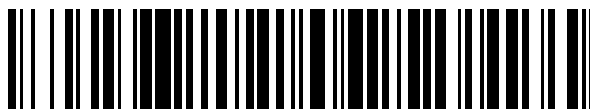


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 854**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.12.2009** **PCT/EP2009/008560**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.06.2010** **WO10063451**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2009** **E 09767961 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017** **EP 2367950**

54 Título: **Producción de ácidos grasos omega-3 por mixobacterias**

30 Prioridad:

01.12.2008 EP 08170390

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.08.2017

73 Titular/es:

UNIVERSITÄT DES SAARLANDES (100.0%)
Campus Saarbrücken
66123 Saarbrücken, DE

72 Inventor/es:

STADLER, MARC;
ROEMER, ERNST;
MÜLLER, ROLF;
GARCIA, RONALD O.;
PISTORIUS, DOMINIK y
BRACHMANN, ALEXANDER

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 629 854 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Producción de ácidos grasos omega-3 por mixobacterias

La presente invención proporciona un método para producir ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (AGPI) cultivando cepas mixobacterianas específicas adecuadas para dicho método. Además, se da a conocer un método para la identificación de tales mixobacterias que producen omega-3 usando análisis filogenéticos basados en datos de secuencia de ADNr 16S en combinación con datos fisicoquímicos basados en cromatografía de gases acoplada con espectroscopía de masas para descubrir productores adicionales de ácidos grasos poliinsaturados omega-3.

Antecedentes de la invención

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de cadena larga, incluyendo los de la familia de omega-3 [también conocidos como ácidos grasos ω -3 ("omega-3")] son ácidos grasos interesantes en su naturaleza. Son constituyentes importantes de los fosfolípidos que desempeñan un papel en disminuir la rigidez de la membrana. El ácido eicosapentaenoico (EPA) es un constituyente principal de los fosfolípidos del cerebro humano y sirve como precursor de prostaglandinas y resolvinas. Otros AGPI importantes de la familia de omega-3 es el ácido docosahexaenoico (DHA). La función cognitiva y conductual mejorada en el desarrollo de los lactantes parece estar correlacionada con altos niveles de este compuesto. Para los AGPI omega-3, y en particular para DHA y EPA, efectos beneficiosos para la salud han sido, por ejemplo, la prevención de cáncer, artritis reumatoide, enfermedades cardiovasculares, la mejora de la función inmunitaria y de la salud ocular y cerebral [para una visión general reciente, véase Teale MC (ed.) (2006) Omega-3 fatty acid research. Nova Science Publishers, Nueva York, y la bibliografía en el mismo]. Debido a estas propiedades beneficiosas, los AGPI omega-3 están usándose ampliamente como lípidos nutricionales en complementos alimenticios y para la salud y como componentes funcionales en una amplia variedad de alimentos. Los AGPI omega-3 comprenden actualmente uno de los segmentos del mercado de crecimiento mayor y más sólido en el sector industrial de la alimentación y la bebida, con una demanda sustancialmente creciente en los últimos años.

Actualmente, el aceite de pescado es la fuente natural para ácidos grasos omega-3 más abundante y ampliamente usada, pero dicha fuente se ve afectada por pesca excesiva, falta de suministro de aceite de alto grado con contenido suficiente de DHA/EPA, y problemas de calidad (retos de formulación, olor etc.). Se han establecido o están en desarrollo procedimientos alternativos que implican algas y oomicetos como organismos productores [véanse las visiones generales de Hinzpeter I *et al.* (2006) Grasas y Aceites 57:336-342 y Ward OP, Singh A (2005). Process Biochemistry 40:3627-3652, respectivamente]. Puesto que el suministro de aceite de pescado de alta calidad cada vez es más limitado, se intentó encontrar fuentes biológicas alternativas y sostenibles. Se han explorado diversos grupos de algas marinas durante más de 20 años y mientras se han introducido en el mercado algunos productos basados en biomasa de algas. También se notificó ocasionalmente que algunos oomicetos que pertenecen al grupo de los estramenópilos (un grupo de organismos eucariotas similares a algas conocidos anteriormente como "*Chromophyta*") producen los compuestos mencionados anteriormente (por ejemplo de los géneros *Achlya* y *Pythium*: [Aki T *et al.* (1998) J Ferm Bioengin 86:504-507; Cheng MH *et al.* (1999) Bioresour Technol 67:101-110; Athalye SK *et al.* (2009) J Agri Food Chem 57:2739-2744]). En otros estramenópilos (por ejemplo, los géneros *Schizochytrium* y *Thraustochytrium*; tal como se describe en los documentos US 7022512 y WO2007/068997) y en las especies de dinoflagelados *Amphidinium* (documento US 2006/0099694), el DHA puede representar hasta el 48% del contenido en ácidos grasos de las células, que es el mayor contenido conocido hasta ahora en eucariotas. Sin embargo, el cultivo de estos organismos a escala industrial todavía plantea un reto incluso tras varios años de desarrollo.

Dickschat *et al.* (Org. Biomol. Chem. 2824 - 2831 (2005)) describen que los iso-ácidos grasos se sintetizan biológicamente por algunas mixobacterias, concretamente *Stigmatella aurantiaca* y *Myxococcus xanthus*. En la información complementaria, se describe el perfil de ácidos grasos de la cepa silvestre de *Stigmatella aurantiaca* y la cepa silvestre de *Myxococcus xanthus*, y de dos mutantes con alimentación específica.

La base de datos EMBL, entrada AJ833647 da el ADNr 16S de *Byssovorax cruenta* DSM 14553.

Otras fuentes biológicas alternativas para AGPI omega-3 encontradas hasta ahora son eubacterias procariotas [Nichols D *et al.* (1999), Curr Opin Biotechnol 10:240-246; Metz JG *et al.* (2001), Science 293:290-293; Gentile G *et al.* (2003) J Appl Microbiol 95:1124-1133]. Sin embargo, la explotación comercial de estos organismos para la producción de AGPI a escala industrial está dificultada por las características de crecimiento lento de estos microorganismos psicrófilos, así como por sus rendimientos y productividad inherentemente bajos. En las mixobacterias, se encontró un AGPI no identificado con 20 átomos de carbono y cuatro dobles enlaces en primer lugar en géneros marinos de *Plesiocystis* y *Enhygromyxa* [Iizuka T *et al.* (2003) Int J Syst Evol Microbiol 53:189-195; Iizuka T. *et al.* (2003), Syst Appl Microbiol 26:189-196]. Recientemente, se encontró ARA (un AGPI omega-6) en *Phaselocystis flava*, un representante de una familia de mixobacterias novedosa [Garcia RO *et al.* (2009), Int J Syst Evol Microbiol 50(PT12):1524-1530].

No se ha notificado en absoluto la aparición de AGPI omega-3 como DHA y EPA para *Myxobacteria* y los procedimientos descritos hasta ahora son insuficientes con respecto a los rendimientos, la cantidad de AGPI y

especialmente acerca de la producción de los AGPI omega-3 importantes.

Taxonomía y filogenia mixobacterianas

Se cree que las mixobacterias han evolucionado como un grupo monofilético de organismos en el orden *Myxococcales*, un subgrupo delta en proteobacterias. En la actualidad, se reconocen 3 subórdenes (*Cystobacterineae*, *Nannocystineae* y *Sorangineae*) en las mixobacterias [Reichenbach H (2005) Orden VIII. *Myxococcales* Tchan, Pochon y Prévot 1948, 398AL. En Brenner DJ, et al. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª ed., vol. 2, parte C, págs. 1059-1072, Nueva York: Springer]. Estos subórdenes se dividen en seis familias, concretamente *Cystobacteraceae*, *Myxococcaceae*, *Nannocystaceae*, *Kofleriaceae*, *Poliangiaceae* y *Phaselicystidaceae*.

La familia *Myxococcaceae* está compuesta por los géneros *Myxococcus*, *Corallococcus* y *Pyxidicoccus*. En la familia relacionada *Cystobacteraceae*, se conocen cinco géneros (*Cystobacter*, *Archangium*, *Hyalangium*, *Melittangium* y *Stigmatella*). *Nannocystaceae* del suborden *Nannocystineae* están compuestos por los *Nannocystis* y dos géneros marinos (*Enhygromyxa* y *Plesiocystis*). Su familia relacionada *Kofleriaceae* está compuesta por el género terrestre *Kofteria* y el género marino *Heliangium*. La familia *Poliangiaceae* engloba los géneros *Jahnella*, *Chondromyces*, *Poliangium*, *Byssovorax* y *Sorangium*. Hasta ahora, estos dos últimos son los únicos géneros conocidos de degradadores de celulosa dentro del orden; la mayoría de los otros taxones son difíciles de aislar y cultivar. El género recién descubierto *Phaselicystis* es el único género de la familia recién establecida *Phaselicystidaceae* [García RO et al. (2009) *Int J Syst Evol Microbiol* 59:1524-1530]. En la actualidad, pueden reconocerse y se han descrito de manera válida 20 géneros de mixobacterias que cubren todos los aislados marinos y del suelo conocidos.

Importancia general del ADNr 16S en la taxonomía y la filogenia bacterianas.

El ADNr 16S se ha usado de manera amplia y común en la sistemática bacteriana para designar agrupaciones ancestrales de los taxones porque este gen está altamente conservado entre especies [Weisburg WG et al. (1991) *J Bacteriol* 173:697-703]. En las mixobacterias, la filogenia del ADNr 16S junto con las características morfológicas proporciona una fuerte evidencia para la clasificación genética [Spröer C et al. (1999), *Int J Syst Bacteriol* 49(PT 3):1255-1262]. Se encontró que las cepas mixobacterianas asignadas al mismo género mediante clasificación morfológica estaban estrechamente agrupadas por su filogenia génica de ADNr 16S. Este método también proporciona patrones para parentesco ancestral entre sus especies miembro que se reflejan en el grado de las características fenotípicas [Velicer GJ, Hillesland K (2008) In *Myxobacteria: Multicellularity and Differentiation* (Whitworth DE, ed.), págs. 17-40, Washington, DC:ASM Press].

Importancia de los perfiles de ácidos grasos como marcadores quimiotaxonómicos en bacterias

La filogenia se realiza según las características morfológicas y fisiológicas de las mixobacterias. Y lo que es más importante, generalmente se usan perfiles de ácidos grasos tal como se deducen de los análisis de CG-EM del contenido en ácidos grasos celular y se consideran aceptables para la segregación taxonómica de las mixobacterias, así como muchos otros grupos de organismos bacterianos, ya que se encontró que era una característica constante, al menos cuando se aplica una metodología normalizada. Las primeras aplicaciones de esta técnica se realizaron a principios de los años 1989 [Tornabene G (1985) *Methods in Microbiology* 18, 209-234]. Por tanto, tales perfiles de ácidos grasos basados en CG-EM (o CG-) se han usado ampliamente en la filogenia y la taxonomía bacterianas. No obstante, hasta ahora nunca se ha llevado a cabo un enfoque sistemático que combine tanto la búsqueda de ácidos grasos particulares que sean importantes desde el punto de vista económico en combinación con otros medios de investigación para evaluar las posiciones taxonómicas y filogenéticas de los productores de ácidos grasos respectivos.

Importancia de los métodos basados en PCR para explorar la diversidad y biodiversidad funcional de especies bacterianas en ecosistemas

Se ha debatido desde hace mucho tiempo (y mientras se ha demostrado mediante métodos de biología molecular dirigidos a la identificación *in situ* de eubacterias en muestras del entorno) que la diversidad global de las especies bacterianas existentes es mucho mayor que el número de especies conocidas y bien descritas que pueden cultivarse [Amann RI et al. (1995) *Microbiol Rev* 59:143-169; Torsvik V et al. (1990) *Appl Environ Microbiol* 56:782-787]. Según las estimaciones actuales, hasta el 90% de las bacterias existentes todavía están por descubrir. El uso de métodos tales como secuenciación directa de ADNr 16S del suelo y otras muestras del entorno está revelando cada vez más una gran diversidad de secuencias de ADN que no pueden correlacionarse con ninguna de las especies bacterianas conocidas que pueden cultivarse. Sin embargo, sus afinidades filogenéticas pueden revelarse a partir de una comparación de homología de su ADNr 16S con las de las cepas de referencia. Las técnicas metagenómicas, que están desarrollándose en la actualidad, pueden facilitar finalmente en el futuro la utilización directa de los genes y las enzimas de estos organismos "que no pueden cultivarse". En la actualidad, sigue siendo necesario en la mayoría de los casos encontrar condiciones de cultivo adecuadas para organismos bacterianos hasta ahora no explorados y explorarlos en la fase de sus cultivos puros. Como requisito previo para la caracterización de todas las bacterias no exploradas, así como para su explotación biotecnológica, es necesario

establecer técnicas de aislamiento especiales. Esto también es cierto en particular con respecto al descubrimiento de taxones mixobacterianos novedosos, así como para otros diversos grupos de eubacterias y otros grupos microbianos con gran potencial en biotecnología.

Los grupos mixobacterianos pueden investigarse específicamente mediante PCR usando cebadores específicos de ADN_r 16S. Un estudio previo en un nicho de suelo reveló al menos 30 grupos filogenéticos desconocidos adicionales de mixobacterias que pudieron detectarse usando este enfoque. No sólo eran diferentes entre sí, sino que también sus genes de ADN_r 16S diferían de las secuencias génicas de ADN_r 16S de mixobacterias conocidas existentes en GenBank y otras bases de datos de dominio público. Estos resultados sugirieron la presencia de una enorme diversidad no descubierta de mixobacterias del suelo que todavía quedan por cultivar y explorar [Zhi-Hong W. *et al.* (2005) *Env. Microbiol* 7(10): 1602-1610].

Fermentación microbiana, con énfasis particular en mixobacterias

Las cepas mixobacterianas habitualmente se fermentan en un medio nutritivo acuoso en condiciones aerobias sumergidas. Se conocen ampliamente en la ciencia diversos ejemplos para la viabilidad de la fermentación a gran escala de este grupo de organismos en escala piloto e industrial, por ejemplo, acerca del descubrimiento y el desarrollo de epotilonas, que se han aprobado recientemente como fármacos anticancerígenos.

Tras la exhaustiva evaluación de sus condiciones de crecimiento y nutritivas, esos organismos normalmente pueden hacerse crecer bien en cultivo de laboratorio y su producción puede aumentarse a escala de manera sencilla. Normalmente, los microorganismos se fermentan en un medio nutritivo que contiene una fuente de carbono y un material proteico. Las fuentes de carbono preferidas incluyen glucosa, azúcar moreno, sacarosa, glicerol, almidón, almidón de maíz, lactosa, dextrina, melazas, y similares. Las fuentes de nitrógeno preferidas incluyen harina de semilla de algodón, líquido de maceración de maíz, levadura, levadura de cerveza autolizada con sólidos de leche, harina de soja, harina de semilla de algodón, harina de maíz, sólidos de leche, digesto pancreático de caseína, sólidos de destilación, líquidos de peptona animal, trozos de carne y huesos, y similares. Pueden usarse ventajosamente combinaciones de estas fuentes de carbono y nitrógeno. No hay necesidad de añadir metales traza, por ejemplo zinc, magnesio, manganeso, cobalto, hierro y similares al medio de fermentación puesto que se usan agua corriente y componentes sin purificar como componentes del medio.

Puede inducirse fermentación a gran escala para cultivos de producción a cualquier temperatura que conduzca al crecimiento satisfactorio de los microorganismos entre aproximadamente 18° y 32°C y preferiblemente a aproximadamente 28°C. De manera ordinaria, se obtiene la producción óptima de compuestos aproximadamente en de 2 a 8 días de fermentación, y de manera preferible aproximadamente en de 4 a 5 días de fermentación.

La producción puede llevarse a cabo en frascos con agitación pero también en medios sólidos y fermentadores con agitación. Cuando el crecimiento se lleva a cabo en matraces con agitación o en grandes recipientes y tanques, es preferible usar la forma vegetativa, en lugar de la forma de esporas del microorganismo para la inoculación. Esto evita un intervalo prolongado en la producción de los compuestos de AGPI y la utilización ineficaz auxiliar del equipo. Por consiguiente, es deseable producir un inóculo vegetativo en un medio nutritivo acuoso inoculando este medio con una alícuota de un suelo o un cultivo inclinado. Cuando se ha fijado de este modo un inóculo vegetativo joven y activo, se transfiere de manera aséptica a otros frascos con agitación y otros dispositivos adecuados para la fermentación de microorganismos. El medio en que se produce el inóculo vegetativo puede ser el mismo, o diferente, del utilizado para la producción de compuestos, siempre que se obtenga el crecimiento adecuado del microorganismo.

En general, se utiliza la siembra de cepas mixobacterianas y la fermentación y la producción de compuestos en la fermentación aerobia sumergida en recipientes con agitación. La producción es independiente de los recipientes, fermentadores y procedimientos de partida usados. Los compuestos también pueden obtenerse mediante el cultivo en frasco con agitación, o en otros recipientes diseñados especialmente tales como tanques de fermentación aéreos o Biowave. Para fermentaciones de gran volumen es preferible usar un inóculo vegetativo. El inóculo vegetativo se prepara inoculando un pequeño volumen de medio de cultivo con la forma de espora o un gránulo liofilizado del organismo. El inóculo vegetativo se transfiere entonces a un recipiente de fermentación donde, tras un tiempo de incubación adecuado, se producen los compuestos con un rendimiento óptimo.

Como es obligatorio en un procedimiento de cultivo sumergido aerobio, se dispersa aire estéril a través del medio de cultivo. Para el crecimiento eficaz del organismo, el volumen del aire usado está en el intervalo de desde aproximadamente 0,25 hasta aproximadamente 0,5 vvm. Una velocidad óptima en un recipiente de 10 l es de aproximadamente 0,3 vvm con agitación proporcionada por hélices convencionales que giran a aproximadamente 240 rpm. Es necesaria la adición de una pequeña cantidad (es decir 1 ml/l) de un agente antiespumante tal como silicona a los medios de fermentaciones si la espumación plantea un problema. Para los organismos microaerófilos puede ser favorable reducir la aireación adicionalmente con el fin de soportar la producción de biomasa. La fermentación se lleva a cabo habitualmente en modo discontinuo, pero para lograr un mejor crecimiento y un rendimiento aumentado del producto, pueden llevarse a cabo fermentaciones semicontinuas suministrando la fuente nutritiva requerida a un cultivo en crecimiento una vez que se ha reducido en el medio de cultivo original.

Los productos deseados estarán presentes habitualmente sobre todo en la biomasa de las cepas mixobacterianas fermentadas, pero en caso de su sobreproducción, también pueden ubicarse en el filtrado de cultivo del caldo de fermentación. El caldo de cultivo puede separarse filtrando sobre un filtro prensa. Pueden emplearse una variedad de procedimientos para aislar y purificar los compuestos de AGPI del caldo de fermentación, por ejemplo, mediante procedimientos de adsorción cromatográfica seguidos por elución con un disolvente adecuado, cromatografía en columna, cromatografía de reparto, mediante extracción de fluido supercrítico, y combinaciones de los métodos mencionados anteriormente.

La invención proporciona un método para producir ácidos grasos insaturados omega-3 que comprende cultivar una cepa mixobacteriana que puede producir uno o más ácidos grasos insaturados omega-3,

caracterizado porque la cepa mixobacteriana se selecciona del género *Aetherobacter* que tiene células vegetativas que son bacilos cilíndricos moderadamente largos y delgados con extremos romos, con movimiento mediante deslizamiento sobre la superficie y bajo el agar, colonia de tipo película a transparente-claro que se desplaza en enjambre (*swarming*), que son negativas para rojo Congo, bordes caracterizados por células migratorias coherentes, que penetran principalmente bajo el medio sólido, agar ligeramente rebajado, siendo las mixoesporas bacilos delgados refringentes con extremos romos, más cortas que las células vegetativas y encerradas en paredes de esporangio, con cuerpos fructíferos como diminutos esporangiolos ovoides, con ácidos grasos poliinsaturados omega-3 como componentes principales de ácidos grasos celulares, que tienen un porcentaje de G+C del 68-70%, y que tienen una identidad de secuencia de ADNr 16S de al menos el 96% con respecto a SEQ ID NO: 1, a SEQ ID NO: 2 o a SEQ ID NO: 4, de *Sorangium cellulosum* DSM 14627 y de *Enhygromyxa salina* DSM 15217;

además una cepa mixobacteriana adecuada para producir ácidos grasos poliinsaturados omega-3,

caracterizada porque la cepa es del género *Aetherobacter* que tiene células vegetativas que son bacilos cilíndricos moderadamente largos y delgados con extremos romos, con movimiento mediante deslizamiento sobre la superficie y bajo el agar, colonia de tipo película a transparente-claro que se desplaza en enjambre, que son negativas para rojo Congo, bordes caracterizados por células migratorias coherentes, que penetran principalmente bajo el medio sólido, agar ligeramente rebajado, siendo las mixoesporas bacilos delgados refringentes con extremos romos, más cortas que las células vegetativas y encerradas en paredes de esporangio, con cuerpos fructíferos como diminutos esporangiolos ovoides, con ácidos grasos poliinsaturados omega-3 como componentes principales de ácidos grasos celulares, que tienen un porcentaje de G+C del 68-70%, y que tienen una identidad de secuencia de ADNr 16S de al menos el 96% con respecto a SEQ ID NO: 1, a SEQ ID NO: 2 o a SEQ ID NO: 4.

Durante la caracterización e identificación de cepas mixobacterianas desconocidas hasta ahora del suborden *Sorangineae*, que van a clasificarse todas en un género recién descubierto desconocido hasta ahora, para el que se propone aquí el nombre *Aetherobacter*, se encontró sorprendentemente producir cantidades significativas de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), en particular ácidos grasos poliinsaturados omega-3 tales como EPA y DHA. Se encontraron tres sobreproductores de EPA y DHA, que se designaron *Aetherobacter fasciculatus* sp. nov., ined., representado por la cepa DSM 21835, *Aetherobacter rufus* sp. nov. ined., representado por la cepa DSM 23122 y *Aetherobacter* sp. DSM 23098. Esta invención también se refiere al descubrimiento novedoso y sorprendente de que también se encontró que otras cepas determinadas de especies que pertenecen a la clase *Myxobacteria* (en particular, cepas de los géneros *Enhygromyxa* y *Sorangium*) producían DHA y EPA en un grado inferior. Al mismo tiempo, un examen de bacterias relacionadas filogenéticamente basado en secuencias de ADN publicadas en bases de datos públicas reveló varias bacterias "no cultivadas" como parientes más próximos de las cepas de superproducción de AGPI omega-3 recién obtenidas, que presumiblemente también son mixobacterias.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Fases de crecimiento de "*Aetherobacter fasciculatus*" DSM 21835 (a-d), "*Aetherobacter rufus*" DSM 23122 (e-h) y "*Aetherobacter* sp." DSM 23098 (i-l). Células vegetativas de fase oscura (a, e, i). Escala, 10 µm. Colonia que se desplaza en enjambre sobre agar VY/2 mostrando eliminación típica de células de levadura (b, f, j). Escala, 15 mm. Fotomicrografías de disección de cuerpos fructíferos sobre agar VY/2 (c, g, k). Escala, 300 µm. Mixoesporas ligeramente refringentes de esporangiolos destruidos (d, h, l). Escala, 10 µm.

Figura 2: Cromatogramas de CG-EM de ácidos grasos celulares de *Aetherobacter fasciculatus* DSM 21835 extraídos de muestras por triplicado de cultivo de 5 días

Figura 3: Patrón de fragmentación de DHA,

línea superior: muestra de cultivo representativa de *Aetherobacter fasciculatus* DSM 21835,

línea inferior: referencia adquirida de éster metílico de DHA

Figura 4: Patrón de fragmentación de EPA,

línea superior: muestra de cultivo representativa de *Aetherobacter fasciculatus* DSM 21835,

línea inferior: referencia adquirida de éster metílico de EPA

Figura 5: Árbol de unión al vecino más cercano (*Neighbor-joining tree*) basado en la secuencia génica del ADNr 16S mixobacteriano y que muestra la posición filogenética de las cepas que producen EPA y DHA (negrita). Los números en los puntos de bifurcación indican el nivel de soporte de remuestreo, basado en 1.000 nuevas muestras. Solo se muestran los valores mayores de 60. Escala, 0,05 sustituciones por posición de nucleótido. Leyenda *: La cepa tipo de *Sorangium cellulosum* en este árbol sólo representa la posibilidad para la producción de ácidos grasos omega-3 en el género *Sorangium*. En otras cepas de *Sorangium cellulosum* tal como se ejemplifica mediante SBS021 y SBS024 (secuencias de ADN no incluidas en este árbol), ya se había descubierto la producción de EPA, pero la propia cepa tipo estaba desprovista de producción de AGPI omega-3.

Figura 6: Árbol de unión al vecino más cercano generado a partir de NCBI-BLASTn que muestra las afinidades de las secuencias de ADNr 16S de *Aetherobacter fasciculatus*. DSM 21835 (flecha) para las 50 secuencias representativas más homólogas disponibles en GenBank a fecha de 22 de noviembre de 2009.

Descripción detallada de la invención

Se propone que las cepas mixobacterianas de la invención se clasifiquen en un género novedoso *Aetherobacter* y sus especies novedosas *A. fasciculatus*, *A. rufus* y como una especie no nombrada todavía de *Aetherobacter*. Todas ellas se aislaron de muestras de suelo y de desechos vegetales recogidas originalmente en Indonesia en 1962. Las muestras se han conservado en el Zentrum für Biodokumentation, Landsweiler-Reden, Alemania. Para el aislamiento de las mixobacterias, se procesaron las muestras de suelo/desechos vegetales usando *Escherichia coli* viva como cebo, siguiendo un método descrito anteriormente [Reichenbach H & Dworkin M (1992) *The Myxobacteria*, In *The Prokaryotes*, 2ª ed., págs. 3416-3487 (Balows A et al., eds) Nueva York: Springer].

Se aisló *Aetherobacter fasciculatus* DSM 21835 en noviembre de 2007 de una muestra de suelo que contenía fragmentos de raíces y otros materiales vegetales en descomposición. Se aisló la cepa *A. rufus* DSM 23122 en diciembre de 2007 y se aisló *Aetherobacter sp.* DSM 23098 en febrero de 2009.

Las cepas mixobacterianas anteriores pertenecen al suborden *Sorangiiineae* del orden *Myxococcales* y son representativas del género inédito novedoso *Aetherobacter* y de especies inéditas novedosas (*A. fasciculatus*, *A. rufus*, *Aetherobacter sp.*) propuestos con el presente documento, que son de aerobias a aerobias facultativas y quimioheterótrofas, que tienen secuencias de ADNr 16S tal como se muestra en SEQ ID NO: 1 (DSM 21835), SEQ ID NO: 2 (DSM 23122) y SEQ ID NO: 4 (DSM 23098) que son idénticas en aproximadamente el 96% a la de la cepa *Byssovorax* (syn. *Byssophaga*) *cruenta* DSM 14553^T (n.º de registro de GenBank AJ833647, SEQ ID NO: 3) y/o que tienen un contenido en AGPI omega-3 de al menos el 10%, preferiblemente al menos el 15% en peso del contenido en ácidos grasos celulares totales. A continuación se facilita una descripción de los taxones propuestos.

Los nombres científicos de las cepas de la invención todavía no están publicados. No hay otras cepas conocidas en la técnica del género *Aetherobacter*. Este género se describe por primera vez en esta invención. Sus relaciones filogenéticas se explican resumidamente en lo que sigue. Las características se explican resumidamente a continuación, y, en más detalle, en los ejemplos.

Myxococcales incluyen los siguientes subórdenes ejemplificados que a su vez incluyen las siguientes familias ejemplificadas, géneros ejemplificados y especies ejemplificados.

suborden	familia	género	especie (ejemplos)
----------	---------	--------	--------------------

Cystobacterineae

Cystobacteraceae

Archangium

Cystobacter

Hyalangium

Melittangium

Stigmatella

Myxococcaceae

Anaeromyxobacter

Corallococcus

Myxococcus

		<i>Pyxidiococcus</i>	
	<i>Nannocystineae</i>		
		<i>Haliangiaceae (Kofleriaceae)</i>	
		<i>Haliangium</i>	
5		<i>Nannocystaceae</i>	
		<i>Nannocystis</i>	
		<i>Plesiocystis</i>	
		<i>Enhygromyxa</i>	<i>Enhygromyxa salina</i>
	<i>Sorangiinae</i>		
10		<i>Phaselicystidaceae</i>	
		<i>Phaselicystis</i>	
		<i>Poliangiaceae</i>	
		<i>Poliangium</i>	
		<i>Jahnella</i>	
15		<i>Chondromyces</i>	
		<i>Byssovorax</i>	<i>Byssovorax cruenta</i>
		<i>Aetherobacter</i>	<i>Aetherobacter fasciculatus</i> (DSM 21835)
			<i>Aetherobacter rufus</i> (DSM 23122)
			<i>Aetherobacter sp.</i> (DSM 23098)
20		<i>Sorangium</i>	
			<i>Sorangium cellulosum</i>

Las relaciones filogenéticas tal como se deduce a partir de una comparación de datos de secuencia de ADNr 16S de géneros y especies representativos de los que existen cultivos viables, se presentan en la figura 10.

25 Las tres cepas novedosas son bastante similares morfológicamente. *Aetherobacter fasciculatus* DSM 21835 comparte casi la misma aparición de fases de crecimiento con *Aetherobacter sp.* DSM 23098, con respecto a las células vegetativas así como a los cuerpos fructíferos. *Aetherobacter rufus* DSM 23122 difiere en tener cuerpos fructíferos rojos y esporangiolos más pequeños. Además, DSM 23122 produjo un enjambre blanquecino que difiere en el color naranja amarillento de las dos cepas restantes de *Aetherobacter*.

30 Las pruebas fisiológicas también revelaron diferencias entre las cepas y especies novedosas. Obviamente, las tres cepas novedosas prefieren diferentes fuentes de azúcares y nitrógeno para crecer. La resistencia a antibióticos parece distinguir a los aislados, por ejemplo, DSM 21835 y DSM 23098 parecen resistentes a higromicina B, mientras que DSM 23122 es sensible a este compuesto. La resistencia a ampicilina y neomicina diferencia a *A. fasciculatus* DSM 23098 y *A. rufus* DSM 23122 de la cepa DSM 23098. También parece que DSM 21835 y DSM 23098 muestran un intervalo más amplio de resistencia a antibióticos en comparación con DSM 23122.

35 Las secuencias de ADNr 16S derivadas de las tres cepas novedosas se agruparon entre sí en el árbol filogenético, soportado por un valor de remuestreo del 100%. *Aetherobacter fasciculatus* DSM 21835 parece no sólo morfológicamente similar a *A. sp.* DSM 23098, sino que las secuencias de ADNr 16S también mostraron un alto grado de homología (identidad del 99,4%). Se encontró que *A. rufus* DSM 23122 era idéntica en el 98,9% a DSM 21835 y en un 99,2% a DSM 23098. Esta relación es notable en el árbol filogenético donde las secuencias de DSM 40 21835 se agrupan entre sí con DSM 23098, en lugar de con DSM 23122 (figura 10).

Descripción del género y las especies nuevos

1. *Aetherobacter* R. O. Garcia & R. Müller, gen. nov. ined.

Etimología: *Aetherobacter* [Ae.the.ro.bac'ter. Gr. masc. n. *Aeter Dios griego de la luz* (se refiere a desplazamiento en enjambre claro y transparente); Gr. fem. n. *bacter* from Gr. neut. n. *bakterium* bacilo pequeño, varilla; M.L. masc. n.

Aetherobacter bacilo que se desliza en enjambre claro]

Células vegetativas, bacilos cilíndricos moderadamente largos y delgados con extremos romos; movimiento mediante deslizamiento sobre la superficie y bajo el agar. *Enjambre*, colonia de tipo película a transparente-claro. Negativas para rojo Congo, bordes caracterizados por células migratorias coherentes, que penetran principalmente bajo el medio sólido; agar ligeramente rebajado. *Mixoesporas*, bacilos delgados refringentes con extremos romos, más cortas que las células vegetativas, encerradas en paredes de esporangio. *Cuerpos fructíferos*, como diminutos esporangiolos ovoides, habitualmente compactos o agrupados. Las levaduras están completamente degradadas. Fuertemente bacteriolíticas. Con ácidos grasos poliinsaturados omega-3 como componentes principales de AG celulares. Porcentaje de G + C, el 68,0 - 70%.

El género novedoso *Aetherobacter* es claramente diferente del género de *Myxobacteria* más aceptado similar, *Byssovorax*, en muchos aspectos. Morfológicamente, *Byssovorax* muestra un enjambre similar a pseudoplasmodios de color rojo intenso y cuerpos fructíferos en medio de agar. Estos conjuntos independientes de células que migran se consideran muy característicos de este género. Los esporangiolos son grandes (60-180 µm de ancho) y también muestran colores rojo intensos. En cambio, la especie del género novedoso *Aetherobacter* tal como se representa por las cepas descritas en detalle adicionalmente a continuación produce un patrón de desplazamiento en enjambre que penetra profundamente en el agar. El enjambre creado por las células cadoras de *Aetherobacter* spp. muestra bien un aspecto radial (circular). Además, las células que se desplazan en enjambre muestran colores de blanco a naranja claro. El centro de las colonias en todas estas cepas novedosas habitualmente son claros en agar de levadura (VY/2). El único esporangio es pequeño (< 20 µm) y está dispuesto en agrupaciones o haces estrechamente empaquetados que a menudo están ubicados dentro del agar.

Otra diferencia significativa entre *Aetherobacter* spp. y *Byssovorax* es la incapacidad de los miembros del nuevo género para degradar celulosa. Ambos géneros también difieren significativamente en sus perfiles de ácidos grasos. *Byssovorax* contiene una mayor cantidad de iso-ácidos grasos 15:0 y de cadena lineal y está desprovisto de DHA y EPA.

La característica genética de una similitud del 96% del ADNr 16S también se usó para los géneros mixobacterianos surgidos recientemente *Enhygromyxa* [Iizuka T. et al. (2003) Syst Appl Microbiol 26:189-196] y *Byssovorax* [Reichenbach et al., 2006. Int J Syst Evol Microbiol. 56(Pt 10): 2357-2363].

Basándose en los datos mencionados anteriormente, las cepas novedosas de *Aetherobacter* parecen significativamente diferentes de las del género conocido *Byssovorax*, es decir el género mixobacteriano que parece relacionado más estrechamente tal como se deduce a partir de una comparación de homología de su ADNr 16S. Consideradas juntas, estas diferencias en la morfología, la quimiofisiología, la topología del gen de ADNr 16S y el análisis filogenético sugieren conjuntamente que está justificada la aparición de un nuevo género.

2. *Aetherobacter fasciculatus* R. O. Garcia & R. Müller, sp. nov. ined.

Etimología: *fasciculatus* [fasc.i.cu'la. L. masc. n. *fasciculum* pequeños haces o paquetes (se refiere a la disposición de los esporangiolos)].

Con todas las características del género. *Células vegetativas*, bacilos gruesos, 1,2-1,3 x 2,9-5,7 µm de tamaño, y fase oscura. Los *enjambres* son de matiz naranja que muestran eliminación completa del cebo de células de levadura, con depresión de poca profundidad sobre la superficie del agar, que penetran a menudo profundamente en el medio para formar estructuras coherentes de tipo cortina. Los *cuerpos fructíferos* son de color amarillo-naranja, encontrados a menudo bajo el agar, como soros (30 x 50 µm) compuestos por 5-20 diminutos esporangiolos (10,4 x 11,4 µm) dispuestos estrechamente como un racimo. *Mixoesporas* refringentes, bacilos gruesos, con extremos redondeados similares pero más cortos (1,0-1,2 x 3,2-4,0 µm) que las células vegetativas; encerradas en una pared de esporangio. Degradador de levaduras, bacteriolítico de tipo nutricional. No degrada celulosa ni quitina. Buen crecimiento en sacarosa, fructosa, D-manosa y L-arabinosa. Resistentes a un amplio espectro de antibióticos: gentamicina, apramicina, tobramicina, estreptomycin, ampicilina, neomicina e higromicina B. Sensibles a kanamicina, espectinomycin, tetraciclina, oxitetraciclina, carbenicilina y rifampicina. Los componentes principales de ácidos grasos celulares son C_{22:6} (ácido docosahexaenoico, DHA) iso-C_{15:0}, C_{20:5}. (ácido eicosapentaenoico, EPA). El porcentaje en moles de G + C es de 68,9.

Cepa tipo: Se depositó *Aetherobacter fasciculatus* según el tratado de Budapest en el DMSZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7 B, 38124 Braunschweig, Alemania el 27 de agosto de 2008 con el número de depósito DSM 21835.

A. fasciculatus DSM 21835 tiene una secuencia de ADNr 16S que es idéntica en el 96% a la de *Byssovorax* (syn: *Byssophaga*) *cruenta* DSM 14553^T. Muestra un contenido en AGPI omega-3 de al menos el 10%, preferiblemente al menos el 15% en peso del contenido en ácidos grasos celular total.

Se identificó *A. fasciculatus* DSM 21835 como miembro de la clase *Myxobacteria*, orden *Myxococcales* al mostrar desplazamiento en enjambre característico de células vegetativas Gram negativas, con forma de bacilos delgados,

formación de cuerpos fructíferos y actividad bacteriolítica. La cepa es de aerobia a aerobia facultativa, quimioheterótrofa y también muestra resistencia a diversos antibióticos.

Los ácidos grasos principales son C_{22:6} (ácido docosahexaenoico), iso-C_{15:0}, anti-iso-C_{17:0} y C_{20:5} (ácido eicosapentaenoico). El contenido en G + C del ADN genómico es del 68,9% en moles. La secuencia de ADNr 16S muestra una identidad del 96% con *Byssovorax cruenta* que degrada celulosa y del 95% con *Sorangium cellulosum*. Esto muestra claramente que la cepa pertenece al suborden *Sorangineae* del orden *Myxococcales*. Además, la singularidad en las fases morfológicas de crecimiento y el perfil novedoso de ácidos grasos, implica claramente que DSM 21835 pertenece a un nuevo taxón que se clasifica de manera propuesta como que pertenece al género novedoso *Aetherobacter* y en la especie novedosa *A. fasciculatus*.

10 3. *Aetherobacter rufus* R. O. Garcia & R. Müller, sp. nov. ined.

Etimología: *rufus* (ru.fus. L. masc. adj. *rufus* rojo). Con todas las características del género. *Células vegetativas*, bacilos gruesos, 1·0-1·2 x 3·0-6,0 µm de tamaño, el más largo 15 µm, fase oscura. En agar de levadura, el *enjambre* se mueve de manera coherente en el medio para formar una estructura en anillo o circular, con color de borde blanco. Las colonias en (agar VY/2) aparecen claras y transparentes como resultado de degradación de levaduras completa. Sobre la superficie del agar, a menudo se producen como una lámina o película delgada con cúmulos de agregados celulares hacia el borde de la colonia, mostrando depresiones de agar de poca profundidad. *Cuerpos fructíferos* que muestran color de rojo a bermellón, que aparecen como un único cúmulo (120 x 140 µm), o como rollos muy largos (340 x 400 µm - 1900 x 2900 µm), visibles a simple vista, que se desarrollan inicialmente a partir de montículos blancos de agregación celular. Compuestos por diminutos esporangiolos (6-12 mµ), compactados en un soro (14 x 15 µm - 16 x 26 µm). *Mixoesporas* refringentes, bacilos gruesos y cortos (1,0-2,0 µm), con extremos redondeados como las células vegetativas; encerradas en la pared de esporangio. Tipo nutricional bacteriolítico. No degrada celulosa ni quitina. Igualmente buen crecimiento en todos los azúcares sometidos a prueba: L-arabinosa, fructosa, galactosa, D-glucosa, D-manosa, melazas, sorbitol, xilosa, celobiosa, lactosa, maltosa, sacarosa y almidón soluble. Resistentes a ampicilina, neomicina y gentamicina. Sensibles a apramicina, tobramicina, kanamicina, espectinomicina, higromicina B, ampicilina, tetraciclina, oxitetraciclina, estreptomycin, carbenicilina y rifampicina, los componentes principales de ácidos grasos celulares son iso-C_{15:0}, C_{22:6} (DHA), C_{15:0}, C_{16:0}. También produce C_{20:5} (EPA). El porcentaje en moles de G + C es de 68,0.

Cepa tipo: Se depositó *Aetherobacter rufus* en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Alemania, el 25 del 11 de 2009 con el número de depósito DSM 23122.

30 También se encontró que *A. rufus* cepa DSM 23122 producía EPA y DHA. Morfológicamente esta cepa comparte muchas similitudes con *A. fasciculatus* cepa DSM 21835. Sin embargo, las dos especies difieren en varias características fisiológicas tales como las sensibilidades a antibióticos, la necesidad de carbono, la tolerancia al pH y en la secuencia de ADNr 16S. En el análisis de ácidos grasos omega-3, *A. rufus* DSM 23122 también produce tanto DHA como EPA.

35 4. *Aetherobacter* sp. DSM 23098

También se encontró que *Aetherobacter* sp. DSM 23098 estaba relacionado con las cepas mencionadas anteriormente y que contenía AGPI omega-3 en cantidades sustanciales en su biomasa celular. Esta cepa también se depositó por tanto según el tratado de Budapest en el DSMZ, el 12 del 11 de 2009 con el número de depósito DSM 23098.

40 Las expresiones generales, dentro de la presente divulgación, tienen preferiblemente los significados siguientes o mencionados anteriormente, donde en cada realización, más de una o todas las expresiones más generales pueden reemplazarse, independientemente entre sí, por las definiciones más específicas, formando así realizaciones preferidas de la invención, respectivamente.

Preferiblemente, se usan las abreviaturas siguientes para el fin de la invención:

Abreviatura	Explicación
ADNr 16S	Gen que codifica para una parte de la subunidad ribosómica pequeña en procariotas
ARA	Ácido araquidónico
BD	Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Francia
DHA	Ácido docosahexaenoico [ácido (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoico]
DSM	Número de designación de cepas depositadas en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético
EPA	Ácido eicosapentaenoico [ácido (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosa- 5,8,11,14,17-pentaenoico]
AG	Ácidos grasos
EMAG	Éster metílico de ácido graso
CG	Cromatografía de gases

CG-EM		Cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas
HEPES		Ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil)-etanosulfónico
EM		Espectrometría de masas
MSTFA		N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
Ácidos omega-3	grasos	(También ácidos grasos n-3) Familia de ácidos grasos insaturados que tienen en común un doble enlace carbono-carbono en la posición n-3 (el tercer enlace contado desde el grupo metilo terminal del ácido graso)
Ácidos omega-6	grasos	(También ácidos grasos n-6) Familia de ácidos grasos insaturados que tienen en común un doble enlace carbono-carbono en la posición n-6 (el sexto enlace contado desde el grupo metilo terminal del ácido graso)
PCR		Reacción en cadena de la polimerasa
AGPI		Ácido graso poliinsaturado
Vvm		Volumen de aire por volumen de medio de cultivo por minuto

Preferiblemente, las mixobacterias se clasifican científicamente en reino: bacterias, filo: *Proteobacteria*, clase: *Delta Proteobacteria*, orden: *Myxococcales*.

Para el fin de la invención, los términos “mixobacterias” y “cepa mixobacteriana” se refieren preferiblemente a cualquier especie u otros miembros de microorganismos que pertenecen al orden de *Myxococcales*.

- 5 El término usado “miembros” se usa preferiblemente para cualquier cepa mixobacteriana de la invención que se define como un vecino homólogo de *Aethrobacter*.

Para el fin de la invención, todas las relaciones taxonómicas usadas son según Brenner DJ, *et al.* (eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2ª ed., Nueva York: Springer, especialmente los métodos de la invención se refieren a este criterio.

- 10 Para el fin de la invención, la afinidad genética se describe con el término de “homología”. Esto se basa en el uso de secuencias de ADNr 16S para una comparación binaria de una secuencia de FASTA (identificada por su número de registro tal como se explica resumidamente en la tabla 1) frente al ADNr 16S respectivo de una cepa especificada de la presente invención usando el algoritmo BLASTn 2.2.22 de url <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> que se describe adicionalmente en Zhang Z *et al.* (2000) J Comput Biol 7:203-214.

- 15 Un “ácido graso poliinsaturado omega-3 (AGPI)” según la presente invención incluye ácido eicosa-*cis*-5,8,11,14,17-pentaenoico (EPA 20:5) y ácido docosa-*cis*-4,7,10,13,16,19-hexaenoico (DHA 22:6). El método del primer aspecto de la invención es particularmente útil para la producción de EPA y DHA y mezclas de dichos ácidos grasos.

La invención se refiere a la producción de ácidos grasos insaturados omega-3 que comprende cultivar una cepa mixobacteriana que puede producir uno o más ácidos grasos poliinsaturados omega-3.

- 20 Preferiblemente, se considera que una cepa mixobacteriana “que puede” producir AGPI omega-3 contiene al menos el 0,5% de AGPI omega-3 determinado tal como se describe en el ejemplo 5, más preferiblemente que contiene al menos el 1%, todavía más preferiblemente que contiene al menos el 2%, aún más preferiblemente que contiene al menos el 5%, lo más preferiblemente que contiene al menos el 10% y en particular que contiene al menos el 15% en peso del contenido en ácidos grasos celulares totales.

- 25 Una realización preferida de la invención se refiere a un método, en el que la cepa mixobacteriana pertenece al suborden *Sorangineae* del orden *Myxococcales*.

En una realización preferida, la cepa mixobacteriana tiene una secuencia de ADNr 16S que es idéntica en al menos el 92% o el 93%, preferiblemente en al menos el 94%, el 95%, el 96% a *Byssovorax* (*Byssophaga*) *cruenta* DSM 14553^T.

- 30 Una realización preferida de la invención se refiere a un método, en el que la cepa mixobacteriana pertenece al suborden *Poliangiaceae* del orden *Myxococcales*.

En una realización preferida, la cepa mixobacteriana tiene una secuencia de ADNr 16S que es idéntica en al menos el 92% o el 93%, preferiblemente en al menos el 94%, el 95%, el 96% a *Byssovorax* (*Byssophaga*) *cruenta* cepa DSM 14553^T.

- 35 Una realización preferida de la invención se refiere a un método, en el que la cepa mixobacteriana tiene un contenido en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de al menos el 10%, preferiblemente al menos el 15% en peso del contenido en ácidos grasos celulares totales.

En una realización preferida adicional, los ácidos grasos insaturados omega-3 se seleccionan de ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y mezclas de los mismos.

- 40 En una realización preferida de métodos adicionales de la invención, dicho cultivo incluye una incubación de cultivo de siembra de dicha cepa mixobacteriana y un cultivo principal posterior para la producción de AGPI omega-3. Se

prefiere que el cultivo de siembra se realice en un medio de agar VY/2 (medio de levadura), lo más preferiblemente en un agar MD1G. Además, se prefiere que el cultivo se realice a una temperatura de 25 a 32°C, preferiblemente a aproximadamente 30°C.

- 5 En otra realización preferida de métodos adicionales de la invención, el cultivo para la producción de AGPI omega-3 se realiza en un medio líquido. En particular, se prefiere que el cultivo se realice en caldo MD1G. De nuevo, el cultivo se realiza preferiblemente a una temperatura de 25 a 32°C, preferiblemente a aproximadamente 30°C. Otro modo preferido de cultivo se realiza en el mismo medio con pH ajustado a 7,0, en medio con alto volumen, para reducir el aire.

En otra realización preferida de los métodos de la invención, el método comprende además

- 10 (i) aislar dicho uno o más AGPI omega-3 del cultivo; y/o
(ii) purificar dicho uno o más AGPI omega-3; y/o
(iii) aislar un AGPI omega-3 individual.

- 15 En una realización preferida adicional, la cepa mixobacteriana pertenece al suborden *Sorangineae* del orden *Myxococcales* y es representativa de un género novedoso (*Aetherobacter*) y una especie novedosa (*fasciculatus*) propuestos con el presente documento, que son de aerobias a aerobias facultativa y quimioheterótrofas, que tienen una secuencia de ADNr 16S que es idéntica en aproximadamente el 96% a *Byssovorax* (*Byssophaga*) *cruenta* DSM 14553^T tal como se muestra en SEQ ID NO: 3 y/o que tienen un contenido en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de al menos el 10%, preferiblemente al menos el 15% en peso del contenido en ácidos grasos celulares totales.

- 20 En una realización preferida, la cepa mixobacteriana tiene una secuencia de ADNr 16S que es idéntica en al menos el 96%, el 96,5% o el 97%, más preferiblemente en al menos el 97,5%, el 98% o el 98,5%, lo más preferiblemente en al menos el 99,0%, el 99,2%, el 99,4%, el 99,6% o el 99,8% a la secuencia de ADNr 16S mostrada en SEQ ID NO: 1. En una realización particularmente preferida, la cepa mixobacteriana es *Aetherobacter fasciculatus* (DSM 21835) y se caracteriza por la secuencia de ADNr 16S mostrada en SEQ ID NO: 1.

- 25 En una realización preferida, la cepa mixobacteriana tiene una secuencia de ADNr 16S que es idéntica en al menos el 96%, el 96,5% o el 97%, más preferiblemente en al menos el 97,5%, el 98% o el 98,5%, lo más preferiblemente en al menos el 99,0%, el 99,2%, el 99,4%, el 99,6% o el 99,8% a la secuencia de ADNr 16S mostrada en SEQ ID NO: 2. En una realización particularmente preferida, la cepa mixobacteriana es *Aetherobacter rufus* (DSM 23122) y se caracteriza por la secuencia de ADNr 16S mostrada en SEQ ID NO: 2.

- 30 En una realización preferida, la cepa mixobacteriana tiene una secuencia de ADNr 16S que es idéntica en al menos el 96%, el 96,5% o el 97%, más preferiblemente en al menos el 97,5%, el 98% o el 98,5%, lo más preferiblemente en al menos el 99,0%, el 99,2%, el 99,4%, el 99,6% o el 99,8% a la secuencia de ADNr 16S mostrada en SEQ ID NO: 4. En una realización particularmente preferida, la cepa mixobacteriana es *Aetherobacter sp.* (DSM 23098) y se caracteriza por la secuencia de ADNr 16S mostrada en SEQ ID NO: 4.

- 35 La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. El experto reconoce que los procedimientos usados en los ejemplos pueden adaptarse al fin de identificar cepas mixobacterianas individuales adicionales que pueden producir AGPI omega-3. Por ejemplo, pueden emplearse otros métodos cromatográficos conocidos y otros métodos espectrométricos de masas conocidos que difieren de los métodos ejemplificados que se describen a continuación en el presente documento.

Procedimientos experimentales generales

40 Materiales y métodos

Lista de medios usados en el cultivo de mixobacterias

CY-SWS

Casitona Bacto (BD, Le Pont de Claix, Francia)

1 g

Extracto de levadura Bacto (BD, Le Pont de Claix, Francia)

0,3 g

- 45 Disolución de sales de agua marina (SWS) (véase a continuación)

añadir 1 l

Disolución de sales de agua marina (SWS)

Citrato férrico

0,01 g

MgSO₄ x 7 H₂O (Merck, Darmstadt)

8 g

CaCl₂ x 2 H₂O (Sigma-Aldrich, Seelze, Alemania)

1 g

- 50 KCl

0,5 g

NaHCO₃

0,16 g

H₃BO₃

0,02 g

KBr

0,08 g

SrCl₂ x 6H₂O

0,03 g

	Disolución de elementos traza SL-4 (véase a continuación)	1 ml
	Agua destilada	añadir 1 l
	Disolución de elementos traza SL-4	
	EDTA	0,5 g
5	FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,2 g
	Disolución de elementos traza SL-6 (véase a continuación)	100 ml
	Agua destilada	900 ml
	Disolución de elementos traza SL-6	
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,1 g
10	MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,03 g
	H ₃ BO ₃	0,30 g
	CuCl ₂ x 2H ₂ O	0,01 g
	NiCl ₂ x 6H ₂ O	0,02 g
	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,03 g
15	Agua destilada	añadir 1 l
	Medio HS	
	MgSO ₄ x 7H ₂ O (Merck, Darmstadt, Alemania)	0,1% (p/v)
	KNO ₃ (Sigma Aldrich, Seelze, Alemania)	0,1% (p/v)
	Peptona Bacto (BD, Le Pont de Claix, Francia)	0,15% (p/v)
20	Base TRIZMA (Sigma Aldrich, Seelze, Alemania)	0,2% (p/v)
	NaFe-EDTA (Merck, Darmstadt, Alemania)	8 mg/l
	Agua destilada	añadir 1 l
	Ajustar pH a 7,2	
	Complementar tras esterilizar en autoclave con lo siguiente:	
25	K ₂ HPO ₄ (Merck, Darmstadt, Alemania)	0,00625% (p/v)
	Glucosa (Merck, Darmstadt, Alemania)	0,4% (p/v)
	CaCl ₂ x 2H ₂ O (Merck, Darmstadt, Alemania)	0,0075% (p/v)
	Agua destilada	añadir 1 l
	Medio soluble M	
30	Fitona Bacto (BD, Le Pont de Claix, Francia)	10 g
	Maltosa monohidratada (Merck, Darmstadt)	10 g
	CaCl ₂ x 2H ₂ O (Sigma-Aldrich, Seelze, Alemania)	1 g
	MgSO ₄ x 7H ₂ O (Merck, Darmstadt)	1 g
	Ácido etilendiaminatetraacético, sal de hierro (III)-sodio	8 mg
35	(Fluka, Buchs, Suiza)	
	HEPES (Serva, Heidelberg)	12 g/k
	Agua destilada	añadir 1 l
	Medio líquido MD1	
	Casitona Bacto (BD, Le Pont de Claix, Francia)	0,3% (p/v)
40	CaCl ₂ x 2H ₂ O (Sigma-Aldrich, Seelze, Alemania)	0,05% (p/v)
	MgSO ₄ x 7H ₂ O (Merck, Darmstadt)	0,2% (p/v)
	Ajustar pH a 7,0 con KOH	
	Medio líquido MD1G	
	Casitona Bacto (BD, Le Pont de Claix, Francia)	0,3% (p/v)
45	CaCl ₂ x 2H ₂ O (Sigma-Aldrich, Seelze, Alemania)	0,05% (p/v)
	MgSO ₄ x 7H ₂ O (Merck, Darmstadt)	0,2% (p/v)
	Glucosa (Acros Organics, Geel, Bélgica)	0,35% (p/v)
	Ajustar pH a 7,0 con KOH	
	Medio líquido VY/2	
50	Levadura de panadería ("Frischbackhefe", Núremberg, Alemania)	0,5% (p/v)
	CaCl ₂ x 2H ₂ O (Sigma-Aldrich, Seelze, Alemania)	0,05% (p/v)
	HEPES (Serva, Heidelberg)	5 mM
	Ajustar pH a 7,0 con KOH	
	Maltosa VY/2	
55	Levadura de panadería ("Frischbackhefe", Núremberg, Alemania)	0,5% (p/v)
	CaCl ₂ x 2H ₂ O (Sigma-Aldrich, Seelze, Alemania)	0,05% (p/v)
	Maltosa monohidratada (Merck, Darmstadt)	0,3% (p/v)
	HEPES (Serva, Heidelberg)	5 mM

	VY/2-SWS	
	NaCl	20 g
	Levadura de panadería ("Frischbackhefe", Núremberg, Alemania) (peso húmedo)	2,5 g
5	Agar Bacto (BD, Le Pont de Claix, Francia)	15 g
	Disolución de sales de agua marina (véase a continuación)	1 l
	Ajustar pH a 7,5 con NaOH 1 M	
	Medio LB	
	Tryptona Bacto (BD, Le Pont de Claix, Francia)	10 g
10	Extracto de levadura Bacto (BD, Le Pont de Claix, Francia)	5 g
	NaCl (Difco)	5 g
	Agua destilada	añadir 1 l
	Ajustar pH a 7,0 con disolución de KOH	
	Medio de agar VY/2	
15	Levadura de panadería ("Frischbackhefe", Núremberg, Alemania)	0,5% (p/v)
	CaCl ₂ x 2H ₂ O (Sigma-Aldrich, Seelze, Alemania)	0,05% (p/v)
	HEPES (Serva, Heidelberg)	5 mM
	Agar (Difco)	1,5% (p/v)
	Ajustar pH a 7,0 con KOH	
20	Medio de agar MD1G	
	Casitona Bacto (Difco)	0,3% (p/v)
	CaCl ₂ x 2H ₂ O (Sigma-Aldrich, Seelze, Alemania)	0,05% (p/v)
	MgSO ₄ x 7H ₂ O (Merck, Darmstadt)	0,2% (p/v)
	Glucosa (Acros Organics, Geel, Bélgica)	0,35% (p/v)
25	Agar (Difco)	1,5% (p/v)
	Ajustar pH a 7,2 con KOH	
	Agar agua tamponado	
	CaCl ₂ x 2H ₂ O (Sigma-Aldrich, Seelze, Alemania)	0,1% (p/v)
30	Agar Bacto	1,5% (p/v)
	HEPES	20 mM
	pH ajustado a 7,0 con disolución de KOH	
	Agar de sales minerales (agar ST21)	
	Disolución A	
	K ₂ HPO ₄	0,1% (p/v)
35	Extracto de levadura Bacto	0,002% (p/v)
	Agar Bacto	1% (p/v)
	Preparar en aproximadamente dos tercios del volumen de agua en agua destilada.	
	Disolución B	
	KNO ₃	0,1% (p/v)
40	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,1% (p/v)
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,1% (p/v)
	FeCl ₃	0,02% (p/v)
	MnSO ₄ x 7H ₂ O	0,01% (p/v)
	Preparar en el volumen de agua restante. Esterilizar en autoclave por separado. Combinar las disoluciones A y B.	
45	Agar CT 7	
	<i>Capa de agar superior</i>	
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,1 % (p/v)
	K ₂ HPO ₄	0,02% (p/v)
	Quitina (Sigma)	0,05% (v/v)
50	Agar Bacto	1,5% (p/v)
	Ajustar el pH a 7,5 con KOH, entonces verter como una capa fina encima del agar de base tras esterilizar en autoclave.	
	Capa de agar de base	
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,1% (p/v)
55	Agar Bacto	1,5% (p/v)
	HEPES	5 mM
	Ajustar el pH a 7,2 y esterilizar en autoclave	
	Agar Cel3	
	Polvo de celulosa MN300	0,5% (p/v)

[Macherey and Nagel (Düren, Alemania)]

KNO₃

0,1% (p/v)

Agar Bacto

1,0% (p/v)

Ajustar el pH a 7,2.

- 5 Esterilizar en autoclave por separado el KNO₃, y añadir al medio una vez que el medio se ha enfriado hasta aproximadamente 50°C. Verter como una capa fina encima del agar de sales minerales (Agar ST21).

Cepas de referencia

Se usaron varias cepas como referencias para el trabajo realizado en los ejemplos 5 y 6, y se han recuperado los datos de secuencia de ADN de referencia para la comparación a partir de bases de datos públicas tales como GenBank (una base de datos proporcionada por el National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información Biotecnológica); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y/o bases de datos respectivas generadas por el EMBL (European Molecular Biology Laboratory (Laboratorio Europeo de Biología Molecular), <http://www.embl.de/>) todas ellas se enumeran en la tabla 1. Siempre que fue posible, se citaron publicaciones en las que se hace referencia a estas secuencias, y los datos de la secuencia no se representan en el presente documento.

- 15 Tabla 1: Datos de secuencia de ADN de referencia usados para la comparación con las cepas mixobacterianas novedosas de *Aetherobacter spp.* descritas en esta solicitud de patente.

Número de registro	Especies/cepas de mixobacterias	Bibliografía de referencia
GU207872	<i>Archangium gephyra</i> DSM 2261 ¹	Este estudio
AJ833647	<i>Byssovorax cruenta</i> DSM 14553 ¹	Reichenbach H. <i>et al.</i> (2006), Int J Syst Evol Microbiol. 56(PT 10): 2357-2363
AJ233938	<i>Chondromyces apiculatus</i> DSM14605 ^T	Spröer C. <i>et al.</i> (1999), Int J Syst Bacteriol. 49(PT 3):1255-1262
GU207874	<i>Chondromyces crocatus</i> DSM14714 ^T	Este estudio
AJ233939	<i>Chondromyces lanuginosus</i> DSM 14631 ¹	Spröer C. <i>et al.</i> (1999), Int J Syst Bacteriol. 49(PT 3):1255-1262
GU207875	<i>Chondromyces pediculatus</i> DSM 14607 ^T	Este estudio
AJ233942	<i>Chondromyces robustus</i> DSM 14608 ¹	Spröer C. <i>et al.</i> (1999), Int J Syst Bacteriol. 49(PT 3):1255-1262
DQ768120	<i>Corallococcus coralloides</i> DSM 2259 ^T	Park S. <i>et al.</i> (2006), presentación directa
AJ811598	<i>Corallococcus exiguus</i> DSM 14696 ¹	Swiderski J., presentación directa
AJ233921	<i>Corallococcus macrosporus</i> DSM 14697 ^T	Spröer C. <i>et al.</i> (1999), Int J Syst Bacteriol. 49(PT 3):1255-1262
DQ768107	<i>Cystobacter armeniacus</i> DSM 14710 ¹	Park S. <i>et al.</i> (2006), presentación directa
DQ768108	<i>Cystobacter badius</i> DSM 14723 ¹	Park S. <i>et al.</i> (2006), presentación directa
GU207873	<i>Cystobacter disciformis</i> DSM52716 ^T	Este estudio
NR 025343	<i>Cystobacter ferrugineus</i> DSM 14716 ¹	Spröer C. <i>et al.</i> (2008), presentación directa
DQ768109	<i>Cystobacter fuscus</i> DSM 2262 ¹	Park S. <i>et al.</i> (2006), presentación directa
DQ768110	<i>Cystobacter gracilis</i> DSM 14753 ¹	Park S. <i>et al.</i> (2006), presentación directa
DQ768111	<i>Cystobacter miniatus</i> DSM 14712 ¹	Park S. <i>et al.</i> (2006), presentación directa
DQ768113	<i>Cystobacter minus</i> DSM 147511 ¹	Park S. <i>et al.</i> (2006), presentación directa
DQ768115	<i>Cystobacter velatus</i> DSM 14718 ¹	Park S. <i>et al.</i> (2006), presentación directa
DQ768114	<i>Cystobacter violaceus</i> DSM 14727 ^T	Park S. <i>et al.</i> , (2006), presentación directa
NR 024807	<i>Enhygromyxa salina</i> DSM 15217 ¹	Iizuka T. <i>et al.</i> (2003), Syst Appl Microbiol 26:189-196
NR 027522	<i>Haliangium ochraceum</i> DSM 14365 ¹	Iizuka T. <i>et al.</i> (1998). FEMS Microbiol Lett 169:317-322
NR 024781	<i>Haliangium tepidum</i> DSM 14436 ¹	Fudou R. <i>et al.</i> (2002), J Gen Appl Microbiol 48:109-115
AJ233949	<i>Hyalangium minutum</i> DSM 14724 ¹	Spröer C. <i>et al.</i> (1999), Int J Syst Bacteriol. 49(PT 3):1255-1262
GU207876	<i>Jahnella thaxteri</i> DSM 14626 ¹	Este estudio
AJ233944	<i>Koffleria flava</i> DSM 14601 ¹	Spröer C. <i>et al.</i> (1999), Int J Syst Bacteriol. 49(PT 3):1255-1262

AJ233907	<i>Melittangium alboraceum</i> Me b7 ¹	Spröer C. <i>et al.</i> (1999), Int J Syst Bacteriol. 49(PT 3):1255-1262
AJ233908	<i>Melittangium boletus</i> DSM 14713 ¹	Spröer C. <i>et al.</i> (1999) Int J Syst Bacteriol. 49(PT 3):1255-1262
GU207877	<i>Melittangium lichenicola</i> DSM 2275 ¹	Este estudio
DQ768117	<i>Myxococcus fulvus</i> DSM 16525 ¹	Park S. <i>et al.</i> (2006), presentación directa
DQ768118	<i>Myxococcus stipitatus</i> DSM 14675 ¹	Park S. <i>et al.</i> (2006), presentación directa
DQ768119	<i>Myxococcus virescens</i> DSM 2260 ¹	Park S. <i>et al.</i> (2006), presentación directa
DQ768116	<i>Myxococcus xanthus</i> DSM 16526 ¹	Park S. <i>et al.</i> (2006), presentación directa
AJ233945	<i>Nannocystis aggregans</i> DSM14639 ¹	Spröer C. <i>et al.</i> (1999), Int J Syst Bacteriol. 49(PT 3):1255-1262
AJ233946	<i>Nannocystis exedens</i> DSM 71 ¹	Spröer C. <i>et al.</i> (1999), Int J Syst Bacteriol. 49(PT 3):1255-1262
GU207878	<i>Nannocystis pusilla</i> DSM 14622 ¹	Este estudio
EU545827	<i>Phaselicystis flava</i> DSM21295 ¹	Garcia R.O. <i>et al.</i> (2009), Int J Syst Evol Microbiol. 59(PT12): 1524-1530
NR 024795	<i>Plesiocystis pacifica</i> DSM 14875 ¹	Iizuka T <i>et al.</i> (2003), Int J Syst Evol Microbiol. 53, 189-195
GU207879	<i>Poliangium fumosum</i> DSM14668 ¹	Este estudio
GU207880	<i>Poliangium solediatum</i> DSM 14670 ¹	Este estudio
GU207881	<i>Poliangium spumosum</i> DSM 14734 ¹	Este estudio
AJ233909	<i>Pyxidicoccus fallax</i> DSM 14698 ¹	Spröer C. <i>et al.</i> (1999), Int J Syst Bacteriol. 49(PT 3):1255-1262
FJ457641	<i>Sorangium cellulosum</i> DSM 14627 ¹	Youn J. <i>et al.</i> (2008), presentación directa
EU240498	<i>Sorangium nigrum</i> DSM14731 ¹	Jiang, D.M. <i>et al.</i> (2008), Int J Syst Evol Microbiol. 58 (PT 11): 2654-2659
GU207882	<i>Stigmatella aurantiaca</i> DSM 17044 ¹	Este estudio
AJ970180	<i>Stigmatella erecta</i> DSM 16858 ¹	Spröer C. <i>et al.</i> (1999), Int J Syst Bacteriol. 49(PT 3):1255-1262
DQ768129	<i>Stigmatella hybrida</i> DSM 14722 ¹	Park S. <i>et al.</i> (2006), presentación directa

Producción de AGPI omega-3, especialmente DHA, EPA: Se rasparon células que se desplazaban en enjambre activamente de agar MD1G de una placa de agar con buen crecimiento y se inocularon en un frasco de 100 ml que contenía 20 ml de caldo MD1G. Se incubó este cultivo en un agitador rotatorio durante 7 días a 160 rpm y 30°C como cultivo de siembra. Se introdujo una alícuota de 2 ml tomada del cultivo de siembra en tres frascos de 250 ml que contenían 50 ml de medio MD1G líquido (es decir, el medio de producción para el análisis de ácidos grasos). Se agitaron los frascos durante diez días a la misma velocidad y temperatura que los del cultivo de siembra. Se tomaron alícuotas de 2 ml que contenían principalmente células aglutinantes de cada frasco tras cinco y 10 días de incubación. Entonces se calcularon los pesos celulares en húmedo y en seco.

Extracción de los ácidos grasos celulares: Se extrajeron los ácidos grasos celulares usando el método de EMAG [Bode HB *et al.* (2006) J. Bacteriol 188:6524-6528; Ring MW *et al.* (2006), J Biol Chem 281:36691-36700 (2006)]. Se analizaron alícuotas (5 µl) de los extractos mediante CG-EM.

Identificación de ácidos grasos celulares incluyendo EPA y DHA: Se identificaron los ácidos grasos celulares incluyendo los AGPI omega-3 (EPA y DHA) basándose en los patrones de fragmentación y en el tiempo de retención. Se compararon estos ácidos grasos (AG) con el patrón de referencia de mezcla de EMAG (Sigma-Aldrich) que contiene 37 ésteres metílicos de ácidos grasos. Se confirmó la presencia de DHA y EPA usando patrones de referencia de Sigma-Aldrich (*cis*-4,7,10,13,16,19-DHA, *cis*- 5,8,11,14,17-EPA)

Quantificación de EPA y DHA:

Se llevó a cabo CG-EM en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N con un detector selectivo de masas de impacto electrónico 5973 y un inyector 7683B (Agilent, Waldbronn, Alemania) usando una columna capilar con dimetil-(fenil al 5%)-polisiloxano (Agilent HP-5ms, 0,25 mm por 30 m por 0,25 m) y helio como gas portador a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Se inyectaron muestras en modo fraccionado (razón de fraccionamiento, 10:1). Se mantuvo la temperatura de la columna a 130°C durante 2,5 min, se aumentó hasta 240°C a una velocidad de 5°C/min, y entonces se incrementó hasta 300°C a 30°C/min y se mantuvo a 300°C durante 5 min. Otras temperaturas fueron tal como sigue: entrada, 275°C; línea de transferencia de CG-EM, 280°C; fuente de iones, 230°C; y cuadrupolo, 150°C. Se hizo funcionar el detector selectivo de masas en modo de exploración, explorando el intervalo de masa desde

m/z 40 hasta 500. Se llevó a cabo el análisis de los datos con el software AMDIS, versión 2.64 (NIST, Gaithersburg, MD, EE.UU.), usando el valor "señal integrada" para la cuantificación. Se calcularon las cantidades en porcentajes en relación con la suma de integrales de los ésteres metílicos de ácido graso totales.

- 5 Se estimaron DHA y EPA basándose en la cantidad presente (el 2% o 0,2 µg/µl cada uno, respectivamente) en la mezcla de EMAG de referencia. Se tomó una alícuota de 5 µl de la mezcla de referencia y se mezcló con 95 µl de cloroformo para dar un volumen final de 100 µl. De esta mezcla, se inyectó una alícuota en la columna para el análisis mediante CG-EM tal como se especificó anteriormente.

- 10 Primero se determinaron DHA y EPA en la mezcla de EMAG mediante análisis de patrón de fragmentación y tiempo de retención. Entonces se calcularon estas áreas de pico usando el área de señal integrada que representa la cantidad presente en los patrones.

Una vez analizados los extractos de ácidos grasos celulares en la CG-EM, se midieron los picos correspondientes a DHA y EPA usando la señal integrada que representa la cantidad presente en la muestra (intervalo de tiempo de retención: EPA 17,5 - 18,5 min., DHA 20,5 - 21,5 min)

- 15 Se calcularon las cantidades de DHA y EPA tomando el promedio de la señal integrada de muestra dividida entre la señal integrada patrón. Entonces se multiplicó por la concentración del ácido graso patrón y el volumen total del extracto de ácidos grasos, véase la fórmula siguiente:

SIP

AGP x ----- x VTEAG = masa de AGPI deseados

SI

- 20 AGP = Concentración de AG patrón [masa por volumen]

SIP = Señal integrada promedio de la muestra

SI = Señal integrada del patrón

VTEAG = volumen total de extracto de AG [volumen]

- 25 Finalmente se obtuvieron los porcentajes totales de AGPI omega-3 poliinsaturados a partir de la suma de EPA y DHA promedio. Se determinó el porcentaje de ácidos grasos celulares a partir del promedio de muestras por triplicado.

Mantenimiento de cepas: Se cultivaron de manera rutinaria todas las cepas mixobacterianas que producían AGPI omega-3 y se mantuvieron en agar VY/2, donde se encontró que crecían bastante. Se llevó a cabo conservación a largo plazo en glicerol al 10% bajo nitrógeno líquido.

- 30 Observaciones morfológicas: Se observaron colonias que se desplazaban en enjambre y cuerpos fructíferos bajo un microscopio estereoscópico Olympus (Hamburgo, Alemania) SH-ILLB y se fotografiaron usando una cámara Axiocam MRC (Zeiss, Göttingen, Alemania). También se analizaron los cuerpos fructíferos usando un microscopio fluorescente de barrido láser (Zeiss). Se estudió la morfología de las células vegetativas y las mixoesporas usando un microscopio de contraste de fases (Zeiss). También se observaron todas las fases de crecimiento sobre agar VY/2.

- 35 Pruebas fisiológicas: Se determinaron las reacciones de las células vegetativas a las tinciones de Gram y rojo Congo; la tinción con este último se realizó según el método de McCurdy, H. D., Can. J. Microbiol. 15:1453-1461 (1969). Se sometió a prueba la actividad catalasa con H₂O₂ al 3%. Se realizó degradación de celulosa en agar VY/2 y ST21, todo recubierto con papel de filtro (2 x 1 cm), y en prueba paralela en agar Cel-3 [Reichenbach H. & Dworkin M (1992) The Myxobacteria, In The Prokaryotes. 2ª ed., págs. 3416-3487 (Balows A *et al.*, eds.) Nueva York: Springer] para determinar la degradación del polvo de celulosa. Se realizó el ensayo de degradación para quitina tal como se describe por Reichenbach H *et al.* (2006) Int J Syst Evol Microbiol 56:2357-2363.

- 40 Pruebas de depredación microbiana: Se realizó inoculación local durante la noche de cultivos de la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* (aproximadamente 10 mm de diámetro) en agar agua y se secaron al aire antes de la inoculación de las muestras del entorno. Se sellaron las placas de cultivo con Parafilm y se incubaron a 30°C durante 1 semana. La eliminación de los cebos alimenticios microbianos indicó la acción lítica por la expansión de las colonias mixobacterianas.

- 50 Respuestas de crecimiento a la temperatura, el pH, las fuentes de carbono y nitrógeno y los antibióticos: También se realizaron pruebas para determinar las respuestas de crecimiento a diferentes niveles de temperatura y resistencia a antibióticos en agar VY/2. Los inóculos de células vegetativas procedían del enjambre que crecía activamente tomado del mismo medio. Los antibióticos usados fueron apramicina (Fluka, Buchs, Suiza), ampicilina, kanamicina, higromicina B (Roth, Karlsruhe, Alemania), tobramicina (Sigma-Aldrich), espectinomycin (Serva, Heidelberg,

Alemania), tetraciclina, oxitetraciclina, estreptomycin (todos de Synopharm, Barsbüttel, Alemania), carbenicilina, neomicina, rifampicina y gentamicina (Applichem, Darmstadt, Alemania), todos esterilizados mediante filtración y se añadieron tras enfriamiento (50°C) del medio esterilizado en autoclave.

Se analizó la utilización de compuestos nitrogenados en agar agua complementado con 10 mM de ácido L-aspartico, ácido L-glutámico, urea, KNO₃, y (NH₄)₂SO₄. También se sometió a prueba en el mismo medio a una concentración del 0,3% el casaminoácido (BD) y diferentes fuentes de peptona [triptona, casitona, peptona, neopeptona, fitona (BD)].

Se determinó la utilización de fuente de carbono en agar agua complementado con HEPES 5 mM. Se ajustó el pH final antes de esterilizar en autoclave a 7,0 usando KOH. Se complementaron fructosa, D-manosa, sacarosa, L-arabinosa, D-glucosa, D-galactosa, sorbitol, celobiosa, almidón soluble, melazas, maltosa, xilosa y sorbitol a una concentración del 0,35% cada uno.

Contenido en G + C y análisis de ADNr 16S: Se extrajo ADN genómico de células que crecían activamente usando el protocolo para bacterias Gram negativas del kit de purificación de ADN genómico de Qiagen. Se determinó el contenido en G + C del ADN de las bacterias novedosas mediante HPLC [Li G *et al.* (2003) Bio Techniques 34:908-909 (2003); Shimelis O & Giese R (2006) J. Chrom. 1117:132-136]. El análisis de ADNr 16S se realizó según García RO *et al.* (2009) Int J Syst Evol Microbiol 50(PT12):1524-1530. Las secuencias de ADNr 16S obtenidas también se compararon con el banco de datos de nucleótido-nucleótido NCBI-BLAST. Este servicio lo facilita el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) ubicado en la Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU. 8600, Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 EE.UU. como Basic Local Alignment Search Tool (herramienta de búsqueda de alineamientos locales básicos) (BLAST). En particular, se buscó en la base de datos de nucleótidos (BLASTn).

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de ácidos grasos por las cepas de la invención

Aetherobacter fasciculatus DSM 21835, *Aetherobacter rufus* DSM 23122 y *Aetherobacter sp.* DSM 23098

A. Producción de AGPI omega-3 (DHA, EPA): A partir de células que se desplazaban en enjambre activamente sobre la superficie del cultivo en agar MD1G, *Aetherobacter fasciculatus* DSM 21835, *A. rufus* DSM 23122 y *Aetherobacter sp.* DSM 23098 crecieron como aglutinaciones en medio de cultivo líquido MD1G. Este estado hizo imposible cuantificar las células mediante densidad óptica. Las células recogidas el quinto día de cultivo con agitación mostraron color amarillento que se revelaron al microscopio como bacilos delgados largos (células vegetativas). Al décimo día de crecimiento, las células se volvieron rojas, que tras el examen microscópico revelaron estructuras, que presumiblemente representaban cuerpos fructíferos (figura 1a). Contenían paredes circundantes (esporangiolos) que contenían esporas en su interior y mostraban similitud con los cuerpos fructíferos encontrados sobre la superficie del agar (figura 1b). Las células vegetativas parecían responsables de la masa amarillenta y se convertían presumiblemente en esporas tras 10 días de incubación. Este acontecimiento sólo se observó en *A. fasciculatus* DSM 21835.

Ambas cepas crecían bien si se inoculaban en frascos de 1 l que contenían 750 ml de MD1G que se inoculó con 50 ml de cultivo de siembra, pero se producían gránulos de células más aglutinantes, y las células no se convertían en cuerpos fructíferos incluso tras 10 o más días de incubación.

La observación del mejor crecimiento en medio con alto volumen refleja presumiblemente la naturaleza de ambas cepas para cavar bajo el agar lo que sugiere que podría requerirse una menor demanda de aire para el crecimiento. Además, la débil reacción de catalasa observada también apoyaría esta hipótesis. El análisis de estos datos implicó que todas las cepas de *Aetherobacter* son potencialmente microaerófilas o aerobias facultativas. Esta información básica parece importante en el cultivo de la cepa y por consiguiente para el análisis de la producción de AGPI.

Las tablas 2-7 muestran las mediciones del peso de las células por triplicado de *Aetherobacter fasciculatus* DSM 21835, *A. rufus* DSM 23122 y *Aetherobacter sp.* DSM 23098 tomadas tras 5 y 10 días de cultivo, respectivamente, en frascos con agitación con MD1G. Se midieron los picos de DHA y EPA a partir de muestras por triplicado usando la señal integrada.

Tabla 2: Producción de EPA y DHA en *Aetherobacter fasciculatus* DSM 21835 tal como se determina mediante CG-EM

Incubación	5 días				10 días				
Repetición	Peso celular (mg)		Señal integrada		Peso celular (mg)		Señal integrada		
	Peso en húmedo (2 ml)	Peso en seco	EPA	DHA	Peso en húmedo (2 ml)	Peso en seco	EPA	DHA	
1	12,60	1,15	1814856	4576438	6,75	1,05	779905	956110	
2	8,50	1,00	2143276	6005853	8,35	1,35	104431	79625	
3	4,75	1,15	1013666	2686956	6,85	0,90	1870499	1833352	
Promedio	8:62	1,10	1657266	4423082,33	7,32	1,10	918278,33	956362,33	
Producción en 5 días (µg)			10.96	25.13	Producción en 10 días (µg)			6.07	5.43

Tabla 3: Producción de EPA y DHA en *Aetherobacter rufus* DSM 23122

Incubación	5 días				10 días				
Repetición	Peso celular (mg)		Señal integrada		Peso celular (mg)		Señal integrada		
	Peso en húmedo (2 ml)	Peso en seco	EPA	DHA	Peso en húmedo (2 ml)	Peso en seco	EPA	DHA	
1	8,85	8,60	81834	307959	9,75	9,60	50035	72329	
2	9,85	9,55	120330	254265	10,00	9,65	86108	122422	
3	11,5	11,10	48063	148092	8,85	8,50	89127	167611	
Promedio	10,06	9,75	83409	236772	9,53	9,25	75090	120787	
Producción en 5 días (µg)			0,55	1,35	Producción en 10 días (µg)			0,50	0,69

Tabla 4: Producción de EPA y DHA en *Aetherobacter sp.* DSM 23098

Incubación	5 días				10 días				
Repetición	Peso celular (mg)		Señal integrada		Peso celular (mg)		Señal integrada		
	Peso en húmedo (2 ml)	Peso en seco	EPA	DHA	Peso en húmedo (2 ml)	Peso en seco	EPA	DHA	
1	91,70	5,20	1523968	1168505	52,30	4,20	817217	681803	
2	75,53	4,00	9551819	8726014	39,10	3,30	858006	786250	
3	116,4	7,90	1729513	1571913,7	44,40	4,30	856852	847829	
Promedio	94,54	5,7	4268433	3822144	45,27	3,93	844025	771961	
Producción en 5 días (µg)			40.34	43.41	Producción en 10 días (µg)			7.98	8.77

La figura 2 muestra el cromatograma de CG-EM del extracto que contiene ácidos grasos tomado tras 5 días de fermentación en medio MD1G. Las cepas DSM 23122 y DSM 23098 tuvieron rendimientos comparables, pero cantidades ligeramente menores de DHA y EPA (véanse las tablas 3 y 4).

B. Identificación de ácidos grasos celulares incluyendo EPA y DHA: La figura 2 muestra el cromatograma de CG-EM de ácidos grasos celulares de *A. fasciculatus* DSM 21835. En las tablas 5 - 7 se presentan los porcentajes correspondientes de los ácidos grasos extraídos de los días de incubaciones 5º y 10º.

Tabla 5: Porcentajes de ácidos grasos celulares de *Aetherobacter fasciculatus* DSM 21835

Ácidos grasos	Promedio de muestras por triplicado tras 5 días	Promedio de muestras por triplicado tras 10 días
iso13:0	0,07	0,31
13:00	0,04	0,16
iso14:0	0,49	1,21
14:00	0,21	0,13
iso15:0	16,44	21,62
iso15:0	0,01	0,56
isómero 15:1	0,20	0,13
15:00	5,23	5,64
iso16:0	5,93	5,38
16:1w5c	2,94	2,26
16:00	3,93	2,50
iso17:1w5c	0,19	0,14
iso17:0	6,80	8,74
aiso17:0	8,32	2,99
16:0 9,10CH2	0,42	0,39
17:00	3,95	6,32
iso18:0	0,08	0,06
18:00	0,61	0,27
16:0 2OH	0,75	0,09
Desconocido	0,58	0,16
iso17:0 2OH	0,56	0,09
17:1 2OH	0,55	0,27
17:0 2OH	2,58	1,21
Isómero 17:0 2OH	2,71	3,19
ARA	0,64	0,42
20:5 (EPA)	6,99	8,35
22:6 (DHA)	18,90	8,64
AGPI desconocido	0,26	0,08
Desconocido 3	1,68	2,66
OAG	3,67	8,56
OAG	0,46	0,26

ES 2 629 854 T3

OAG	0,99	1,10
OAG	zaps	2,66
OAG	1,11	3,48
Total	100,00	100,00

Tabla 6: Porcentajes de ácidos grasos celulares de *Aetherobacter rufus* DSM 23122

Ácidos grasos	Promedio de muestras por triplicado tras 5 días	Promedio de muestras por triplicado tras 10 días
iso13:0	0,08	n.d.
13:00	0,20	n.d.
iso14:0	0,13	0,07
14:00	1,23	0,71
iso15:0	23,90	21,34
aiso15:0	0,30	n.d.
isómero 15:1	0,19	n.d.
15:00	8,88	4,21
iso16:0	1,76	2,10
16:1w5c	5,19	5,36
16:00	8,65	6,83
iso17:0	3,12	2,48
16:0 9,10CH2	0,13	n.d.
17:00	3,64	3,85
18:00	7,04	10,44
16:0 2OH	0,36	0,23
desconocido	0,67	1,39
iso17:0 2OH	0,07	n.d.
17:1 2OH potencial	4,08	12,39
17:1 2OH	0,18	0,30
17:0 2OH	2,61	2,31
Desconocido 2	1,28	0,91
20:5 (EPA)	3,95	5,59
22:6 (DHA)	14,96	8,70
Desconocido 3	3,31	5,14
OAG i15:0	1,64	1,48
OAG desconocido	2,47	4,16
Total	100,00	100,00

Tabla 7: Porcentajes de ácidos grasos celulares de *Aetherobacter sp* cepa DSM 23098.

Ácidos grasos	Promedio de muestras por triplicado tras 5 días	Promedio de muestras por triplicado tras 10 días
iso13:0	0,08	0,06
13:00	0,08	0,08
14:00	0,20	0,29
Iso-15:0	23,17	21,69
Isómero 2 15:1	0,17	n.d.
15:00 ME	1,86	1,17
DMA iso-15:0	9,40	11,81
16:1w5c	2,82	1,08
16:00	2,14	3,10
Iso-17:1w5c	0,10	n.d.
Iso-17:0	2,05	2,14
16:0 9,10-CH2	0,42	n.d.
17:0	1,31	1,14
18:3	0,09	n.d.
18:0	1,43	2,60
16:0 2-OH	0,51	0,43
Iso-17:0 2-OH	0,35	0,46
17:1 2-OH	0,84	1,68
17:1 2-OH	12,94	22,95
20:4w6,9,12,15 todo cis	1,47	0,90
20:5w3,6,9,12,15 todo cis	10,90	5,62
22:6w3,6,9,12,15,18 todo cis	9,49	5,12

OAG iso-15:0	1,81	1,85
OAG 15:0	10,21	10,17
OAG 16:1	4,86	4,23
OAG 16:0	1,85	1,41
Total	100,00	100,00

Los ácidos grasos celulares se identificaron tal como se describió anteriormente en el capítulo general métodos y materiales.

El patrón de fragmentación de las muestras reveló la identidad de las unidades de masa para los éteres metílicos patrón de DHA y EPA tal como se explica resumidamente a modo de ejemplo en la figuras 3 y 4 para la cepa *A. fasciculatus* DSM 21835.

C. Extracción y cuantificación de los ácidos grasos celulares: Tal como se presenta en las tablas 2-7 las tres cepas contienen al menos el 15% de AGPI total (EPA y DHA tomados juntos) de la masa celular seca. La mayor cantidad observada fue de más del 25%. Los datos indican además que la producción óptima se alcanzará durante el periodo de 10 días.

Ejemplo 2: Identificación de la cepa *A. fasciculatus* DSM 21835

Se aisló la cepa DSM 21835 en noviembre de 2007 de una muestra de suelo de Indonesia que contenía fragmentos de raíces y otros materiales vegetales en descomposición. La cepa se descubrió porque formaba cuerpos fructíferos de color naranja amarillento que crecían en cebos bacterianos sobre la superficie de agar agua tamponado. Las observaciones morfológicas bajo el microscopio de disección revelaron agrupaciones de esporangios empaquetados formando soros. La inoculación del material de cuerpos fructíferos lavado en agar VY/2 recién preparado condujo a la producción de un enjambre fino y delicado que migraba de manera coherente sobre la superficie y la parte interior del agar. Una serie de transferencias repetitivas del material que se desplazaba en enjambre condujo al aislamiento de la cepa pura.

Características morfológicas y de cultivo:

Enjambre: Sobre agar VY/2, las colonias bacterianas o enjambres normalmente se extienden produciendo un aspecto de tipo cortina (figura 1b). Las densidades celulares son mayores en el borde del enjambre. Las células migratorias se mueven de manera coherente mientras que al mismo tiempo se produce la eliminación de las células de levadura. Las células también pueden extenderse de manera coherente sobre la superficie del agar y muestran degradación de poca profundidad. En agar agua cebado con *Escherichia coli* vivas, la colonia en enjambre se extiende escasamente sobre la superficie del agar para producir venas que irradian largas y finas. En agar MD1, las bacterias apenas se extienden sobre la superficie y habitualmente tienden a crecer intensamente especialmente en el sitio de inoculación. Normalmente se forma una colonia de color crema amarillento en este medio con depresiones de agar características. Sobre este agar aparece una arquitectura de enjambre fina y de tipo película.

Células vegetativas: Las células vegetativas en cúmulos inclinados son bacilos largos y delgados, que miden 1,2-1,3 x 2,9-5,7 μm (figura 1a), con extremos redondeados tal como es típico para el suborden *Sorangineae*. Están presentes gránulos como puntos oscuros en los extremos polares de las células, que son claramente visibles bajo el microscopio de contraste de fases. Se produce movilidad mediante deslizamiento bajo y sobre la superficie del agar. Las células vegetativas se agregan para producir pigmentos amarillentos durante las fermentaciones en frasco con agitación en medio MD1G.

Cuerpos fructíferos: Sobre agar VY/2, los cuerpos fructíferos están compuestos por esporangios que se empaquetan en haces o soros que se disponen con frecuencia en una agrupación o forma encadenada (figura 1c). Normalmente se desarrollan tras 2 semanas de incubación. Los cuerpos fructíferos se producen con frecuencia en el borde del enjambre y bajo el agar. En ocasiones durante el desarrollo de los cuerpos fructíferos, se observa un pigmento amarillo que puede difundir. Los esporangios son de forma esférica a ovalada y miden 10,4 x 11,4 μm . Un soro típico mide 30 x 50 μm y contiene 5 - 20 esporangios diminutos. A menudo se observa una baba clara, brillante y transparente que rodea a los cuerpos fructíferos sobre la superficie del agar VY/2.

Mixoesporas: Los esporangios destruidos liberan células de bacilo estrechamente empaquetadas y ópticamente refringentes que presumiblemente son mixoesporas (figura 1d). Estas son más cortas y casi tan anchas como las células vegetativas (1,0-1,2 x 3,2-4,0 μm), y con extremos más o menos redondeados.

Características fisiológicas

Propiedades de tinción, degradación y líticas: Las células vegetativas son Gram negativas y positivas para catalasa. La colonia en enjambre sigue sin teñirse con rojo Congo, como es típico para *Sorangineae*. El cebo alimenticio bacteriano vivo (*E. coli*) en agar agua se degrada completamente y se elimina tras 6 días de incubación a temperatura ambiente, lo que sugiere propiedades fuertemente bacteriolíticas. La cepa no puede degradar celulosa en agar Cel-3 y agar ST21 recubierto con papel de filtro, y tampoco se degrada el polvo de quitina en agar CT-7. Se

observa con frecuencia la degradación de agar en cultivos crecidos en agar VY/2 y MD1.

Respuestas de crecimiento a la temperatura y el pH. En agar de levadura, se observa crecimiento óptimo a incubación a 30°C, pero todavía se logra buen crecimiento a 18°C en el mismo agar. No se produce crecimiento a 37°C. En el mismo medio, la cepa puede crecer en el intervalo de pH 5 - 9 siendo evidente el mayor diámetro de enjambre a pH 7,0. Sin embargo, no se encuentra evidencia de crecimiento a pH por debajo de 4,0 y por encima de pH 10.

Utilización de fuentes de carbono. La mejor fuente de carbono para apoyar el crecimiento de la cepa es la lactosa. También se observa buen crecimiento en melazas, maltosa y xilosa; crecimiento moderado en sacarosa, fructosa, D-manosa, L-arabinosa, galactosa, sorbitol, manosa y glucosa. Celobiosa y escaso crecimiento en almidón soluble. Pudieron observarse cuerpos fructíferos en presencia de azúcares monosacáridos (por ejemplo glucosa, manosa) y sorbitol.

Utilización de fuentes de nitrógeno. El diámetro de colonia en enjambre más grande se logra con ácido glutámico, nitrato de potasio y ácido aspártico. La urea y el sulfato de amonio sólo permiten un escaso crecimiento, dando como resultado enjambres bastante finos y dispersos. Entre las fuentes de nitrógeno complejas, las más adecuadas son casitona, peptona y neopeptona; triptona y fitona todavía muestran buen crecimiento, pero la cepa sólo crece escasamente en casaminoácidos.

Resistencia a antibióticos: La cepa es sensible a kanamicina, espectinomina, tetraciclina, oxitetraciclina, carbenicilina y rifampicina. Se observa resistencia a gentamicina, apramicina, tobramicina, estreptomina, ampicilina, neomicina e higromicina B.

Análisis del % en moles de G + C. El contenido en G + C del ADN es del 68,9% en moles

Ejemplo 3: Identificación de *Aethrobacter rufus* cepa DSM23122

Se aisló la cepa mixobacteriana DSM23122 en noviembre de 2007 de una muestra de suelo de Indonesia que contenía fragmentos de raíces y otros materiales vegetales en descomposición. La muestra se había recogido originalmente en 1962 y se conservaba en el Zentrum für Biodokumentation, Landsweiler-Reden, Alemania. Se procesó el suelo para el aislamiento usando métodos de cebado convencionales [Reichenbach H & Dworkin M (1992) *The Myxobacteria*, In *The Prokaryotes*, 2ª ed., págs. 3416-3487 (Balows A *et al.*, eds) Nueva York: Springer]. La cepa se detectó por el color rojizo de sus cuerpos fructíferos sobre la superficie del papel de filtro en agar de sales minerales [Shimkets *et al.*, 2006. *The myxobacteria*. In *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*, 3ª ed., vol. 7, págs. 31-115 (Dworkin M *et al.*, eds) Nueva York: Springer]. La inoculación de los cuerpos fructíferos sobre el mismo medio recién preparado dio como resultado el aspecto de un enjambre fino y delicado que migraba de manera coherente sobre la superficie del agar. Se aisló la cepa para su purificación tras la transferencia repetitiva del material que se desplazaba en enjambre sobre nuevos medios de cultivo.

Características morfológicas y de cultivo:

Enjambre. Sobre medio VY/2 sólido (figura 1f) las colonias bacterianas o enjambres normalmente se extienden sobre la superficie y bajo el agar. Se observan densidades celulares mayores en el borde del enjambre, visible como una banda blanca. Las células migratorias se mueven de manera coherente mientras que se produce la eliminación de las células de levadura esterilizadas en autoclave. El desplazamiento en enjambre sobre la superficie del agar muestra degradación de poca profundidad. En agar agua cebado con *E. coli* vivas, el enjambre se extiende de manera fina y transparente, produciendo en ocasiones venas que irradian largas y finas. Tras el contacto con el cebo, se produce una arquitectura de borde en enjambre de tipo onda o reborde. Las bacterias de cebo se degradan completamente tras 2-3 días de incubación.

Células vegetativas. Las células vegetativas (figura 1e) son bacilos largos, delgados que miden 1·1-1·2 x 3·0-7·0 µm, con extremos redondeados como es típico para el suborden *Sorangineae*. Están presentes gránulos como puntos oscuros en los extremos polares de las células, tal como se revela mediante microscopía de contraste de fases. Se logra movilidad mediante deslizamiento sobre la superficie del agar y bajo el agar. Los gránulos de células vegetativas continúan siendo blanquecinos en medio MD1 líquido.

Cuerpos fructíferos. Se observaron cuerpos fructíferos completamente desarrollados tras dos semanas de incubación. En agar VY/2 y agua, los cuerpos fructíferos (figura 1g) están compuestos por una masa rojiza que mide 375 x 650 µm - 425 x 1400 µm que habitualmente son visibles a simple vista. Bajo el microscopio de campo brillante y de contraste de fases, se reveló que estas masas estaban compuestas por esporangiolos diminutos y compactos. Normalmente, comienzan a desarrollarse como una agregación blanca de células vegetativas tras una semana de incubación. Normalmente, los cuerpos fructíferos se ubican sobre la superficie del agar, con frecuencia en el borde del enjambre, pero en ocasiones tiene lugar fructificación bajo el agar, dando como resultado estructuras morfológicamente similares. Un único esporangio (4·0 x 7·0 µm) mide casi el doble de longitud que una única célula vegetativa de *Cystobacteraceae*.

Mixoesporas. Los esporangiolos destruidos liberan células de bacilo estrechamente empaquetadas y ópticamente

refringentes de manera ligera que presumiblemente son mixoesporas (figura 1h). Estas son cortas y casi tan anchas como las células vegetativas (1,0 x 2,0 µm - 1,1 x 3,0 µm), y con extremos redondeados.

Características fisiológicas

5 Propiedades de tinción y líticas. La colonia en enjambre sigue sin teñirse con rojo Congo, como es típico para *Sorangineae*; las células vegetativas son Gram negativas y positivas para catalasa. La cepa difiere de los géneros relacionados por su incapacidad para degradar polvo de celulosa sobre Cel-3 y papel de filtro sobre agar ST21. Tampoco se degrada el polvo de quitina sobre agar CT-7. Se observa con frecuencia degradación de agar parcial en agar VY/2 y MD1.

10 Respuestas de crecimiento a la temperatura y el pH. En agar de levadura, se observa crecimiento óptimo a incubación a 30°C, pero todavía se logra buen crecimiento a 18°C en el mismo agar. No se produce crecimiento a 37°C. En el mismo medio, se observa crecimiento en el intervalo de pH 5 – 8, siendo óptimo a pH 7,0. No se encuentra evidencia de crecimiento a pH 4,0 y por debajo y a pH 9,0 y por encima.

Utilización de fuentes de carbono. Todas las fuentes de carbono sometidas a prueba se utilizaron igualmente.

15 Utilización de fuentes de nitrógeno. El diámetro de colonia en enjambre más grande se logra con ácido glutámico, ácido aspártico, sulfato de amonio y nitrato de potasio, mientras que la cepa crece escasamente en urea. Entre las fuentes de nitrógeno complejas, la casitona muestra crecimiento óptimo; mostrando todavía peptona, neopeptona y triptona buen crecimiento, la fitona sólo muestra escaso crecimiento, y no se observa crecimiento en absoluto con casaminoácidos.

20 Resistencia a antibióticos. La cepa es resistente a gentamicina, ampicilina y neomicina. Se observó sensibilidad a apramicina, tobramicina, kanamicina, espectinomina, higromicina B, tetraciclina, oxitetraciclina, estreptomina, carbenicilina y rifamicina.

Análisis del % en moles de G + C. El contenido en G + C del ADN es del 68,0% en moles

Ejemplo 4: Identificación de *Aethrobacter* sp. cepa DSM 23098

25 Se aisló la cepa DSM 23098 en febrero de 2009 de una muestra de suelo de Indonesia. La muestra se había recogido originalmente en 1962 y se conservaba en el Zentrum für Biodokumentation, Landsweiler-Reden, Alemania. Se procesó el suelo para el aislamiento usando cebo vivo de *Escherichia coli* según el método descrito [Shimkets *et al.*, 2006. The myxobacteria. In The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria, 3ª ed., vol. 7, págs. 31-115 (Dworkin M *et al.*, eds) Nueva York: Springer]. La bacteria se reconoció por su colonia casi transparente que forma enjambres independientes sobre la superficie del agar y se aisló para su purificación mediante transferencia repetitiva sobre nuevos medios de cultivo.

Características morfológicas y de cultivo:

35 Enjambre. En agar de levadura (VY/2), las colonias (figura 1k) se extienden de manera casi transparente entre el centro del enjambre. Aparece un anillo entre los bordes de colonias que han crecido bien. La colonia en anillo creciente es más evidente a concentración de agar inferior (por ejemplo 8 – 10 g/l de agar), y habitualmente muestra un color naranja alrededor de los bordes. La incubación bajo la luz puede producir una pigmentación más fuerte y conduce a un color naranja más oscuro del enjambre. Las células migratorias se mueven de manera coherente al mismo tiempo que lisan las células de levadura esterilizadas en autoclave, dando como resultado la eliminación de parcial a total del medio de agar. El desplazamiento en enjambre sobre la superficie del agar de levadura muestra depresiones de poca profundidad; sin embargo estas también pueden llegar a ser más profundas a concentración de agar reducida. En agar agua cebada con *E. coli* vivas, los enjambres se extienden de manera fina y casi transparente. Los bordes normalmente muestran patrones de tipo onda sobre la superficie del agar. En ocasiones también se observan ondulaciones cortas y finas sobre la superficie del agar. Tras el contacto con bacterias extrañas, se produce una arquitectura de la colonia de tipo onda u ondulación, como en la mayoría de las mixobacterias bacteriolíticas. Las células vegetativas habitualmente mueren tras alcanzar el borde del cultivo en placa de agar, tal como se observa con frecuencia en las mixobacterias. En condiciones de inanición y desfavorables, las células migratorias o el enjambre experimentan desarrollo de cuerpos fructíferos.

40 Células vegetativas. Las células vegetativas (figura 1i) son bacilos largos, delgados y de fase oscura, que miden 1,1-1,2 x 3,0-11,0 µm (pero la mayoría sólo 6-7 µm de largo) con extremos redondeados tal como se encuentra normalmente en el suborden *Sorangineae*. La movilidad se produce mediante deslizamiento sobre la superficie y dentro del agar. Cuando se hacen crecer en medio de cultivo líquido, se produce un color de amarillo a naranja claro del gránulo de células vegetativas, similar a sobre la superficie del agar durante la formación de cúmulos del desarrollo de cuerpos fructíferos.

50 Cuerpos fructíferos. En agar VY/2, los cuerpos fructíferos (figura 1l) están compuestos por esporangiolos que habitualmente son visibles como puntos naranjas, ubicados normalmente dentro del agar. En ocasiones, se observa una baba transparente que rodea los cuerpos fructíferos sobre la superficie del agar, similar a *A. fasciculatus*. El

desarrollo de cuerpos fructíferos comienza a partir de una masa agregada de células vegetativas que aparecen como bultos de amarillo a naranja claro. Los esporangiolos están compuestos por haces que miden 30 x 37 μm - 125 x 67,5 μm . Estos haces contienen 3-9 esporangiolos de ovalados a esféricos de 8 x 7 - 17 x. 15 μm de tamaño.

- 5 Mixoesporas: Los esporangiolos destruidos liberan células de bacilo estrechamente empaquetadas y ópticamente refringentes de manera ligera que presumiblemente son mixoesporas (figura 1m). Estas son ligeramente más cortas y casi tan anchas como las de las células vegetativas (1,0 - 1,2 μm x 3,0 - 5,0 μm), y con extremos redondeados. Esta característica coincide con el suborden *Sorangineae*.

Características fisiológicas

- 10 Propiedades de tinción y líticas: Las células vegetativas son Gram negativas y positivas para catalasa. La colonia en enjambre sigue sin tefirse con rojo Congo, como en otros *Sorangineae*. La cepa difiere de géneros que degradan celulosa relacionados en su incapacidad para degradar polvo de celulosa en Cel-3 y papel de filtro sobre agar ST21. Las células que se desplazan en enjambre tampoco degradan polvo de quitina sobre agar CT-7. También se ha observado depresión en agar de poca profundidad en la mayoría de los medios de cultivo sólidos, indicando que la cepa también puede degradar agar.

- 15 Prueba de depredación microbiana: La bacteria cebada se eliminó en el transcurso de 5-7 días a incubación a 30°C, lo que sugiere actividad bacteriolítica.

Respuestas de crecimiento a la temperatura y el pH: Sobre agar de levadura, se logra buen crecimiento en un intervalo de desde 18-30°C, pero no se produce crecimiento a 37°C. En el mismo medio, se observó crecimiento dentro de un intervalo de pH 6 - 8, observándose el mayor diámetro de enjambre a pH 7,0.

- 20 Utilización de fuentes de carbono: Ninguna de las fuentes de carbono sometidas a prueba, excepto el almidón soluble, soportó bien el crecimiento de la cepa.

- 25 Utilización de fuentes de nitrógeno: El crecimiento es escaso en todas las fuentes de nitrógeno inorgánicas sometidas a prueba. Entre las diferentes fuentes de nitrógeno orgánicas complejas, la triptona es la que mejor se adapta. Sin embargo, la cepa también crece bien en peptona, neopeptona y casitona; e incluso la fitona y los casaminoácidos eran comparablemente más adecuados que las fuentes de nitrógeno inorgánicas.

Resistencia a antibióticos. La cepa es sensible a todos los antibióticos sometidos a prueba excepto a tobramicina e higromicina B.

Ejemplo 5: Estudios comparativos de producción de AGPI en las mixobacterias

- 30 Para establecer correlaciones entre taxonomía y filogenia por una parte y la producción de AGPI omega-3 por otra parte, se estudiaron una serie de cepas tipo y otros representantes bien caracterizados de diversos grupos taxonómicos de bacterias mixobacterianas y deslizantes relacionadas para realizar una comparación de la producción de DHA, EPA y otros ácidos grasos. La mayoría de estas cepas se enumeran en la tabla 1, sus secuencias de ADN_r 16S también se consideran para el estudio filogenético (ejemplo 6). Además, también se estudiaron algunas cepas adicionales de la colección SB para determinar perfiles de AG mediante CG-EM, que
- 35 estaban morfológicamente en concordancia con *Sorangium cellulosum* pero hasta ahora no incluidos en la filogenia molecular.

- Para este fin, se obtuvieron cepas auténticas y tipo de diversas mixobacterias y grupos filogenéticos relacionados de DSMZ (Braunschweig; Alemania), el centro Helmholtz para enfermedades infecciosas (HZI, dto.) o de la colección de cultivos de la Universität des Saarlandes (Saarbrücken, Alemania; SB). La mayoría de las bacterias se cultivaron como cultivos con agitación en matraces Erlenmeyer de 300 ml que contenían 50 ml de los medios de cultivo respectivos (tal como se especifica a continuación) a 170 rpm. La temperatura de incubación fue de 30°C, excepto para *Haliangium tepidum* (que se incubó a 37°C). Los miembros de los géneros *Poliangium*, *Chondromyces*, *Jahnella* y *Byssovorax* se cultivaron en medio VY/2, al que se añadió maltosa en caso de *Byssovorax*, siguiendo el protocolo propuesto por Kunze B *et al.* (2006) J Antibiotics 59:664-668. Se cultivaron especies de *Archangium*, *Corallococcus*, *Hyalangium*, *Koferia*, *Melittangium*, *Myxococcus*, *Nannocystis*, *Pyxidicoccus*, *Stigmatella* y *Angiococcus* (clasificadas actualmente en *Cystobacter*), así como *Cystobacter armeniaca* y *C. disciformis*, en medio MD1 (Shimkets *et al.*, 2006). El resto de *Cystobacter* spp. se hicieron crecer en M-med [Müller R & Gerth K (2006) J Biotechnol 121:192-200] y se usó medio HS [Kopp M *et al.* (2004) J Biotechnol 107:29-40] para las especies de *Sorangium*. Se hicieron crecer mixobacterias marinas que pertenecían a *Enhygromyxa* y *Plesiocystis* en VY/4-SWS [Iizuka T *et al.* (2003a) Int J Syst Evol Microbiol 53:189-195; Iizuka T *et al.* (2003b) Syst Appl Microbiol 26:189-196], mientras que *Haliangium* se cultivó en CY-SWS [Iizuka T *et al.* (1998) FEMS Microbiol Lett 169:317-322]. Se tomaron perfiles de ácidos grasos de *Phaselicystis flava* de Garcia RO *et al.* (2009) Int J Syst Evol Microbiol 59:1524-1530. Se obtuvieron bacterias deslizantes que pertenecían a *Herpetosiphon* de HZI, y *Flexibacter* de SB. Estas últimas bacterias se cultivaron en medio LB, mientras que las cepas de *Herpetosiphon* se hicieron crecer en
- 50 medio de agar VY/2 sólido.
- 55

Extracción de ácidos grasos para análisis

Para la mayoría de las cepas, se obtuvieron gránulos celulares a partir de alícuotas de medio de cultivo líquido de 2 ml de cultivos con agitación, que se secaron completamente a 60°C durante 30 min en una centrifuga a vacío. En el caso de *Herpetosiphon* spp., que no creció en medio líquido, se rascó el contenido de un asa de células de la superficie del agar de medios sólidos con buen crecimiento.

- 5 Entonces se extrajeron las células secas durante la noche con 500 ul de disolución de EMAG (metanol, tolueno, ácido sulfúrico; 50:50:2 v/v). A continuación, se añadió una alícuota de 400 ul de reactivo R2 (NH₄HCO₃ 0,5 M, KCl 2 M). Tras mezclar la muestra en un vórtex, se centrifugó la disolución a 5000 rpm durante 4 min y se derivatizaron 75 ul de extracto tomado de la fase superior de la disolución con 25 ul de MSTFA. Entonces se incubó la muestra a 37°C durante 30 min antes de someterse a análisis de CG-EM.
- 10 Los resultados se representan en las tablas 8 y 9, que revelan que grandes cantidades de EPA y DHA están limitadas particularmente a los miembros del nuevo género *Aetherobacter*. Diversos grupos de *Myxobacteria* mostraron ausencia de producción de omega-3-AGPI en absoluto. Entre otras *Sorangiiinae*, se encontró que todas las cepas tipo estudiadas estaban desprovistas de AGPI omega-3. Sorprendentemente, dos cepas recién aisladas de *Sorangium cellulosum* de la colección SB muestran las características morfológicas y fisiológicas generales del
- 15 género y la especie, y revelaron producción de EPA en pequeñas cantidades cuando se estudiaron mediante CG-EM tal como se muestra en tabla 8. Esta observación da lugar a suponer que un examen más minucioso de *Sorangium* spp. adicionales y otras especies del suborden *Sorangiiineae* revelarán inadvertidamente cepas productoras adicionales para estos AGPI omega-3.
- En la cepa tipo de la especie marina *Enhygromyxa salina* (suborden *Nannocystineae*), también se encontró EPA en
- 20 pequeñas cantidades (tabla 9), revelando el potencial general de este suborden para producir AGPI omega-3. Dichos compuestos no se encontraron en las eubacterias no fructificantes deslizantes (*Flexibacter*, *Herpetosiphon*) estudiadas actualmente, y no se encontraron en ninguno de los otros taxones de eubacterias Gram positivas y Gram negativas que se han estudiado ampliamente hasta ahora para determinar sus perfiles de ácidos grasos en el
- 25 transcurso de estudios quimiotaconómicos, a excepción de los ejemplos citados anteriormente en el "Estado de la técnica". Ni siquiera se ha notificado nunca antes el descubrimiento de EPA en *Enhygromyxa* y *Sorangium*, posiblemente debido al hecho de que hasta ahora sólo se habían considerado los componentes de AG principales de las bacterias durante su evaluación quimiotaconómica mediante CG-EM. Por tanto, las mixobacterias siguen siendo la única clase de eubacterias que tiene muchas especies que pueden cultivarse fácilmente y producir
- 30 cantidades significativas de AGPI omega-3 valiosos comercialmente (es decir, DHA y EPA) al mismo tiempo, tal como se descubrió en el transcurso de este estudio. El uso de una modificación de la técnica quimiotaconómica bien establecida para determinar el perfil de AG mediante CG-EM con énfasis especial sobre DHA y EPA ha conducido en el estudio a la identificación de productores adicionales de estos compuestos. A partir de estos datos se concluye que determinados taxones de *Myxobacteria* difieren del resto de eubacterias que pueden cultivarse por tener la capacidad para producir AGPI omega-3. Dado que queda por descubrir y describir hasta el 90% de todas las
- 35 especies eubacterianas existentes, hay buenas expectativas de encontrar productores adicionales, además del género novedoso *Aetherobacter* que también puede producir AGPI omega-3. Se propone por tanto una estrategia novedosa, que incluye datos filogenéticos y quimiotaconómicos, siguiendo los ejemplos proporcionados en esta solicitud de patente, para descubrir productores mixobacterianos adicionales de AGPI omega-3.

Tabla 8. Distribución de ácidos grasos en cepas de *Sorangium cellulosum* (colección SB).

Ácidos grasos [%]	Cepa	
Cadena lineal	SBS021	SBS024
C14:0	2,36	1,38
C14:1w5cis	0,10	
C15:0		
C16:0	19,03	17,36
C16:1w5c	19,34	7,45
C16:1w9c		0,07
C16:2		0,15
C17:0	0,71	0,07
C18:0	2,83	7,14
C18:1		0,41
C18:1w9c	0,26	0,51
AGPI		
C18:2		11,20
C18:2w6,9, todo cis	9,88	
C20:4w6,6,9,12,15 todo cis		
C20:5w3 (EPA)	0,67	2,03
Hidroxilo		
C16:02-OH	3,82	0,17
C17:12-OH	11,88	5,56
O-Alquilglicerol (OAG)		

C14:0		
C15:0	0,51	
C16:0		21,94
C16:1		
Total	71,39	75,44
Cadena ramificada		
iso-C13:0	0,32	0,14
iso-C14:0	0,12	
iso-C15:0	11,68	8,94
iso-C16:0	1,51	0,06
iso-C17:0	12,23	7,05
Hidroxilo de cadena ramificada		
iso-C17:02-OH	2,76	0,79
OAG de cadena ramificada		
OAG iso-C15:0		7,59
Total	28,61	24,56

Tabla 9. Distribución de ácidos grasos entre *Nann. ocystineae*: Se encontró EPA en *Enhygromyxa salina*. Leyenda: Hoch: *Helicium ochraceum*, Htep: *Helicium tepidum*, Esal: *Enhygromyxa salina*, Ppac: *Plesiocystis pacifica*, Kfla: *Kofleria flava*, Nexe: *Nannocystis exedens*, Npus: *Nannocystis pusilla*.

Cadena lineal	Hoch	Htep	Esal	Ppac	Kfla	Nexe	Npus
C13:0						0,56	
C14:0	0,18		0,79	0,41		17,33	11,14
C14:1w5c			0,68	0,64			
C15:0	0,63		0,45	0,18	0,35	2,37	
C15:1						2,12	
C16:0	18,41	2,89	10,69	6,67	2,81	12,01	2,22
C16:1w5c	3,57		0,96	0,65	0,37	22,01	14,81
C16:1w7c	3,84		42,24	30,13			
C16:1w9c		3,27		22,41	0,82	6,68	
C16:1w11c							1,11
C17:0	1,81		0,39	0,20	0,73		
C17:1w7c	0,52		0,53	0,32			
C18:0	4,81	2,23	5,88	3,19	0,76	7,75	1,23
C18:1	2,23						
C18:1w9c	0,72	2,24	29,09	23,59			
AGPI							
C20:4w6,9,12,15 todo cis			0,91	2,55			
C20:5w3 (EPA)			1,44				
O-Alquilglicerol (OAG)							
C14:0					0,31		
C15:0	0,72		0,33		0,49		
C16:0	6,98	0,18	1,48		0,67		
C16:1	0,20	2,93			6,55		
Total	49,62	13,73	95,87	90,93	13,86	70,84	30,51
Cadena ramificada							
iso-C14:0					0,15		
iso-C15:0	2,38	17,86	0,57	2,76	1,72	8,69	14,83
iso-C16:0	25,45	14,02	1,20	2,46	34,14		0,70
iso-C16:1	8,94	18,69			27,85		
iso-C17:0	5,00	8,76	0,66	0,46	12,63	14,74	34,44
iso-C17:1w5c		0,76					4,21
iso-C17:1w11c						3,53	11,37
iso-C18:0	0,11				0,45		
anteiso-C17:0	2,01	3,14			1,81		
OAG de cadena ramificada							
iso-C15:0	4,84	23,05	1,69	3,39	4,61		0,74
DMA de cadena ramificada							
iso-C15:0	1,65				2,79	2,20	3,24
Total	50,38	86,27	4,13	9,07	86,14	29,16	69,52

Ejemplo 6: Filogenia de mixobacterias en relación con la producción de ácidos grasos, con énfasis especial en AGPI omega-3

5

Myxobacteria se divide actualmente en seis familias, veinte géneros y 46 especies, que pueden segregarse

basándose en el carácter morfológico, bioquímico y fisiológico. Esta taxonomía también se reflejó mediante estudios filogenéticos moleculares, basados en análisis de similitud de sus ADNr 16S, revelando que *Myxobacteria* es un grupo monofilético [Velicer G, Hillesland K (2008) In *myxobacteria: multicellularity and differentiation* (Whitworth D, ed), págs. 17-40. ASM Press:Washington DC; Spröer C *et al.* (1999) *Int J Syst Bacteriol* 49, 1255-1262; Garcia RO *et al.* (2009) *Int J Syst Evol Microbiol* 59:1524-1530].

Tras el sorprendente descubrimiento de que los miembros del género novedoso no descrito *Aetherobacter* podían producir AGPI omega-3 como ácidos grasos principales en su biomasa, se seleccionó un panel de cepas representativas de la clase *Myxobacteria* para estudiar sus perfiles de ácidos grasos con el fin de investigar la distribución de AGPI y otros ácidos grasos y en particular, la especificidad de la sobreproducción de AGPI por el género novedoso *Aetherobacter*. Preferiblemente, se seleccionaron las cepas tipo de especies que pueden cultivarse, incluyendo especies terrestres así como marinas.

Las secuencias génicas de ADNr 16S de referencia usadas en este estudio se descargaron de GenBank. También se incluyeron secuencias corregidas de las cepas tipo y novedosas (tabla 1). Se crearon alineaciones de secuencia usando el software ClustalW versión 2.0. [Larkin *et al.* (2007) *Bioinformatics Applications Note* 23(21): 2947-2948].

Se calcularon matrices de distancia entre secuencias usando el modelo de Jukes-Cantor [Jukes TH, Cantor CR (1969) *Evolution of protein molecules*. págs. 21-123 en HN Munro (ed) *Mammalian protein metabolism*. Nueva York: Academic Press]. A partir de las matrices de distancia, se construyó un árbol de unión al vecino más cercano tal como se describe en Saitou N & Nei M (1987) *Mol Biol Evol* 4:406-425. Se diseñó un remuestreo de 1000 repeticiones [Felsenstein J (1985) *Evolution* 39:783-791], y se realizó un árbol de consenso usando la herramienta de construcción de árboles Geneious. Todos estos programas se encuentran en el paquete de software Geneious Pro 4.7.6, disponible de Geneious (Auckland, Nueva Zelanda).

Se extrajo el ADN genómico de cultivos que crecían activamente usando el protocolo para bacterias Gram negativas del kit de purificación de ADN genómico de Qiagen (Gentra Systems Inc., Minneapolis, EE.UU.). Sólo se prepararon las cepas con huecos y secuencias "N" para la secuenciación génica repetida del ADNr 16S. También se incluyeron todas las cepas tipo sin secuencia génica de ADNr 16S (figura 5). Se prepararon alícuotas de ADN para PCR usando cebadores universales [Lachnik J *et al.* (2002) *J Clin Microbiol* 40:3364-3373]. Estos cebadores (cebador directo GAGTTTGATCCTGGCTCAGGA; cebador inverso AAGGAGGTGATCCAGCCGCA) también se usaron para secuenciar los productos de la PCR. Se diseñaron cebadores adicionales para cubrir las secuencias finales del gen y también se usaron para secuenciación adicional. Se realizó la purificación del producto de la PCR usando el kit NucleoSpin (Macherey-Nagel, Düren, Alemania).

Análisis de homología de secuencia de datos de ADNr 16S: Según el análisis BLASTn ampliamente usado y bien establecido [Zhang Z *et al.* (2000) *J Comput Biol* 7:203-214], se comprobó la homología de las secuencias de ADNr 16S recién obtenidas de las cepas de *Aetherobacter* con los datos de secuencia publicados. Las tablas 10 - 12 muestran los resultados de las búsquedas en BLASTn para cada cepa individual. La secuencia de ADNr 16S de *A. fasciculatus* DSM 21835 mostró una identidad del 96% con la de la cepa *Byssovorax* (*Byssophaga*) *cruenta* DSM 14553^T y del 95% con la cepa *Sorangium* (syn: *Poliangium*) *cellulosum* que degradan celulosa (tabla 10). Sorprendentemente, la secuencia de ADNr 16S de *A. rufus* DSM 23122 y *Aetherobacter* sp. DSM 23098 también mostraron una identidad del 96% con la cepa *Byssovorax* *cruenta* (tabla 11) y del 95% con la cepa *Sorangium* *cellulosum* (tabla 12).

Los datos anteriores revelan que tal como se deduce a partir de las homologías de ADNr 16S, se confirma adicionalmente la identificación de las tres cepas de *Aetherobacter* como miembros de *Mycococcales*. Las cepas bacterianas novedosas están relacionadas más estrechamente con miembros de la familia *Poliangiaceae*, tal como se indica por las homologías con *Byssovorax* (*Byssophaga*) *cruenta* y *Sorangium* (syn: *Poliangium*) *cellulosum*. Se encontró la similitud más estrecha (96-98%) con clones bacterianos que representan quizá especies de mixobacterias no cultivadas hasta ahora adicionalmente que están relacionadas más o menos inmediatamente con el género *Aetherobacter*. Esta relación se ilustra para *Aetherobacter fasciculatus* DSM 21835 en la figura 6 a modo de ejemplo. Se obtuvieron resultados casi idénticos para las otras cepas de *Aetherobacter*.

Tabla 10. Homología en BLASTn2.2.22+ de datos de secuencia de ADNr 16S de *Aetherobacter fasciculatus* DSM 21835, que revela las secuencias de ADN más similares depositadas con GenBank el 22 de noviembre de 2009.

Registro	Descripción	Puntuación máxima	Puntuación total	Cobertura de consulta	Valor de E	Ident. máx.
FN421522	Gen de ADNr 16S parcial bacteriano no cultivado, clon 12_G10	2553	2553	92%	0,0	98%
FJ479473	Gen de ADN ribosómico 16S del clon bacteriano no cultivado p35k08ok, secuencia parcial	2527	2527	97%	0,0	96%
AJ833647	Gen de ADNr 16S parcial de <i>Byssophaga</i> <i>cruenta</i> , cepa DSM 14553T	2488	2488	98%	0,0	96%
AF467674	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Poliangium</i> <i>cellulosum</i> cepa So9857, secuencia completa	2475	2475	100%	0,0	95%

FJ457644	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Sorangium cellulosum</i> cepa KYC3093, secuencia parcial	2464	2464	99%	0,0	95%
FJ457643	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Sorangium cellulosum</i> cepa KYC3074, secuencia parcial	2462	2462	99%	0,0	95%
AF467672	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Poliangium cellulosum</i> cepa So9881, secuencia completa	2460	2460	99%	0,0	95%
AF387629	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Poliangium cellulosum</i> cepa So ce26, secuencia completa	2460	2460	99%	0,0	95%
FJ176770	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Sorangium cellulosum</i> cepa KYC3047, secuencia parcial	2457	2457	99%	0,0	95%
FJ457645	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Sorangium cellulosum</i> cepa KYC3139, secuencia parcial	2451	2451	99%	0,0	95%
FJ457642	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Sorangium cellulosum</i> cepa KYC3059, secuencia parcial	2451	2451	99%	0,0	95%
FJ176771	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Sorangium cellulosum</i> cepa KYC3076, secuencia parcial	2451	2451	99%	0,0	95%
AF467675	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Poliangium cellulosum</i> cepa So9735-22, secuencia completa	2449	2449	99%	0,0	95%
AM746676	Genoma completo de <i>Sorangium cellulosum</i> "So ce 56"	2447	9786	100%	0,0	95%

Tabla 11. Homología en BLASTn2.2.22+ de datos de secuencia de ADNr 16S de *Aethrobacter rufus* DS 23122 que revela las secuencias de ADN más similares depositadas con GenBank el 22 de noviembre de 2009.

Registro	Descripción	Puntuación máxima	Puntuación total	Cobertura de consulta	Valor de E	Ident. máx.
FN421522	Gen de ADNr 16S parcial bacteriano no cultivado, clon 12_G10	2595	2595	92%	0,0	99%
FJ479473	Gen de ADN ribosómico 16S del clon bacteriano no cultivado p35k08ok, secuencia parcial	2558	2558	97%	0,0	97%
AJ833647	Gen de ADNr 16S parcial de <i>Byssophaga cruenta</i> , cepa DSM 14553T	2514	2514	98%	0,0	96%
AF467674	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Poliangium cellulosum</i> cepa So9857, secuencia completa	2497	2497	99%	0,0	95%
AM746676	Genoma completo de <i>Sorangium cellulosum</i> "So ce 56"	2490	9956	99%	0,0	95%
AF467672	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Poliangium cellulosum</i> cepa So9881, secuencia completa	2481	2481	99%	0,0	95%
AF387629	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Poliangium cellulosum</i> cepa So ce26, secuencia completa	2481	2481	99%	0,0	95%
FJ457644	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Sorangium cellulosum</i> cepa KYC3093, secuencia parcial	2479	2479	99%	0,0	95%
FJ457643	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Sorangium cellulosum</i> cepa KYC3074, secuencia parcial	2477	2477	99%	0,0	95%
FJ176770	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Sorangium cellulosum</i> cepa KYC3047, secuencia parcial	2471	2471	99%	0,0	95%
DQ083111	Gen de ADN ribosómico 16S del clon S137 bacteriano no cultivado, secuencia parcial	2471	2471	97%	0,0	96%
FJ457646	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Sorangium cellulosum</i> cepa KYC3466, secuencia parcial	2468	2468	99%	0,0	95%
FJ457645	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Sorangium cellulosum</i> cepa KYC3139, secuencia parcial	2468	2468	99%	0,0	95%
FJ457642	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Sorangium cellulosum</i> cepa KYC3059, secuencia parcial	2466	2466	99%	0,0	95%

Tabla 12: Homología en BLASTn2.2.22+ de datos de secuencia de ADNr 16S de *Aethrobacter* sp. DSM 23098 que revela las secuencias de ADN más similares depositadas con GenBank el 22 de noviembre de 2009.

Registro	Descripción	Puntuación máxima	Puntuación total	Cobertura de consulta	Valor de E	Ident. máx.
FN421522	Gen de ADNr 16S parcial bacteriano no cultivado, clon 12_G10	2566	2566	92%	0,0	98%
FJ479473	Gen de ADN ribosómico 16S del clon bacteriano no cultivado p35k08ok, secuencia parcial	2534	2534	97%	0,0	96%
AJ833647	Gen de ADNr 16S parcial de <i>Byssophaga cruenta</i> , cepa DSM 14553T	2490	2490	98%	0,0	96%
AF467674	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Poliangium cellulosum</i> cepa So9857, secuencia completa	2481	2481	99%	0,0	95%
AF387629	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Poliangium cellulosum</i> cepa So ce26, secuencia completa	2470	2470	99%	0,0	95%
FJ457644	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Sorangium cellulosum</i> cepa KYC3093, secuencia parcial	2466	2466	99%	0,0	95%

EU881332	Gen de ADN ribosómico 16S del clon bacteriano no cultivado KMS200711-118, secuencia parcial	2466	2466	98%	0,0	95%
FJ457643	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Sorangium cellulosum</i> cepa KYC3074, secuencia parcial	2464	2464	99%	0,0	95%
AF467672	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Poliangium cellulosum</i> cepa So9881, secuencia completa	2464	2464	99%	0,0	95
FJ176770	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Sorangium cellulosum</i> cepa KYC3047, secuencia parcial	2459	2459	99%	0,0	95%
AM746676	Genoma completo de <i>Sorangium cellulosum</i> "So ce 56"	2459	9830	99%	0,0	95%
FJ457645	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Sorangium cellulosum</i> cepa KYC3139, secuencia parcial	2455	2455	99%	0,0	95%
FJ457641	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Sorangium cellulosum</i> cepa DSM14627, secuencia parcial	2455	2455	99%	0,0	95%
EU242519	Gen de ADN ribosómico 16S de <i>Sorangium cellulosum</i> cepa KYC3025, secuencia parcial	2455	2455	99%	0,0	95%

Ejemplo 7: Organismos fuera del grupo

- 5 La secuencia de ADNr 16S de *Flexibacter flexilis* (n.º de registro de GenBank AB078050), derivada de la cepa IFO 15060 mostró una similitud del 76% con la de *Aerherobacter fasciculatus* y otras especies de *Aetherobacter*, mientras que la secuencia de ADNr 16S de *Herpetosiphon geysericola* (n.º de registro de GenBank. AF039293) mostró una similitud del 75% tras una comparación en BLAST, determinada con el mismo procedimiento explicado resumidamente en los ejemplos anteriores.

Estas dos especies son bacterias deslizantes y pertenecen al subgrupo delta de proteobacterias; se considera que están estrechamente relacionadas con las mixobacterias, pero no producen cuerpos fructíferos ni AGPI omega-3.

Lista de secuencias

- 10 <110> Nombre de la organización: InterMed Discovery GmbH
 <120> Producción de ácidos grasos omega-3 por mixobacterias
 <130> IMD 0011
- <150> Documento EP 08 170 390.2
 <151> 01.12.2008
- 15 <160> 4
- <210> 1
 <211> 1548
 <212> ADN
 <213> *Aetherobacter fasciculatus*
- 20 <400> 1

agtttgatcc tggctcagaa cgaacgttag cggcgcgctt aacacatgca agtcgagcga	60
gaaaggggca accccggtaa agcggcgcac gggtagtaaa cacgtaggta atctaccccc	120
aggtgggtgga taaccttccg aaaggaaggc taatacagca tgggaccacg acctcgcaag	180
gggttgaggt gaaagttggc ctcttcatga aagccaacgc caggggatga gcctgcggcc	240
catcagctag ttggtagggt aatggcctac caaggcaaag acgggtagct ggtctgagag	300
gatgatcagc cacactggaa ctgagacacg gtccagactc ctacgggagg cagccagtgg	360
ggaatcttgc gcaatgggag aaagcctgac gcagcgacgc cgcgtgagtg atgaaggccc	420
tcgggttgta aagctctgtg gagggggacg aataagcggt ggtaaatatc cagcgtgatg	480
acggtaccct tttagcaagc accggctaac tctgtgccag cagccgcggt aagacagagg	540
gtggcaaacg ttgttcggaa ttactgggag taaagcgctg gtaggctgct tcgcaagtcg	600
gatgtgaaaa gcccttgggc tcaaccagc aagtgcattc gaaactgcaa agctggagtc	660
ctggagagga aggcggaatt ctcggtgtag aggtgaaatt cgtagatatc gagaggaaca	720
ccggtggcga aggcggcctt ctggacagtg actgacgctg agacgcgaaa gcgtggggag	780
caaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaaac atgggtgcta ggtgttgagg	840
gctttgaccc ctgcagtgcc gtagctaacg cattaagcac ccgcctggg gagtacggcc	900
gcaaggctaa aactcaaagg aattgacggg ggccgcgaca agcggtgagg catgcggttc	960
aattcgacgc aacgcgcaga accttacctg ggctagaaaa tgcaaggacc tggtcgaaag	1020
atcgggggtgc tcttcggaga acttgtagtt aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt	1080
cgtgagatgt tgggttaagt ccgcgaacga gcgcaacccc tgcgttagt tgccatcagt	1140
tcggctgggc actctagcga gactgccgat ctttaaatac gaggaagggtg gggatgacgt	1200
caagtcatca tggcccttat gtccagggtc acacgcgtgc tacaatggtc ggtacaaacg	1260
gttgcggaagt cgcgaggcga agctaataccg aaaaaaccgg cctcagtacg gataagagtc	1320
tgcaactcga ctctttgaag tcggaatcgc tagtaatccc tgatcagcag gcaggggtga	1380
atacgttccc gggccttgta cacaccgcc gtcacaccat gggagtcgat tgctccagaa	1440
gtggctgcgc caaccgcaa gggaggcagg ccccaagga gtggttggtg actgggggtga	1500
agtcgtaaca aggtagccgt aggggaacct gcggctggat cacctcct	1548

<210> 2

<211> 1551

<212> ADN

<213> *Aethrobacter rufus*

<400> 2

tagagtttga tcctggctca gaacgaacgt tagcggcgcg cttaacacat gcaagtcgag	60
cgagaaaggg gcaaccccg gtaaagcggcg cacgggtgag taacacgtag gtaatctacc	120
cccaggtggt ggataacctt ccgaaaggaa ggctaataca gcatgggacc acggctccga	180
aaggagttga ggtgaaagtc ggcctcttca tgaaagccga cgccagggga tgagcctgcg	240
gcccacgagc tagttggtag ggtaatggcc taccaaggcg aagacgggta gctggtctga	300
gaggatgac agccacactg gaactgagac acggtccaga ctctacggg aggcagcagt	360
ggggaatctt gcgcaatggg cgaaagcctg acgcagcgac gccgcgtgag tgatgaaggc	420
cctcggttg taaagctctg tggaggggga cgaataagcg ttggttaata tccagcgtga	480
tgacgggtacc cttttagcaa gcaccggcta actctgtgcc agcagccgcg gtaagacaga	540
gggtgcaaac gttgttcgga attactgggc gtaaagcgcg tgtaggctgc ttcgcaagtc	600
ggatgtgaaa gccctgggct caaccagga agtgcatcgc aaactgcaga gctggagtcc	660
tggagaggaa ggcggaattc tcggtgtaga ggtgaaattc gtagatatcg agaggaacac	720
cggtggcgaa ggcggccttc tggacagtga ctgacgctga gacgcgaaag cgtggggagc	780
aaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgggtgctag gtgttgccgg	840
ctttgacccc tgcagtgccg tagctaacgc attaagcacc ccgcctgggg agtacggccg	900
caaggctaaa actcaaagga attgacgggg gcccgacaaa gcggtggagc atgcgggttc	960
aattcgacgc aacgcgcaga accttacctg ggctagaaaa tgcaaggacc tgggtcgaaa	1020
gatcggggtg ctcttcggag agcttgtagt taggtgctgc atggctgtcg tcagctcgtg	1080
tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg agcgcaaccc ctgtcgttag ttgccatcag	1140
ttcggtggg cactctagcg agactgccga tctttaaatc ggaggaaggt ggggatgacg	1200
tcaagtcac atggccctta tgtccagggc tacacgcgtg ctacaatggt cggtacaaac	1260
ggttgcgaag tcgagggcg aagctaattc gaaaaaacg gcctcagtac ggataagagt	1320
ctgcaactcg actctttgaa gtcggaatcg ctagtaatcc ctgatcagca ggcaggggtg	1380
aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca tgggagtcga ttgctccaga	1440
agtggctgcg ccaaccgcga agggaggcag gcccccaagg agtggttggt aactgggggtg	1500
aagtcgtaac aaggtagccg taggggaacc tgcggctgga tcacctcctt a	1551

<210> 3

<211> 1529

<212> ADN

<213> *Byssovorax cruenta*

<400> 3

5

tgatcctggc tcagaacgaa cgtagcggc gcgcctaaca catgcaagtc gagcgagaaa	60
ggggaaaccc cggtaaagcg gcgcacgggt gagtaacacg taggtaatct acccccaggt	120
ggtggataac cttccgaaag gagggctaata acagcatgag accacgtttc cgcaagggag	180
tgaggtcaaa gccggcctct tcacgaaagc tggcgccagg ggatgagcct gcggcccac	240
acggtagttg gtagggtaata ggcctaccaa gccaaagacg ggtagctggg ctgagaggat	300
gatcagccac actggaactg agacacggtc cagactccta cgggaggcag cagtggggaa	360
tcttgcgcaa tgggcgaaag cctgacgcag cgacgccgcg tgagtgatga aggccttcgg	420
gttgtaaagc tctgtgggga gggacgaata agtgttggtt aacatccagc atgatgacgg	480
tacctcttta gcaagcaccg gctaactctg tgccagcagc cgcggtaaga cagaggggtgc	540
aaacgttggt cggaattact gggcgtaaag cgcgtgtagg ctgcttcgaa agtcggatgt	600
gaaagccctg ggctcaacct aggaagtgc ttcgaaactt cggagcttga gttctggaga	660
ggaaggcgga attctcgggt tagaggtgaa attcgtagat atcgagagga acaccgggtg	720
cgaaggcggc cttctggaca gatactgacg ctgagacgcg aaagcgtggg gagcaaacag	780
gattagatac cctggtagtc cagccgtaaa acgatgggtg ctaggtgtcg cgggctttga	840
cccctgcggg gccgtagcta acgcattaag caccgccct ggggagtagc gccgcaaggc	900
taaaactcaa aggaattgac gggggcccg cacaagcggg gagcatgtgg ttcaattcga	960
cgcaacgcgc agaaccttac ctgggctaga aaatgcaggg acctggctga aaagtcgggg	1020
tgctcttcgg agaacctgta gttaggtgct gcatggctgt cgtcagctcg tgctcgtgaga	1080
tggtgggtta agtcccga cagcgcaac ccttgtcgtt agttgccagc ggttcggccg	1140
ggcactctag cgagactgcc gatattcaaa tcggagggaag gtggggatga cgtcaagtca	1200
tcatggccct tatgtccagg gctacacacg tgctacaatg gtcggtacaa acggttgcca	1260
actcgcgagg ggaagctaata ccgaaaaaac cgacctcagt acggataaga gtctgcaact	1320
cgactctttg aagtcggaat cgctagtaata ccctgatcag caggcagggg tgaatacgtt	1380
cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac catgggagtc gattgctcca gaagtggctg	1440
cgccaacccg caagggaggc agggcccca ggaagtgggtg gtaactgggg tgaagtcgta	1500
acaaggtagc cgtaggggaa cctgcggct	1529

<210> 4

<211> 1548

5 <212> ADN

<213> *Aethrobacter* sp DSM 23098

<400> 4

tgagtttgat cctggctcag gacgaacggt agcggcgcg	60
gagaaagggg caaccccggt aaagcggcg acgggtgagt aacacgtagg taatctaccc	120
ccaggtggtg gataaccttc cgaaaggaag gctaatacag catgggacca cggcctcgca	180
agaggttgag gtgaaagttg gcctcttcat gaaagccaac gccaggggat gagcctgcgg	240
cccatcagct agttggtagg gtaatggcct accaaggcaa agacgggtag ctggtctgag	300
aggatgatca gccacactgg aactgagaca cgggccagac tcctacggga ggcagcagt	360
gggaatcttg cgcaatgggc gaaagcctga cgcagcgacg ccgcgtgagt gatgaaggcc	420
ctcgggttgt aaagctctgt ggagggggac gaataagcgt tggttaatat ccagcgtgat	480
gacggtaccc ttttagcaag caccggctaa ctctgtgcc a gcagccgcg taagacagag	540
ggtgcaaacg ttgttcggaa ttactgggcg taaagcgcgt gtaggctgct tcgcaagtcg	600
gatgtgaaag ccctgggctc aaccaggaa gtgcattcga aactgcaaag ctggagtcct	660
ggagaggaag gcggaattct cgggtgtagag gtgaaattcg tagatatcga gaggaacacc	720
ggtggcgaag gcggccttct ggacagtga tgacgctgag acgcgaaagc gtggggagca	780
aacaggatta gataccctgg tagtcacgc cgtaaacgat ggggtgctagg tgttgcgggc	840
tttgaccct gcagtgccgt agctaacgca ttaagcacc cgcctgggga gtacggccgc	900
aaggctaaaa ctcaaaggaa ttgacggggg ccgcacaaag cgggtggagca tgcggttcaa	960
ttcgacgcaa cgcgcagaac cttacctggg ctagaaaatg caaggacctg gtcgaaagat	1020
cggggtgctc ttcggagagc ttgtagttag gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgtcg	1080
tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctg tcgttagttg ccatcagttc	1140
ggctgggcac tctagcgaga ctgccgatct ttaaactcga ggaaggtggg gatgacgtca	1200
agtcatcatg gcccttatgt ccagggtac acgcgtgcta caatggtcgg tacaacgggt	1260
tgcaagtcg cgaggcgaag ctaatccgaa aaaaccggcc tcagtacgga taagagtctg	1320
caactcgact ctttgaagtc ggaatcgcta gtaatccctg atcagcaggc aggggtgaat	1380
acgttcccg gccttgtaga caccgcccgt cacaccatgg gagtcgattg ctccagaagt	1440
ggctgcgcca acccgcaagg gaggcaggcc cccaaggagt ggttggtaac tggggtgaag	1500
tcgtaacaag gtagccgtag gggaacctgc ggctggatca cctcctta	1548

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de ácidos grasos insaturados omega-3 que comprende cultivar una cepa mixobacteriana que puede producir uno o más ácidos grasos insaturados omega-3, caracterizado porque la cepa mixobacteriana se selecciona del género *Aetherobacter* que tiene células vegetativas que son bacilos cilíndricos moderadamente largos y delgados con extremos romos, con movimiento mediante deslizamiento sobre la superficie y bajo el agar, colonia de tipo película a transparente-claro que se desplaza en enjambre, que son negativas para rojo Congo, bordes caracterizados por células migratorias coherentes, que penetran principalmente bajo el medio sólido, agar ligeramente rebajado, siendo las mixoesporas bacilos delgados refringentes con extremos romos, más cortas que las células vegetativas y encerradas en paredes de esporangio, con cuerpos fructíferos como diminutos esporangiolos ovoides, con ácidos grasos poliinsaturados omega-3 como componentes principales de ácidos grasos celulares, que tienen un porcentaje de G+C del 68,0-70%, y que tienen una identidad de secuencia de ADNr 16S de al menos el 96% con respecto a SEQ ID NO: 1, a SEQ ID NO: 2 o a SEQ ID NO: 4, de *Sorangium cellulosum* DSM 14627 y de *Enhygromyxa salina* DSM 15217.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la identidad de secuencia de ADNr 16S es de al menos el 97%.
3. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el *Aetherobacter* es uno de *Aetherobacter fasciculatus* DSM 21835, *Aetherobacter rufus* DSM 23122, y *Aetherobacter sp.* DSM 23098.
4. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la cepa mixobacteriana tiene un contenido en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de al menos el 10% en peso del contenido en ácidos grasos celulares totales.
5. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la cepa mixobacteriana del género *Aetherobacter* tiene una secuencia de ADNr 16S que es idéntica en al menos el 94% a SEQ ID NO: 3.
6. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque los ácidos grasos insaturados omega-3 se seleccionan de ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, y mezclas de los mismos.
7. Cepa mixobacteriana adecuada para producir ácidos grasos poliinsaturados omega-3, caracterizada porque la cepa es del género *Aetherobacter* que tiene células vegetativas que son bacilos cilíndricos moderadamente largos y delgados con extremos romos, con movimiento mediante deslizamiento sobre la superficie y bajo el agar, colonia de tipo película a transparente-claro que se desplaza en enjambre, que son negativas para rojo Congo, bordes caracterizados por células migratorias coherentes, que penetran principalmente bajo el medio sólido, agar ligeramente rebajado, siendo las mixoesporas bacilos delgados refringentes con extremos romos, más cortas que las células vegetativas y encerradas en paredes de esporangio, con cuerpos fructíferos como diminutos esporangiolos ovoides, con ácidos grasos poliinsaturados omega-3 como componentes principales de ácidos grasos celulares, que tienen un porcentaje de G+C del 68,0-70%, y que tienen una identidad de secuencia de ADNr 16S de al menos el 96% con respecto a SEQ ID NO: 1, a SEQ ID NO: 2 o a SEQ ID NO: 4.
8. Cepa mixobacteriana según la reivindicación 7, caracterizada por una identidad de secuencia de ADNr 16S de al menos el 97% con respecto a SEQ ID NO: 1, a SEQ ID NO: 2 o a SEQ ID NO: 4.
9. Cepa mixobacteriana según la reivindicación 7, caracterizada por una identidad de secuencia de ADNr 16S de al menos el 99% con respecto a SEQ ID NO: 1, a SEQ ID NO: 2 o a SEQ ID NO: 4.
10. Cepa mixobacteriana según una de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizada por un contenido en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de al menos el 10% en peso del contenido en ácidos grasos celulares totales.
11. Cepa mixobacteriana según la reivindicación 7, caracterizada porque se selecciona de *Aetherobacter fasciculatus* DSM 21835, *Aetherobacter rufus* DSM 23122 y *Aetherobacter sp.* DSM 23098.

Figura 1:

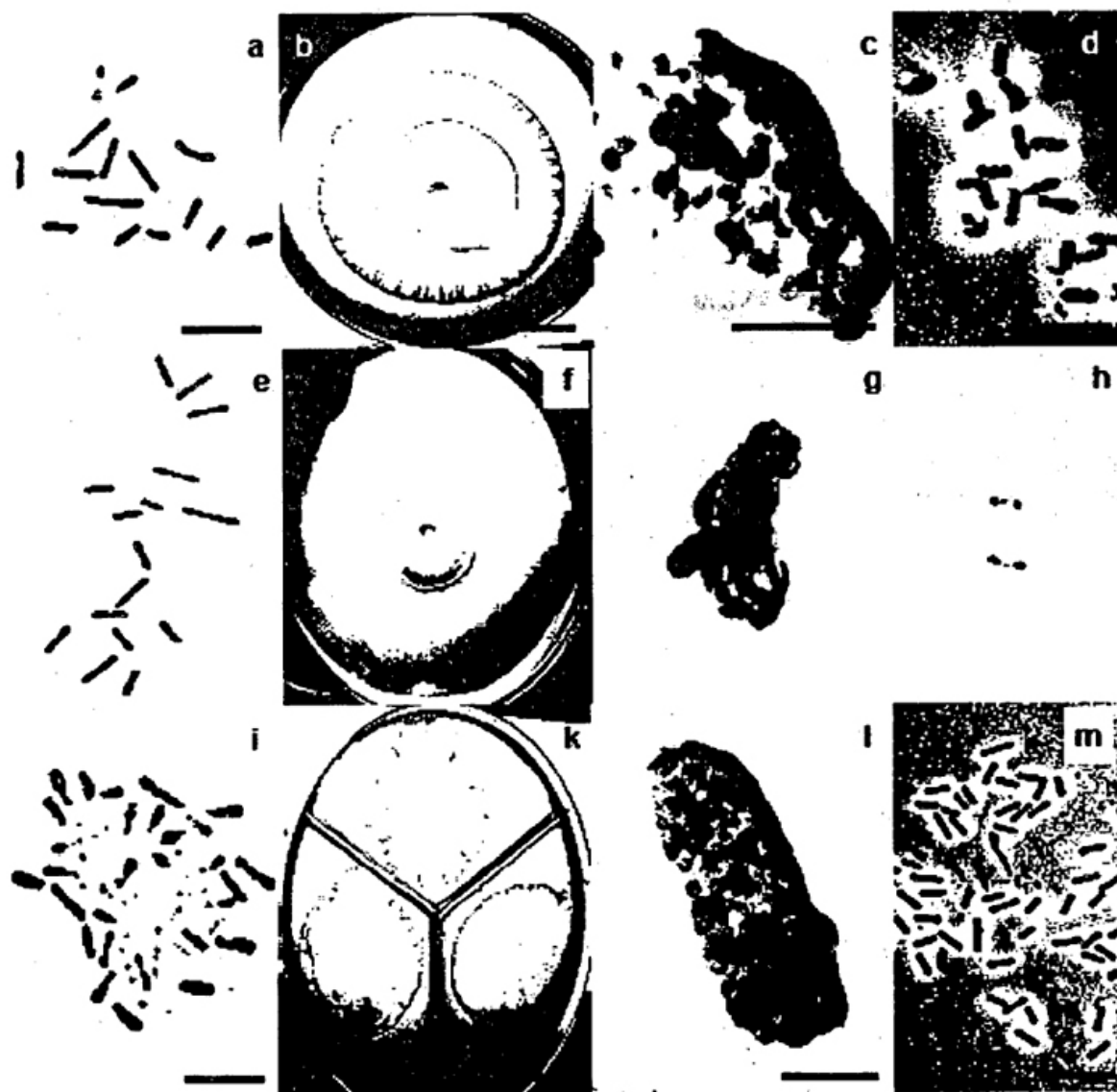


Figura 2:

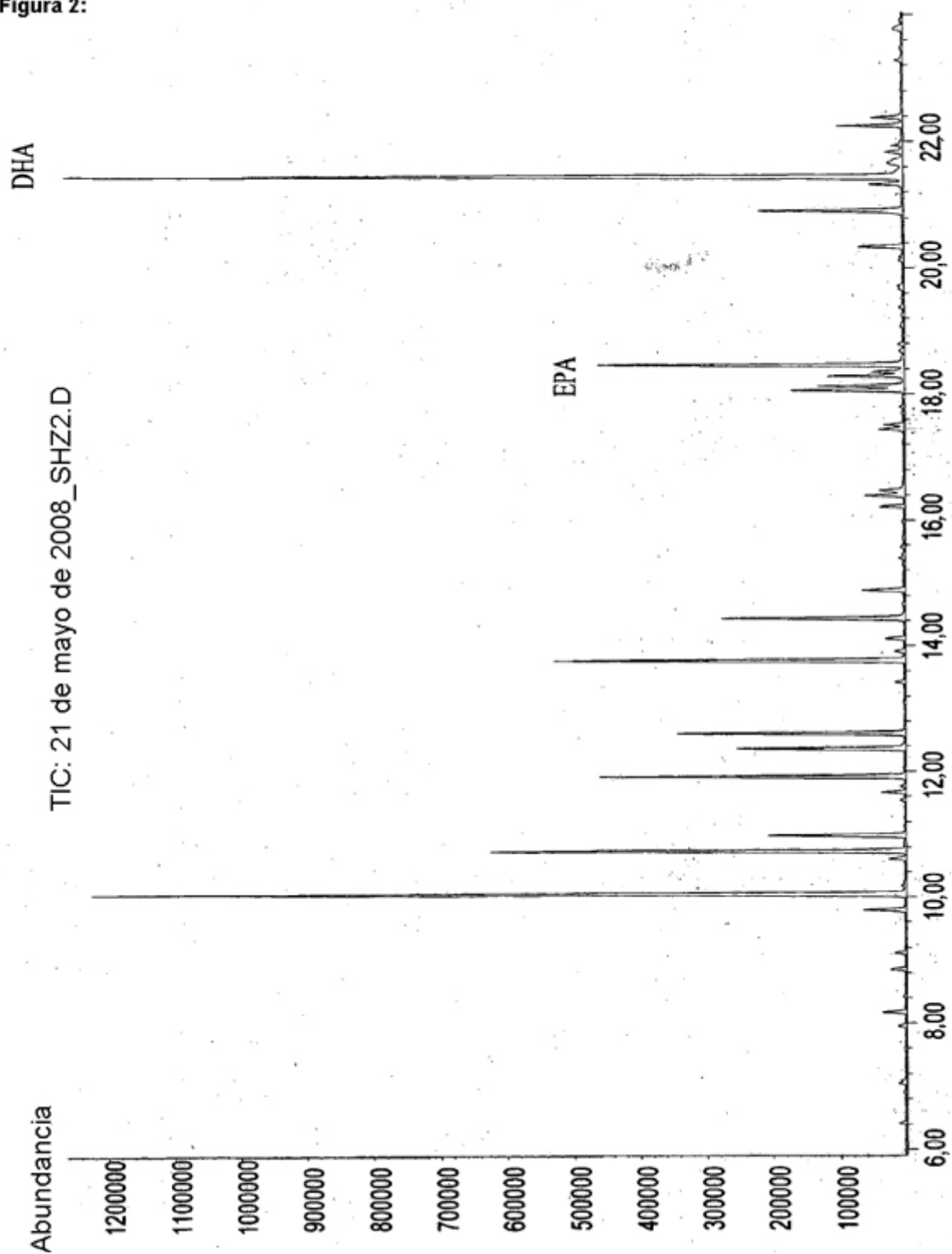
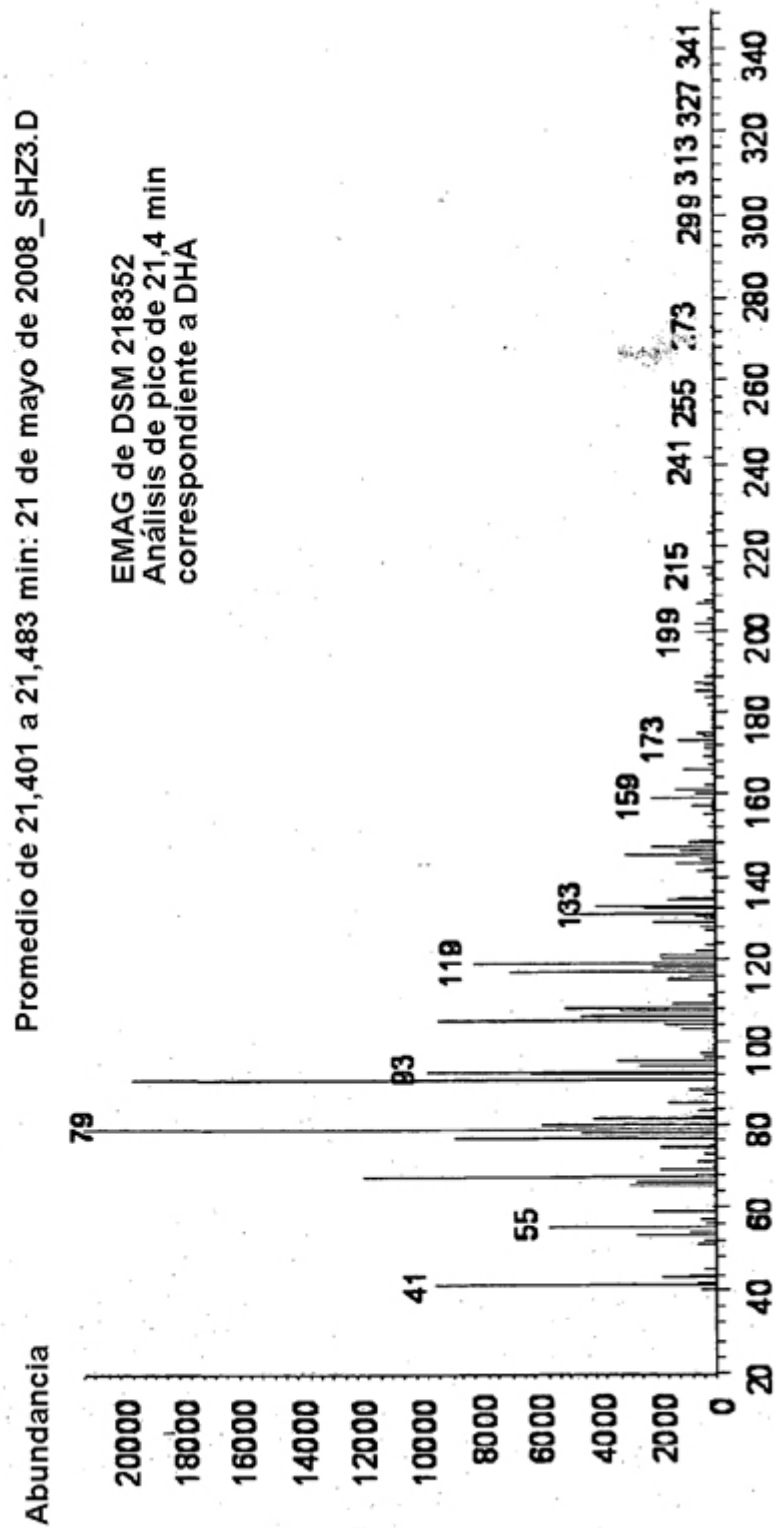


Figura 3:



cont. de Figura 3:

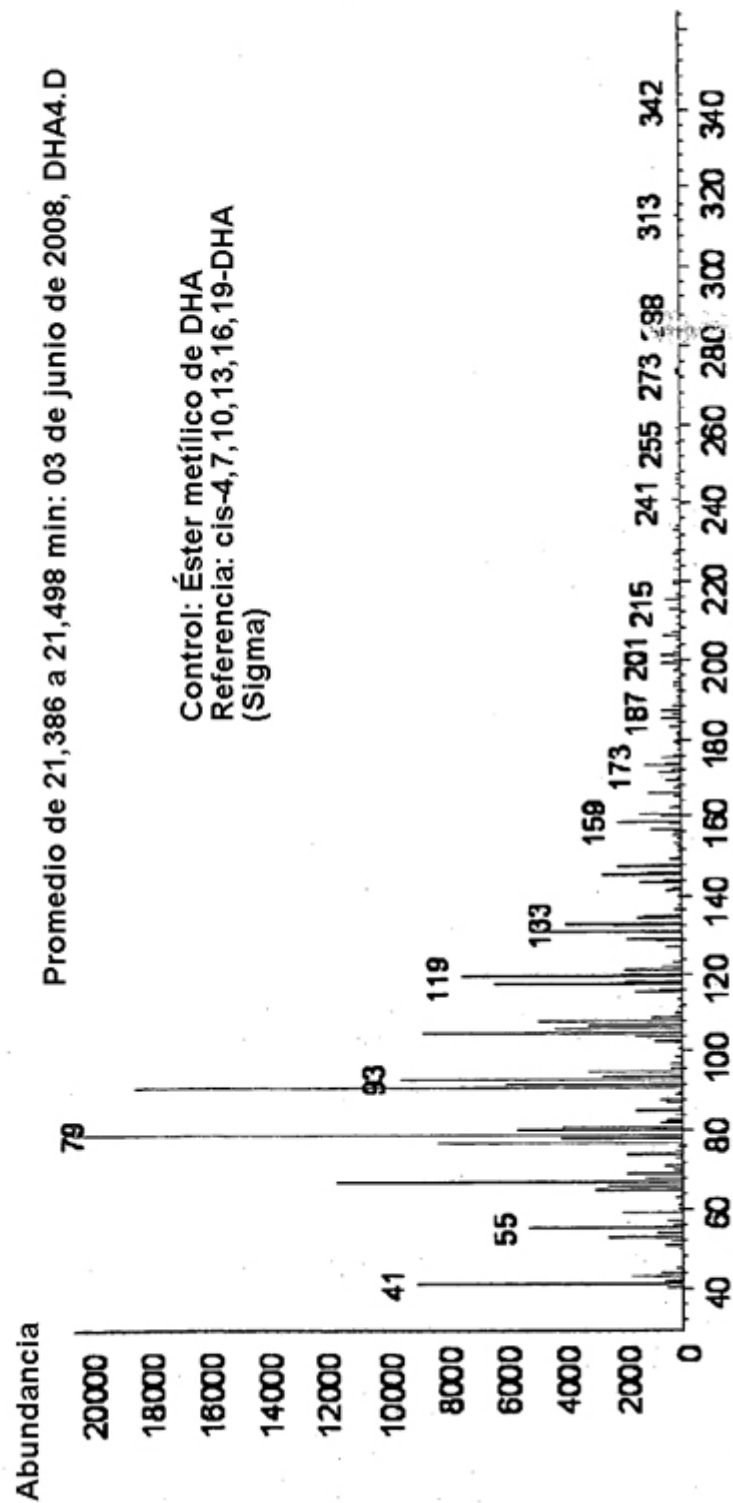
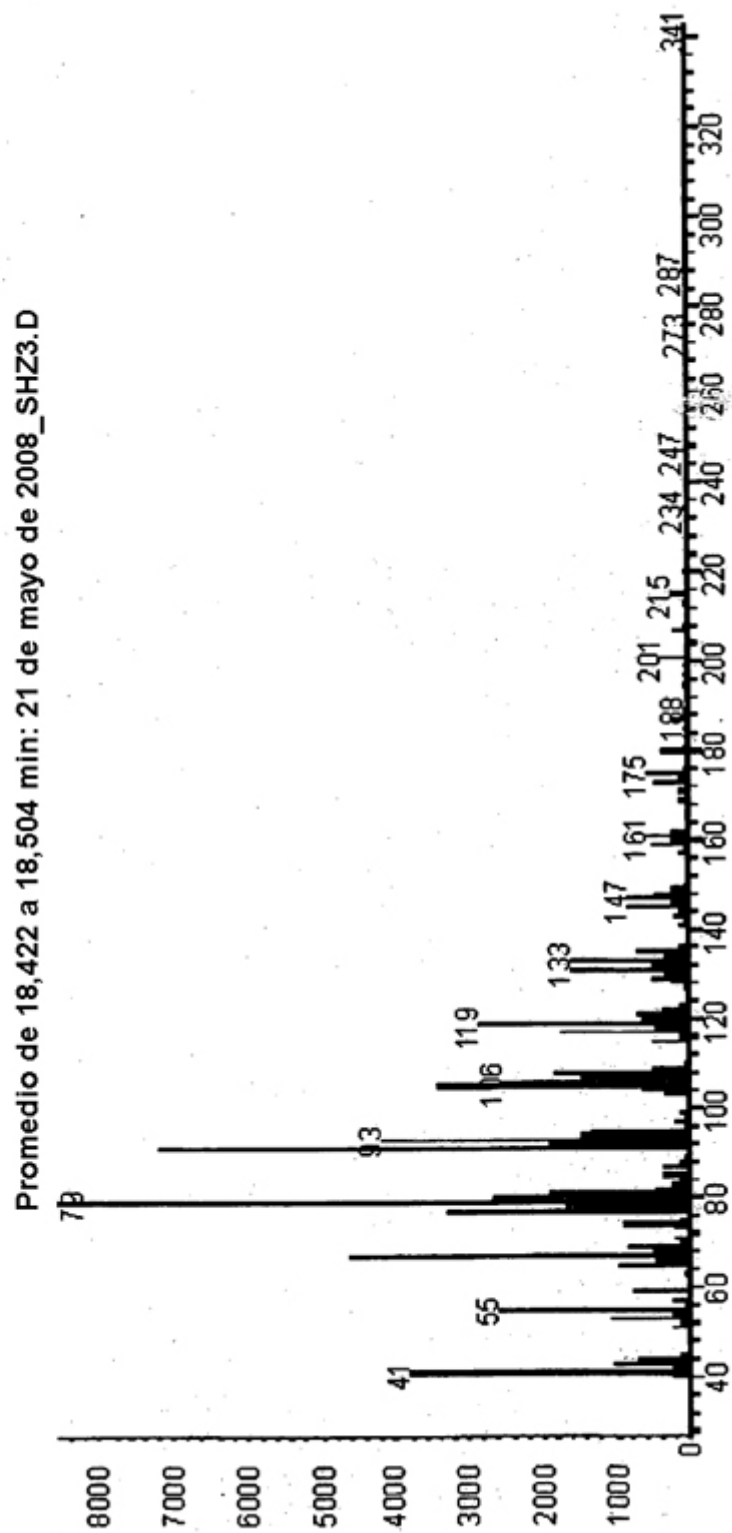


Figura 4:



cont. de Figura 4:

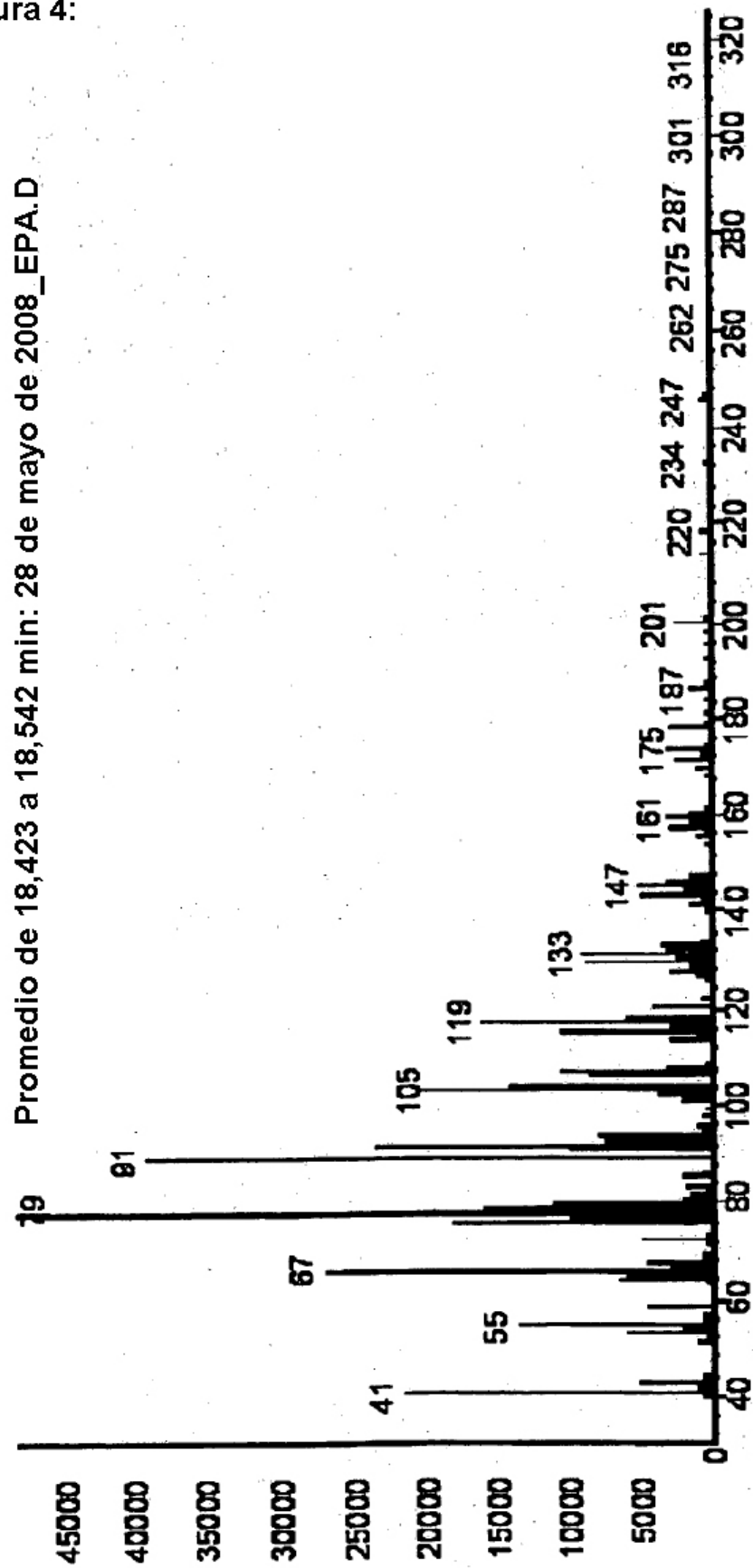
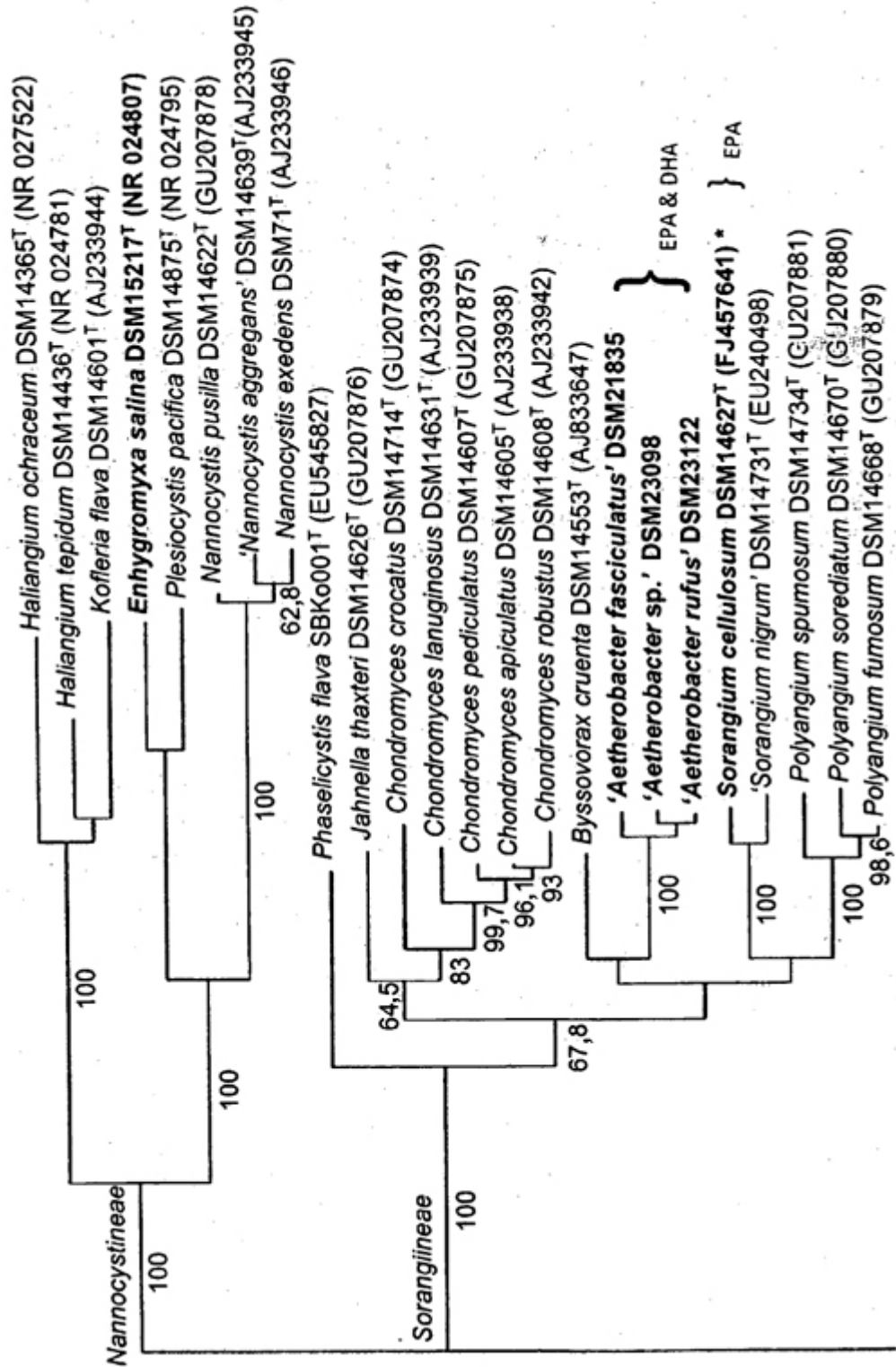


Figura 5:



cont. de Figura 5:

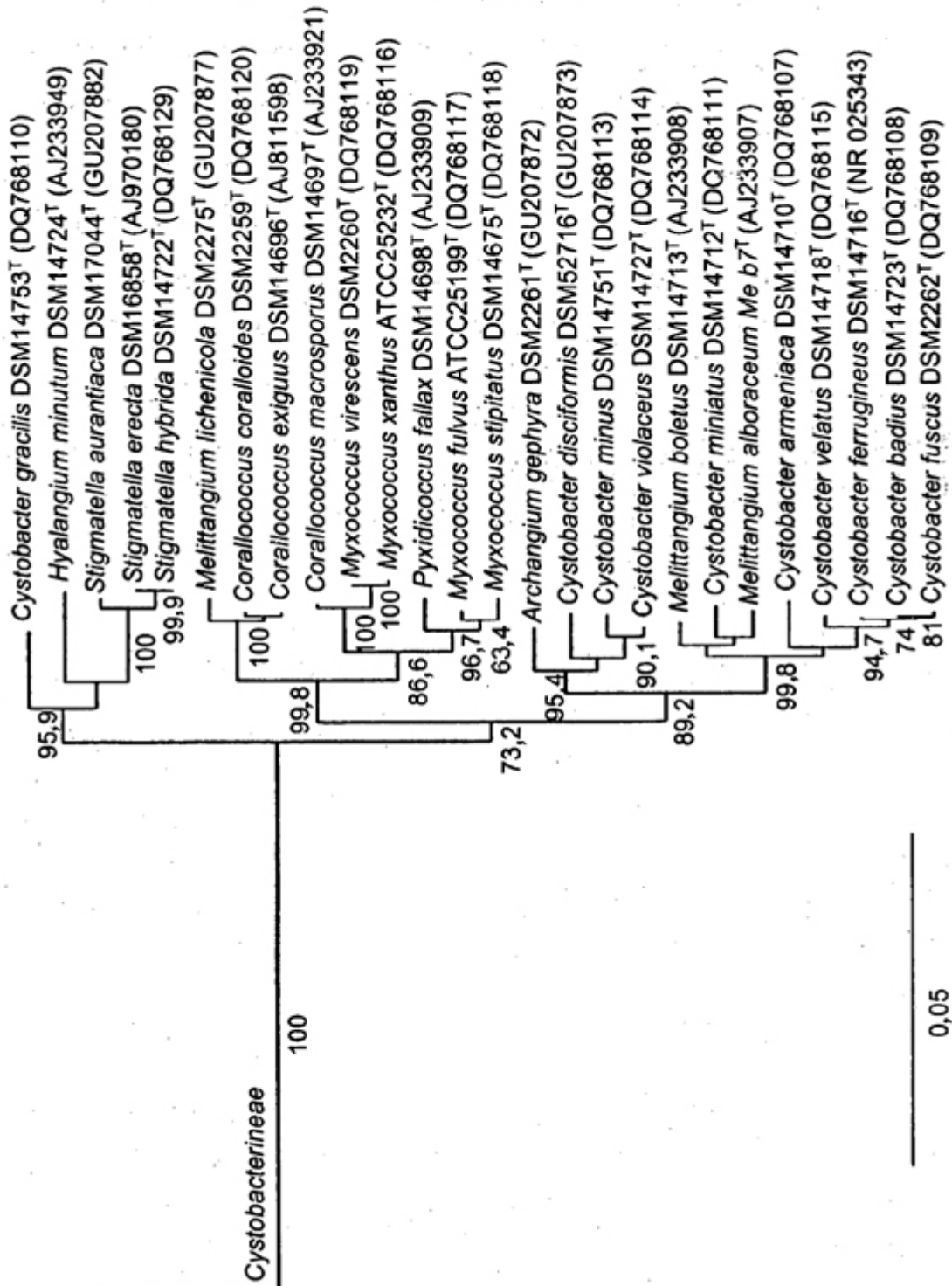
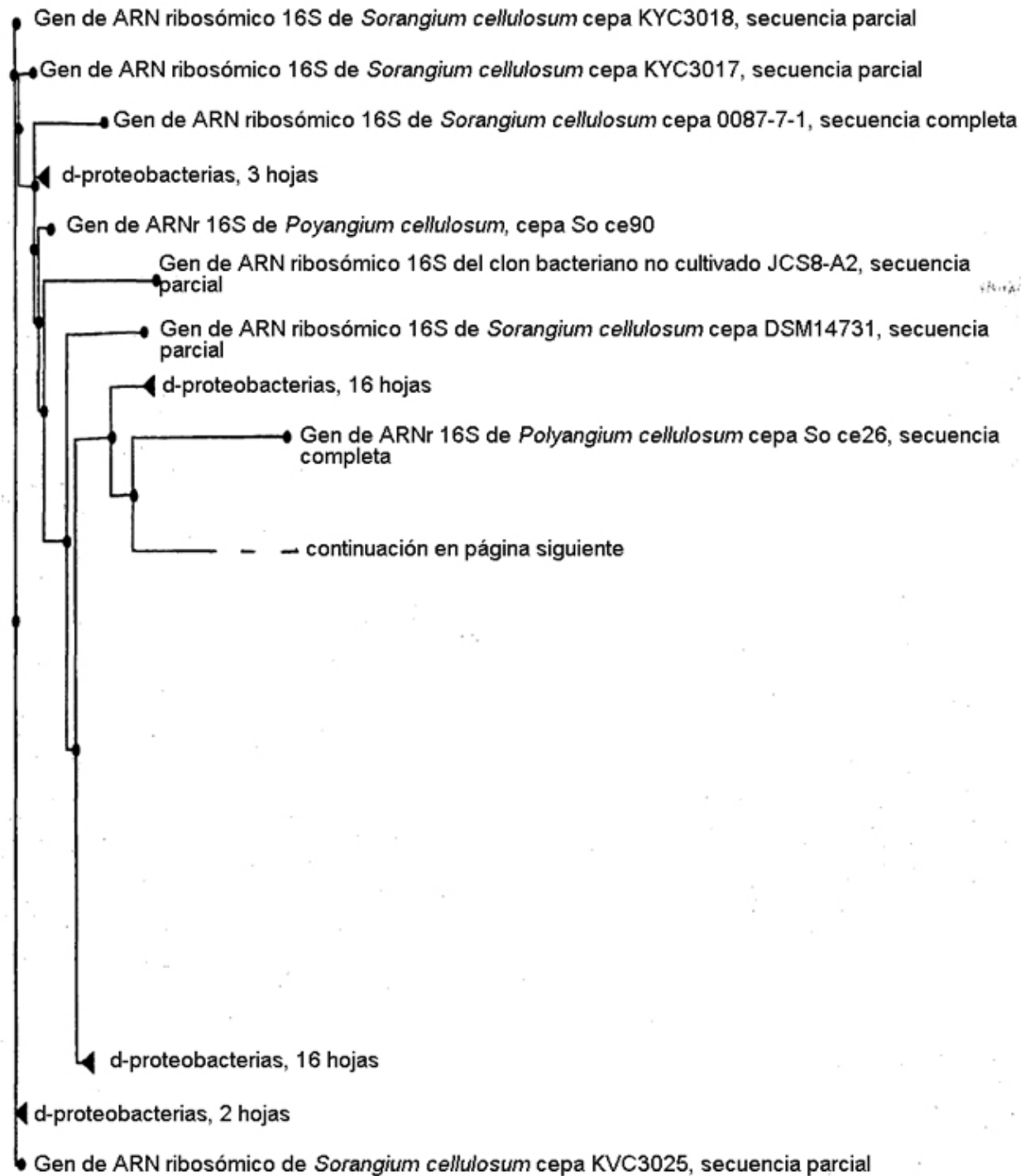


Figura 6:



Cont. de Figura 6:

