al contrario para las bacterias endoliquénicas (Figuras 6b y 6d). Después de
 15 días de incubación, los recuentos de bacterias ectoliquénicas variaron de $9,5 \times 10^3$
 a $4,7 \times 10^4$ UFC/g en el medio ABGM y de $7,7 \times 10^3$ a $3,9 \times 10^4$ UFC/g para el medio
 KB (Figuras 6a y 6c). Por el contrario, los valores medios de bacterias endoliquénicas
 30 variaron de 4×10^2 hasta 1×10^3 UFC/g en placas de ABGM y de 1 a $1,25 \times 10^3$
 UFC/g en las placas KB (Figuras 6b y 6d).

No hubo soporte estadístico a las diferencias observadas entre los recuentos
 bacterianos medios en cada medio de cultivo ensayado ($P > 0,05$), excepto entre los
 30 medios ABLGM y ABGM para las bacterias ectoliquénicas en uno de los muestreos, el
 de otoño. Esto podría deberse, al menos en parte, a la variabilidad en los recuentos
 bacterianos en las placas de aislamiento, más pronunciados con las muestras de
 dilacerado de talos que con las de lavado de talos.

35 En cuanto a la diversidad bacteriana, analizada inicialmente por comparación del
 número colonias morfológicamente distintas aisladas en los medios de cultivo

enriquecidos con líquen frente a los medios de cultivo sin líquen después de 15 días de incubación, se encontró una mayor diversidad en los medios de cultivo enriquecidos con líquen frente a los medios de cultivo sin líquen (datos no mostrados). Además, la identificación de una selección de cepas bacterianas aisladas de distintos talos de *P. furfuracea* e identificadas mediante secuenciación parcial del gen bacteriano ADNr 16S ha revelado una gran diversidad de bacterias cultivables, similar a la descrita en otros líquenes analizados mayoritariamente por técnicas independientes del cultivo como es la secuenciación masiva (Cardinale *et al.*, 2006, 2008; Liba *et al.*, 2006; Grube & Berg, 2009; Grube *et al.*, 2009; Hodkinson & Lutzoni, 2009; Selbman *et al.*, 2010; Bates *et al.*, 2011; Lasken & McLean, 2014; Grube *et al.*, 2014).

vi) Optimización de la recuperación de bacterias asociadas a *P. furfuracea*,
Puesto que el crecimiento de hongos filamentosos en las placas de aislamiento de bacterias líquénicas dificultó la recuperación de las mismas, especialmente en el caso de las bacterias de crecimiento más lento, y pese a que todos los medios de cultivo utilizados contenían el antifúngico cicloheximida (actidiona), se decidió evaluar otro antifúngico más eficaz como la natamicina (pimaricina) y aparentemente sin riesgos para la salud (Pedersen, 1992, Appl. Environ. Microbiol. 58(3):1064). Por ello, se investigó el efecto de ambos antifúngicos sobre el crecimiento de una selección de los 7 hongos filamentosos más frecuentes en las placas de aislamiento de las muestras de talos líquénicos en el medio de cultivo KB (el medio de cultivo, de los ensayados, en el que los hongos se desarrollan más rápidamente). Tal y como se muestra en la Figura 7 la adición de natamicina al medio de cultivo KB fue capaz de suprimir el crecimiento de los hongos filamentosos ensayados, mientras que con la cicloheximida sólo se observó una reducción de su crecimiento. En base a dichos resultados y a la mayor toxicidad de la cicloheximida, el siguiente paso fue realizar un estudio comparativo del efecto de cada uno de los dos antifúngicos por separado en la recuperación de bacterias líquénicas tanto en medio de cultivo rico en nutrientes (KB) como en el medio mínimo (ABGM). Como se puede observar en la Figura 8, en el medio de cultivo control sin antifúngicos los hongos filamentosos invadieron las placas de KB en un periodo de 3-5 días, viéndose dicho crecimiento reducido cuando el medio de cultivo se suplementó con cicloheximida. En este último caso, el crecimiento de los hongos filamentosos requirió de un periodo superior a 7 días para invadir las placas de KB. Sin embargo, la adición de natamicina reveló una actividad antifúngica significativamente superior a la de la cicloheximida, inhibiendo el crecimiento de los

hongos filamentosos tanto en el medio KB como en el medio ABGM durante un periodo superior a 15 días. Dicho periodo es considerado como el tiempo mínimo de incubación para favorecer la recuperación de bacterias liquénicas de crecimiento lento, especialmente en medios con bajo contenido en nutrientes. En consecuencia, la adición de natamicina a los medios de cultivo constituyó una optimización para la recuperación de bacterias liquénicas, independientemente del medio de cultivo utilizado.

Por otra parte, puesto que los resultados de la Figura 6 parecían indicar que la cultivabilidad de las bacterias endoliquénicas podría verse afectada por el paso de desinfección previo a la disrupción de los talos liquénicos. Y dado que dicho paso se realiza después de llevar a cabo un lavado extensivo de los mismos, se confirmó en primer lugar el efecto del tiempo de lavado en la recuperación de bacterias ectoliquénicas en medios de cultivo con natamicina (Figura 9), así como la eliminación de las mismas como paso previo al análisis de bacterias endoliquénicas (Figura 10). Los resultados de dichos ensayos, no sólo confirmaron que los recuentos medios de bacterias ectoliquénicas recuperadas aumentaron muy significativamente ($p < 0,0001$) conforme se incrementó el tiempo de lavado de los talos liquénicos (que se estabilizaron entre los 60 y 90 minutos de lavado, independientemente del medio de cultivo ensayado) (Figura 9), sino que también sugerían la posibilidad de prescindir del paso de desinfección que parecía afectar negativamente a la recuperación de bacterias endoliquénicas. En este sentido, el siguiente paso fue investigar el efecto de la desinfección en la recuperación de bacterias endoliquénicas en los medios KB y ABGM con natamicina a partir de los talos lavados 90 minutos (Figura 10). Además, para tratar de estandarizar y agilizar el procesado de los talos liquénicos, se comparó la eficiencia en el aislamiento de cepas bacterianas de talos procesados mediante dilacerado, un proceso que conlleva unos 5 – 10 minutos por muestra, con respecto al machacado, que permite procesar un mayor número de muestras en menos tiempo (aproximadamente 1,5 minutos/muestra). Como se muestra en la Figura 10, cuando se comparó el aislamiento de bacterias endoliquénicas de submuestras de talos lavados frente al de submuestras de los mismos, pero desinfectadas, los recuentos medios de bacterias endoliquénicas en talos sin desinfectar fueron significativamente superiores ($p < 0,01$) (entre 1 y 2 unidades logarítmicas, según el caso). Dichos resultados evidenciaron el efecto negativo de la desinfección en la recuperación de bacterias endoliquénicas, independientemente del tipo y tiempo de desinfección ensayados, así como del medio de cultivo empleado. Dichos resultados junto con los

obtenidos tras el lavado extensivo de los talos liquénicos (60-90 minutos, Figura 9), demostraron no sólo que tras dicho lavado no es necesario llevar a cabo un paso de desinfección sino que dicho paso afecta negativamente a la cultivabilidad y/o viabilidad de las bacterias endoliquénicas y, por lo tanto, a su recuperación.

5 Adicionalmente, cuando lo que se comparó fue el efecto del tipo de procesado de los talos liquénicos en la recuperación de bacterias endoliquénicas, en concreto el dilacerado frente al machacado, ambos en tampón antioxidante AMB, los resultados mostraron que, en la mayoría de los casos, los recuentos bacterianos medios fueron significativamente mayores en los talos liquénicos procesados por machacado
10 ($p < 0,05$) (Figura 10) que en los que se dilaceraron, tras un período de incubación de 7 días. Dichos resultados fueron independientes tanto del medio de cultivo utilizado como de la desinfección y se confirmaron posteriormente con muestras de nuevos talos liquénicos de varias especies y con medios de cultivo suplementados con los respectivos extractos liquénicos (datos no mostrados).

15

REIVINDICACIONES

1. Método para obtener un extracto liquénico que comprende:
 - (a) recolectar al menos un talo liquénico de una especie liquénica de interés,
 - 5 (b) lavar y proceder a la disrupción del talo liquénico con una solución isotónica estéril, y
 - (c) esterilizar por filtración el producto obtenido tras llevar a cabo la etapa b).

- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que los talos liquénicos recolectados pertenecen a la misma población de la especie liquénica.

3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la solución isotónica estéril de la etapa b) está suplementada con un agente surfactante.

- 15 4. Método según la reivindicación 3, en el que el agente surfactante es Tween 20.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la esterilización por filtración de la etapa c) se lleva a cabo con un prefiltro y un filtro, en donde el tamaño de poro del filtro es de entre 0,22 y 0,45 μm .
- 20 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la disrupción del talo liquénico se lleva a cabo mediante triturado.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la solución isotónica es solución Ringer.
- 25 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la especie liquénica se selecciona del grupo que consiste en *Pamotrema* spp., *Pseudevernia* spp. y *Ramalina* spp.
- 30 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el talo liquénico es preferentemente fresco o congelado.

- 35 10. Un extracto liquénico obtenido según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Una composición que comprende el extracto liquénico según la reivindicación 10.

12. Composición según la reivindicación 11, en la que la composición es un medio de cultivo para microorganismos.

5

13. Método para aislar microorganismos asociados a una especie liquénica de interés que comprende

(a) recolectar al menos un talo liquénico de la especie liquénica de la que se quieren aislar los microorganismos, en condiciones de asepsia,

10

(b) Lavar de forma extensiva el talo liquénico recolectado en la etapa (a),

(c) Llevar a cabo la disrupción del talo liquénico lavado en la etapa (b), y

(d) cultivar, en un medio de cultivo mínimo suplementado con, al menos, un extracto liquénico según la reivindicación 10:

(i) el producto obtenido de la disrupción del talo liquénico de la etapa (c), y/o

15

(ii) la solución de lavado recuperada tras el lavado extensivo de la etapa (b)

en donde,

- en el caso de que se cultiven (i) y (ii), se cultivan de forma independiente, y

- el extracto liquénico se obtiene a partir de la especie liquénica de interés de la que se quieren aislar los microorganismos.

20

14. Método según la reivindicación 13, en el que la etapa de cultivo (d) se lleva a cabo en un medio mínimo suplementado con, al menos, un extracto liquénico obtenido a partir de talos de la misma población que el talo de la especie liquénica recolectado según la etapa (a).

25

15. Método según la reivindicación 13 o 14, en el que el lavado se lleva a cabo con una solución isotónica estéril que comprende un agente surfactante.

30

16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el lavado extensivo del talo liquénico comprende el lavado durante al menos, aproximadamente 60 minutos, preferiblemente, aproximadamente 90 minutos.

35

17. Método según la reivindicación 15 o 16, en el que la solución isotónica estéril es solución Ringer.

18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que el agente surfactante es Tween 20.

5 19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en el que la disrupción del talo comprende el machacado del talo liquénico en un tampón de maceración antioxidante estéril y en condiciones de asepsia.

20. Método según la reivindicación 17, en el que el tampón de maceración antioxidante estéril es tampón AMB estéril.

10

21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, en el que el medio de cultivo mínimo comprende una o más fuentes de carbono.

15

22. Método según la reivindicación 21, en el que la fuente de carbono es glucosa y/o manitol.

20

23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 22, en el que los microorganismos asociados a la especie liquénica de interés se seleccionan del grupo que consiste en bacterias, algas, hongos filamentosos, levaduras y/o virus de microorganismos liquénicos.

25

24. Método según la reivindicación 23, en el que para aislar bacterias liquénicas, el cultivo del paso (d) se lleva a cabo en un medio de cultivo mínimo suplementado al menos con el extracto liquénico y al menos con un antifúngico, preferiblemente, natamicina.

30

25. Método según la reivindicación 23, en el que para aislar virus de un microorganismo liquénico, el cultivo del paso (d) se lleva a cabo en un medio de cultivo mínimo suplementado al menos con el extracto liquénico y con el microorganismo liquénico de interés.

35

26. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 25, en el que el talo liquénico se selecciona del grupo que consiste en *Pamotrema* spp., *Pseudevernia* spp. y *Ramalina* spp.

27. Uso de un extracto liquénico según la reivindicación 10 y/o de la composición según la reivindicación 11 o 12, para aislar y/o cultivar microorganismos asociados a una especie liquénica de interés, en donde el extracto liquénico es obtenido a partir de, al menos, un talo liquénico de la especie liquénica de la que se quieren aislar los microorganismos.

5

28. Uso según la reivindicación 27, en el que el cultivo se lleva a cabo en un medio mínimo suplementado con, al menos, un extracto liquénico obtenido a partir de talos de la misma población que el talo liquénico de la especie liquénica de la que se quieren aislar los microorganismos.

10

29. Uso según la reivindicación 27 o 28, en el que el microorganismo asociado a la especie liquénica se selecciona del grupo que consiste en bacterias, algas, hongos filamentosos, levaduras y/o virus de microorganismos liquénicos.

15

30. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, en el que la especie liquénica de interés se selecciona del grupo que consiste en *Pamotrema* spp., *Pseudevernia* spp. y *Ramalina* spp.



FIG. 1

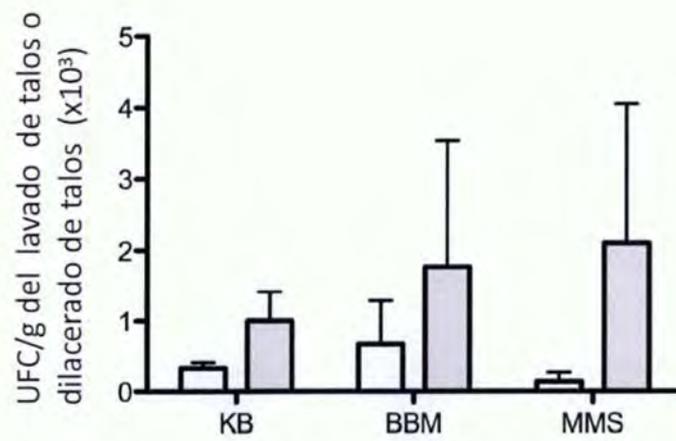


FIG. 2

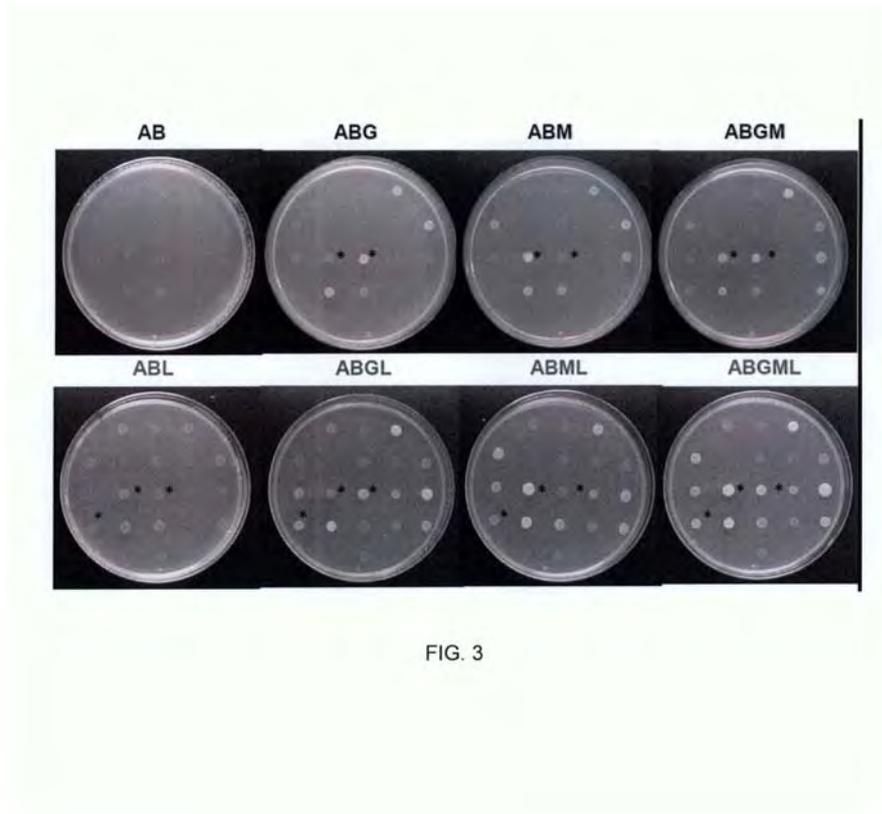
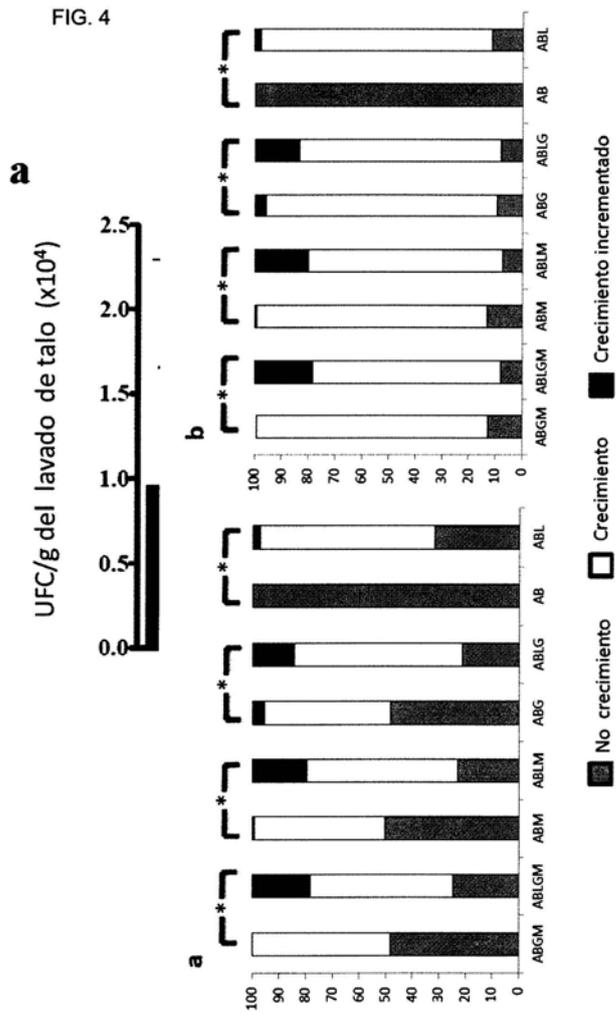


FIG. 3



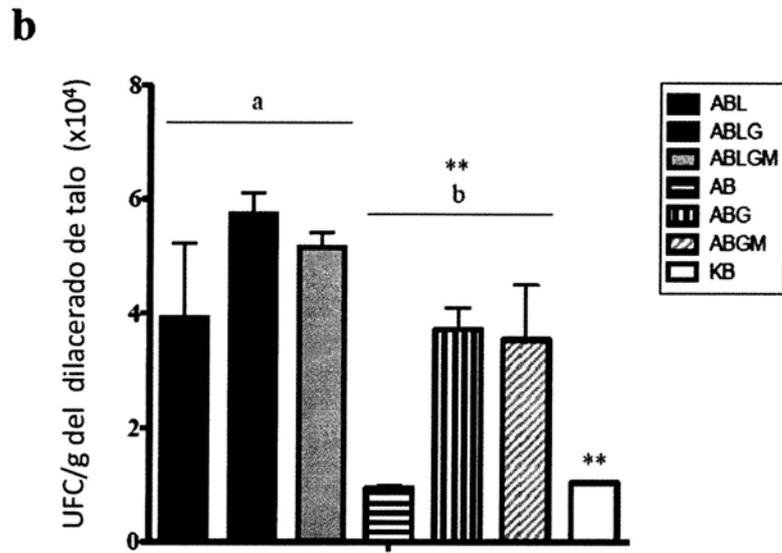


FIG. 5

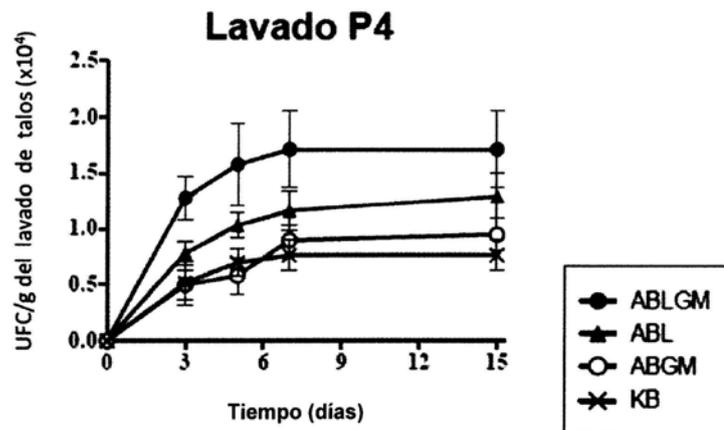


FIG. 6a

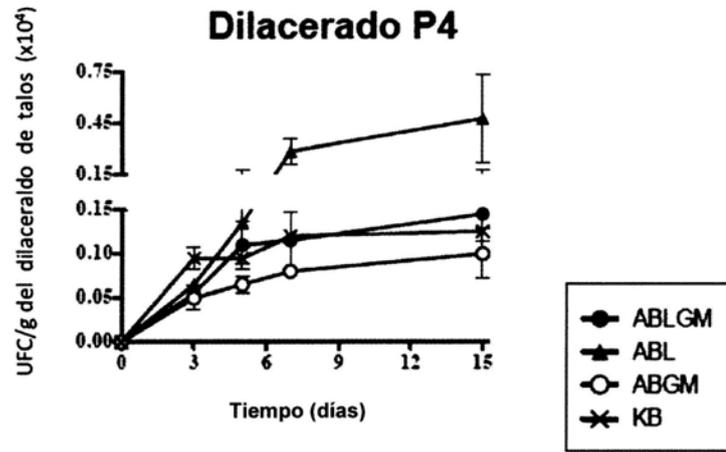


FIG. 6b

Lavado P5

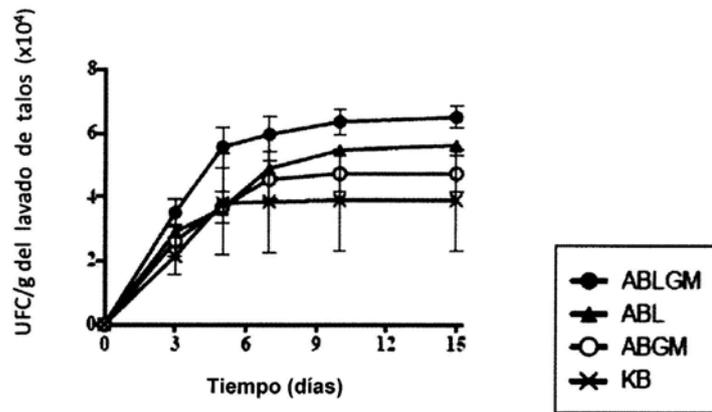


FIG. 6c

Dilacerado P5

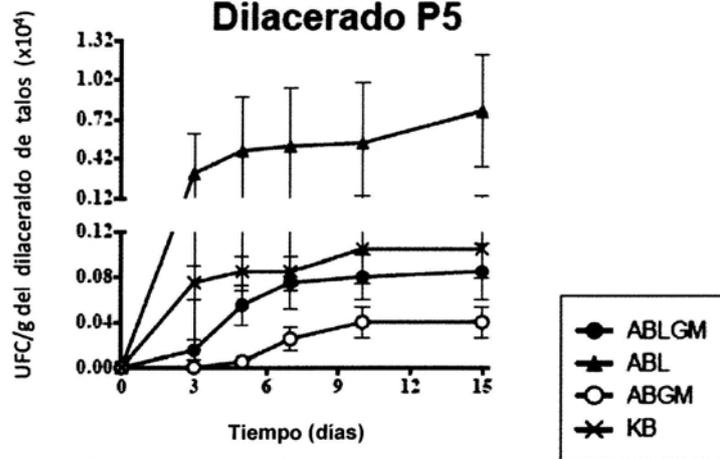


FIG. 6d

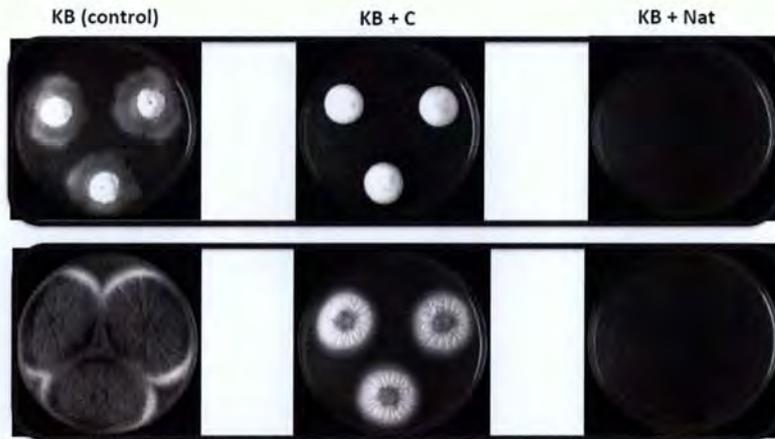


FIG. 7

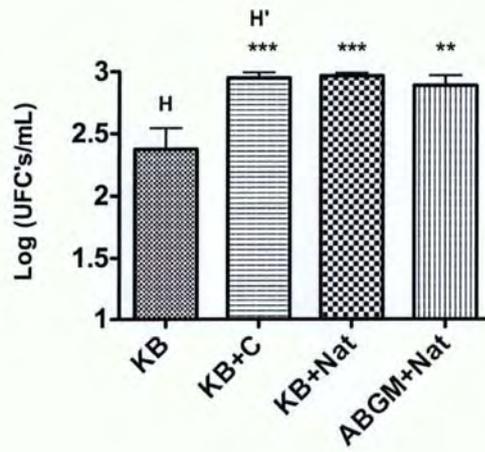


FIG. 8

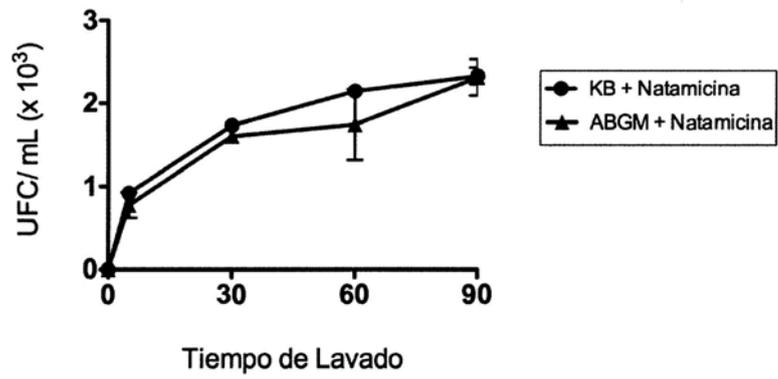


FIG. 9

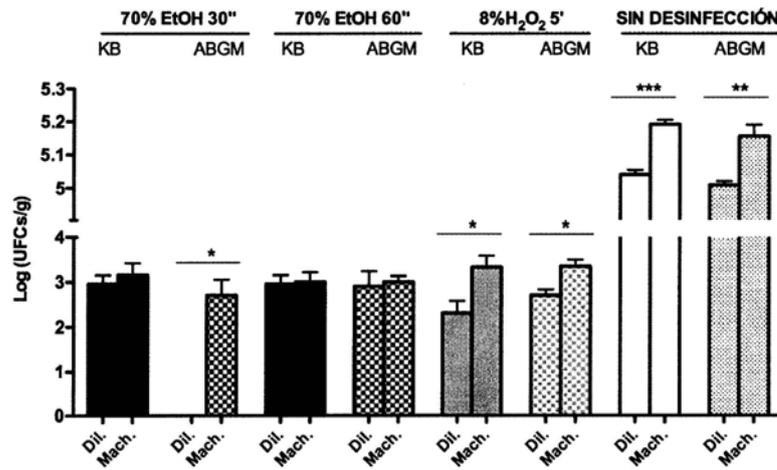


FIG. 10



- ②① N.º solicitud: 201431971
②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.12.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A01H15/00** (2006.01)
C12N1/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| A | CARDINALE M, PUGLIA, A M, GRUBE M. Molecular analysis of Lichen-associated bacterial communities. FEMS Microbiol Ecol., 2006; Vol. 57, nº 3, páginas 484-495. Doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00133.x. Recuperado de Internet: <URL: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6941.2006.00133.x/epdf | 1,6,8,9 |
| A | GRUBE M. et al. Exploring functional contexts of symbiotic sustain within Lichen-associated bacteria by comparative omics. The ISME Journal, 2015, Vol. 9, páginas 412-424. Doi:10.1038/ismej.2014.138. Publicado online 29.07.2014. Recuperado de Internet: <URL: http://www.nature.com/ismej/journal/v9/n2/pdf/ismej2014138a.pdf | 1 |
| A | ES 0157264 A (ROSELL CARDUS, J. M.) 01.03.1943 | |

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 nº:

Fecha de realización del informe
04.08.2015

Examinador
A. Sukhwani

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01H, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, X-FULL, NPL, CAPLUS, AGRICOLA, CABA, SCISEARCH

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.08.2015

Declaración

| | | |
|---|-------------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 1 - 30 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986) | Reivindicaciones 1 - 30 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

La presente invención tiene por objeto un método para obtener un extracto liquénico que comprende (reivindicación 1):

- a) recolectar al menos un talo liquénico de una especie liquénica de interés,
- b) lavar y proceder a la disrupción del talo liquénico con una solución isotónica estéril, y
- c) esterilizar por filtración el producto obtenido tras llevar a cabo la etapa b).

Los talos pertenecen a la misma población de la especie liquénica (reiv. 2), frescos o congelados (reiv. 10). La solución isotónica está suplementada con un agente surfactante como Tween 20 (reivs 3, 4).

La esterilización se lleva a cabo con un prefiltro y un filtro (reiv. 5) y la disrupción mediante triturado (reiv. 6). La solución isotónica es solución Ringer (reiv. 7) y la especie liquénica se selecciona de *Parmotrema* spp., *Pseudevernia* spp. y *Ramalina* spp. (reivs. 8, 26).

También, es objeto de protección el extracto liquénico obtenido por el método reivindicado (reiv. 10), la composición con el extracto liquénico y que es un medio de cultivo para microorganismos (reivs. 11, 12).

Asimismo, es objeto de protección el método para aislar microorganismos asociados a una especie liquénica de interés que comprende (reivindicación 13):

- a) recolectar un talo liquénico de la especie de la que se quieren aislar microorganismos, en condiciones de asepsia,
- b) lavar el talo; c) lleva a cabo la disrupción; d) cultivar el extracto liquénico, obtenido de la misma población (reiv. 14).

El lavado se lleva a cabo con una solución isotónica estéril durante más de 60 minutos, como la solución de Ringer, que comprende un agente surfactante (reivs. 15-18). La disrupción del talo comprende el machacado en un tampón de maceración antioxidante estéril como tampón AMB estéril (reivs. 18, 19).

El medio de cultivo mínimo comprende una o más fuentes de carbono, como glucosa y/o manitol (reivs. 21, 22) y los microorganismos asociados a la especie liquénica de interés se seleccionan de bacterias, algas, hongos filamentosos, levaduras y/o virus de microorganismos liquénicos (reivs. 22, 23). El cultivo de d) es un cultivo mínimo suplementado con el extracto liquénico y al menos con un antifúngico como la natamicina (reivs. 23, 24) o el extracto liquénico y con el microorganismo de interés (reiv. 25).

Por último, es objeto de protección el uso de un extracto liquénico y de la composición con extracto liquénico para aislar y/o cultivar microorganismos, asociados a una especie liquénica de interés, seleccionados de bacterias, algas, hongos filamentosos, levaduras y/o virus de microorganismos liquénicos, en donde la especie liquénica de interés se selecciona de *Parmotrema* spp., *Pseudevernia* spp y *Ramalina* spp. (reivs. 27-30).

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|---|-------------------|
| D01 | CARDINALE M, PUGLIA, A M, GRUBE M. Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities. FEMS Microbiol Ecol., 2006; Vol. 57, nº 3, páginas 484-495. | 2006 |
| D02 | GRUBE M. et al. Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics. The ISME Journal, 2015, Vol.9, páginas 412-424. Publicado online 29.07.2014. | 29.07.2014 |
| D03 | ES 0157264 A (ROSELL CARDUS, J. M.) | 01.03.1943 |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD**

Los documentos citados **D01** y **D02** se refieren a bacterias asociadas a líquenes en que los medios de cultivo son soluciones con CINA, así:

- **D01** divulga el aislamiento de las bacterias con solución de CINA, esterilización y trituración (página 485, Materials and Methods), y
- **D02** se refiere a la simbiosis de bacteria asociadas a líquenes y también hay una homogeneización en NaCl y filtración (página 413, Material and Methods),
- **D03** divulga medios de cultivos y aislamiento de microorganismos (página 1).

Si bien, el aislamiento de bacterias de líquenes, con solución de CINA, triturado es conocido no lo es el método para obtener un extracto líquénico que pertenezca a la misma población de la especie líquénica ni el método para aislar microorganismos asociados a una especie líquénica.

Por ello, a la vista de los documentos D01 a D03, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 30** son nuevas de acuerdo con el Artículo 6 LP 11/86.

ACTIVIDAD INVENTIVA

El método para obtener un extracto líquénico que comprende utilizar talos líquénicos lavados y sometidos a disrupción o triturado con una solución isotónica estéril, y el método de aislar microorganismos asociados a una especie líquénico no resulta evidente para el experto en la materia, puesto que en el estado de la técnica no se divulga que el talo líquénico es de la especie líquénica de la que se quieren aislar microorganismos.

Por ello, a la vista de los documentos D01 a D03, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 30** tienen actividad inventiva según el Artículo 8 LP 11/86.